

2m11.3544.6

Université de Montréal

Programmation fœtale des maladies adultes :
altération au niveau rénal

Par
Marie-Eve Gagnon

Programme de sciences biomédicales
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès Sciences (M. Sc.)
en sciences biomédicales

Juillet 2007

© Marie-Eve Gagnon, 2007



W

H

U58

2007

V.129

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Programmation fœtale des maladies adultes :
altération au niveau rénal**

Présenté par :

Marie-Eve Gagnon

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Céline Fiset : Président-rapporteur

Dre Michèle Brochu : Directrice de recherche

Dr Alain Bonnardeaux : Membre du jury

RÉSUMÉ

Les maladies de l'âge adulte telles que l'hypertension ou le diabète de type 2 sont souvent associées à des facteurs génétiques ou à des mauvaises habitudes de vie. Pendant les années 90, des études épidémiologiques ont établi un lien entre un faible poids de naissance et une pression artérielle accrue à l'âge adulte. Ceci a conduit à l'élaboration de la théorie de la programmation fœtale qui stipule que l'environnement intra-utérin est un facteur déterminant dans le devenir d'un individu. Un environnement fœtal défavorable pourrait ainsi prédisposer au développement de maladies adultes. Afin d'étudier ce phénomène, un modèle animal de restriction de croissance intra-utérine a été développé où les rates gestantes reçoivent une diète faible en sodium pendant la dernière semaine de gestation, ce qui a comme effet de diminuer la perfusion placentaire et ainsi l'apport de nutriments au fœtus. La progéniture montre notamment, à l'âge adulte, une augmentation de la pression artérielle systolique, une activation accrue du système rénine-angiotensine-aldostérone ainsi qu'une dysfonction rénale (augmentation de la concentration d'urée et de créatinine plasmatique). Puisque la morphologie du rein ne semble pas changée (nombre et grosseur des glomérules similaires), l'hypothèse de ce travail est que l'atteinte de la fonction rénale est le résultat d'altérations aux niveaux moléculaire et cellulaire mises en place tôt dans le développement. De façon à suivre l'évolution des différents paramètres, les animaux ont été étudiés à l'âge fœtal, à 5 semaines de vie et à 12 semaines. Comme point de départ, un criblage génique dans le cortex rénal a été effectué afin d'identifier des gènes potentiellement impliqués. Certains de ceux-ci ont ensuite été analysés individuellement afin de valider les résultats obtenus. Subséquemment, en raison de son implication dans la régulation de la pression artérielle, l'expression protéique et l'activité de la pompe sodium-potassium ATP dépendante a été mesurée. Finalement, par la mesure de deux enzymes du cycle de Krebs, le métabolisme énergétique a été étudié. Les résultats suggèrent que le fœtus s'adapte à la privation de nutriments dans le rein par une augmentation du métabolisme du glucose et de la réabsorption sodique et par une diminution de la prolifération cellulaire, que les animaux à l'âge de la puberté (5 semaines) diminuent leur croissance cellulaire rénale et que les jeunes adultes (12 semaines) augmentent la réabsorption sodique, ce qui pourrait conduire à l'augmentation de la pression artérielle.

Mots-clés : Restriction de croissance intra-utérine, plasticité développementale, environnement fœtal défavorable, hypertension, expression génique, pompe sodium-potassium ATP dépendante, diète maternelle faible en sodium

ABSTRACT

Genetic components or lifestyle are often pointed out to be responsible of the onset of adult diseases such as hypertension, stroke or type 2 diabetes. However, in the late eighties, a correlation between low birthweight and the risk of dying from ischemic heart diseases has been observed. According to fetal programming theory, intrauterine life is a determinant factor in onset of adult diseases. Hence, an adverse fetal environment could predispose to their development. In view to study mechanisms implicated, an animal model was created in which pregnant rats receive a low sodium diet in the last week of gestation, reducing placental perfusion and thus nutrient delivery to the fetuses. Progeny, in adulthood, shows an increased systolic blood pressure, an overactive renin-angiotensin-aldosterone system and a dysfunctional kidney (increased plasma urea and creatinine). Since no morphological change has been noticed (similar glomeruli number and area), the hypothesis of the present report is that impaired renal function is due to molecular and cellular mechanisms which are set up early in development. To appreciate evolution of the different parameters, animals were studied at fetal age, at 5 weeks of life and at 12 weeks. As a starting point, a gene screening was made in renal cortex to identify genes potentially implicated in renal alteration. Then, validation of results was made with a gene-by-gene method. Subsequently, because of its implication in blood pressure regulation, protein expression and activity of the sodium-potassium pump was determined. Finally, energetic metabolism was studied on the basis of the catalytic activity of two enzymes of the tricarboxylic cycle. Results suggest a fetal adaptation to nutrient deprivation by increasing glucose metabolism and sodium retention and by decreasing cell proliferation. Animals at puberty (5 weeks) seem to diminish cell growth in a period of massive changes and young adult animals (12 weeks) seem to increase salt retention, which could lead to the increased blood pressure.

Key words : Intrauterine growth retardation, developmental plasticity, adverse fetal environment, hypertension, genic expression, sodium-potassium pump, low sodium diet

TABLE DES MATIÈRES

<i>RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS</i>	iii
<i>ABSTRACT AND KEY WORDS</i>	v
<i>TABLE DES MATIÈRES</i>	vi
<i>LISTE DES FIGURES</i>	vii
<i>LISTE DES ABRÉVIATIONS</i>	viii
1. INTRODUCTION	1
1.1 Théorie de la programmation foetale	2
1.1.1 Modèles animaux de programmation foetale	3
1.1.2 Le rein et la programmation foetale	4
1.1.3 Modèle d'une diète maternelle faible en sodium	5
1.2 Le rein	7
1.2.1 Morphologie	7
1.2.2 Embryologie	8
1.2.3 Le néphron	8
1.2.3.1 Le corpuscule	9
1.2.3.2 Le tubule	11
1.2.4 Principaux rôles	13
1.3 Le système rénine-angiotensine	14
1.3.1 Système rénine-angiotensine circulant	14
1.3.2 Système rénine-angiotensine rénal	15
1.3.3 L'angiotensine II	16
1.3.3.1 Les récepteurs de l'angiotensine II	17
1.3.4 Environnement foetal et conséquences sur le système rénine-angiotensine	18
1.4 La pompe sodium-potassium ATP dépendante	19
1.4.1 Sa structure	20
1.4.2 Mécanisme général	21
1.4.3 Son rôle dans le rein	22
1.4.4 Sa régulation	23
1.4.5 Environnement foetal et ses conséquences sur la pompe sodium-potassium ATP dépendante	25
1.5 Métabolisme énergétique	26
1.5.1 Le cycle de Krebs	26
1.5.1.1 La citrate synthase et l'aconitase	27
1.5.2 La gluconéogenèse	28
1.5.2.1 La phosphoénolpyruvate carboxykinase	31
1.5.2.2 Environnement foetal défavorable et gluconéogenèse	32
1.6 Facteur de croissance similaire à l'insuline	33
1.6.1 La protéine liante des facteurs de croissance similaires à l'insuline de type 1	33
1.6.2 Les facteurs de croissance similaires à l'insuline dans le développement rénal	34
1.6.3 Les facteurs de croissance similaires à l'insuline et la restriction de croissance intra-utérine	34
1.7 Le système de cytochrome P450	35
1.7.1 Le cytochrome b5	37
1.8 Les rétinoïdes	37
1.8.1 La protéine liante du rétinol	38
1.9 Hypothèse de travail	39
2. ARTICLE	41
3. DISCUSSION	74
4. BIBLIOGRAPHIE	82
5. REMERCIEMENTS	98

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Structure du rein.	7
Figure 2.	Structure du rein et du néphron.	9
Figure 3.	Structure d'un corpuscule rénal.	10
Figure 4.	Schématisation du système rénine-angiotensine.	15
Figure 5.	Structure de la pompe $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$.	21
Figure 6.	Mécanisme d'action de la pompe $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$.	22
Figure 7.	$\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ dans une cellule du tubule contourné proximal.	23
Figure 8.	Séquence enzymatique du cycle de Krebs.	27
Figure 9.	Formation de glucose lors de la gluconéogenèse.	30
Figure 10.	Séquence catalytique de l'insertion d'un atome d'oxygène lors des réactions auxquelles participent les cytochromes P450.	36

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AcétylCoA	: Acétylcoenzyme A
ADH	: Hormone antidiurétique
ADP	: Adénosine diphosphate
AMPc	: Adénosine monophosphate cyclique
Ang I	: Angiotensine I
Ang II	: Angiotensine II
ARNm	: Acide ribonucléique messenger
AT ₁	: Récepteur à l'angiotensine II de type 1
AT ₂	: Récepteur à l'angiotensine II de type 2
ATP	: Adénosine triphosphate
CRBP	: Protéine liante du rétinol cellulaire
CO ₂	: Dioxyde de carbone
CYP	: Cytochrome P450
ECA	: Enzyme de conversion de l'angiotensine
FADH ₂	: Flavine adénine dinucléotide réduite
Fe ²⁺	: Forme réduite du groupement hème
Fe ³⁺	: Forme oxydée du groupement hème
GAPDH	: Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
H ⁺	: Proton
IGF	: Facteur de croissance similaire à l'insuline
IGFBP	: Protéine liante des facteurs de croissance similaires à l'insuline
IGFR	: Récepteur des facteurs de croissance similaire à l'insuline
K ⁺	: Potassium
kDa	: KiloDalton
ml	: Millilitre
Mg ⁺⁺	: Magnésium
mmHg	: Millimètres de mercure
Na ⁺	: Sodium
NaCl	: Chlorure de sodium
NADH	: Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADPH	: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
Na ⁺ -K ⁺ -ATPase	: Pompe sodium-potassium ATP dépendante

NO	: Monoxyde d'azote
PCR	: Amplification en chaîne par polymérase
PEPCK	: Phosphoénolpyruvate carboxykinase
PEPCK-C	: Forme cytosolique de la phosphoénolpyruvate carboxykinase
PEPCK-M	: Forme mitochondriale de la phosphoénolpyruvate carboxykinase
PKA	: Protéine kinase dépendante de l'AMPc
PKC	: Protéine kinase C
RBP	: Protéine liante du rétinol
RCIU	: Restriction de croissance intra-utérine
RT	: Transcription inverse
SRA	: Système rénine-angiotensine
TFG	: Taux de filtration glomérulaire
TTR	: Transthyréline

1. INTRODUCTION

L'étiologie des maladies apparaissant à l'âge adulte, comme l'hypertension, le diabète de type 2 ou encore les maladies cardio-vasculaires, est un sujet maintes fois étudié et débattu. Ces maladies sont souvent associées à des mauvaises habitudes de vie ou encore à des facteurs génétiques qui prédisposeraient un individu à les développer. Par contre, un facteur généralement passé sous silence est l'environnement intra-utérin dans lequel l'individu s'est développé. C'est précisément sur cet aspect que se concentre ce mémoire de maîtrise, le tout axé sur un seul organe : le rein. C'est pourquoi dans la section qui suit seront exposées une revue des connaissances sur la théorie de la programmation fœtale et une description structurale et fonctionnelle du rein ainsi que de certains mécanismes cellulaires et moléculaires qui y sont retrouvés.

1.1 Théorie de la programmation foetale

La restriction de croissance intra-utérine (RCIU) est caractérisée par un poids inférieur au dixième percentile en fonction de l'âge gestationnel (Battaglia & Lubchenco, 1967), tandis que le poids de naissance est considéré comme petit s'il est inférieur à 2500 grammes selon l'Organisation Mondiale de la Santé. Une revue de 34 études épidémiologiques a mis en évidence la relation inverse qui existe entre la pression sanguine et le poids de naissance chez les enfants et les adultes (Law & Shiell, 1996). Ainsi, plus le poids de naissance est petit, plus le sujet a une pression artérielle élevée à l'âge adulte. Ces études ont été menées depuis 1956 sur plus de 66 000 sujets. Une étude réalisée en Angleterre sur 16 000 individus nés au début des années 1900s a démontré que le risque de développer des maladies cardio-vasculaires est inversement proportionnel au poids de naissance (Osmond *et al.*, 1993). Cette même relation a été observée aux États-Unis (Rich-Edwards *et al.*, 1995), en Scandinavie (Koupilova *et al.*, 1997) et en Inde (Stein *et al.*, 1996). Un petit poids de naissance est plus fréquent chez les Américains d'origine africaine et chez les Américains autochtones que chez les Américains d'origine européenne, ce qui correspond également à une prévalence supérieure de maladies cardio-vasculaires, de diabète de type 2, d'hypertension et de maladies rénales chroniques (Fuller, 2000; Lackland *et al.*, 2000). Comme le reflètent ces études, le petit poids de naissance est souvent utilisé comme témoin d'un environnement fœtal défavorable et sa relation avec l'augmentation de la prévalence de plusieurs conditions pathologiques a conduit à l'élaboration de la théorie de la programmation fœtale.

La théorie de la programmation fœtale stipule qu'un événement qui survient *in utero* peut provoquer des conséquences fonctionnelles et structurales permanentes, donc qui persistent à l'âge adulte. Le concept de plasticité développementale fait quant à lui référence au caractère malléable que possèdent les organes pendant la vie intra-utérine, ce qui leur permet de s'adapter aux conditions environnantes (Barker, 2004). Ainsi, même si le génotype d'un individu demeure constant, plusieurs phénotypes peuvent être exprimés dépendamment de l'expérience vécue pendant la vie intra-utérine et post-natale. Une adaptation permanente à des conditions intra-utérines défavorables pourrait alors s'avérer néfaste pendant la vie post-natale et ainsi prédisposer au développement de conditions pathologiques à l'âge adulte (Barker *et al.*, 1993).

Le fœtus humain s'adapte à une sous-nutrition maternelle en redistribuant le flot sanguin et en modifiant la sécrétion d'hormones fœtales et placentaires qui influencent la croissance (Fowden, 1995). Lors de la vie intra-utérine, les organes traversent une période de division cellulaire rapide appelée « période critique ». Cette période de division cellulaire peut être ralentie si le fœtus est restreint en nutriments et/ou en oxygène. Les conséquences d'une sous-nutrition maternelle peuvent être un changement dans le nombre de cellules, dans la distribution des types cellulaires, dans le contrôle hormonal, dans l'activité métabolique ou encore dans la structure des organes (Barker, 1995). La génétique, l'environnement intra-utérin et l'environnement post-natal interagissent ainsi pour déterminer le phénotype d'un individu et donc son degré de prédisposition au développement de conditions pathologiques à l'âge adulte (Jackson, 2000).

1.1.1 Modèles animaux de programmation fœtale

La longévité de l'humain et les facteurs environnementaux difficiles à contrôler comme le mode de vie, le niveau de stress, les habitudes nutritionnelles ou le tabagisme rendent laborieuse la compréhension des mécanismes impliqués dans la programmation fœtale, d'où l'importance de recourir à des modèles animaux. Certains groupes ont comparé des animaux nés plus petits à ceux de poids normaux sans avoir recours à des manipulations expérimentales chez la mère (Bauer *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2001; Schreuder *et al.*, 2005; Woods & Weeks, 2004). D'autres ont induit un stress fœtal en pratiquant des interventions chez la mère, ce qui peut

conduire à une RCIU et entraîner des conséquences à long terme. Principalement, les interventions maternelles sont pratiquées de façon à atteindre trois objectifs différents. Premièrement, une diminution de la perfusion placentaire peut être obtenue, notamment par la ligature des artères utérines (Jansson *et al.*, 1986; Nusken *et al.*, 2007). Deuxièmement, le but poursuivi peut être d'entraîner un changement au niveau hormonal, par une exposition à différents stéroïdes par exemple (Dodic *et al.*, 1998; Drake *et al.*, 2005; Ortiz *et al.*, 2001). Finalement, une privation nutritionnelle maternelle pendant la gestation peut aboutir à une malnutrition chez le fœtus. Cette privation maternelle peut toucher soit l'ensemble des nutriments (Desai *et al.*, 2005; Gilbert *et al.*, 2005; Kind *et al.*, 2002; Riviere *et al.*, 2005) ou un seul à la fois comme les protéines (Langley-Evans *et al.*, 1999; Nwagwu *et al.*, 2000; Vehaskari *et al.*, 2001; Woods *et al.*, 2001), le sodium (Na^+) (Battista *et al.*, 2002; Vidonho, Jr. *et al.*, 2004), la vitamine A (Lelievre-Pegorier *et al.*, 1998) ou le fer (Lewis *et al.*, 2002). Parmi ces études, plusieurs ont démontré une élévation de la pression artérielle chez la progéniture à l'âge adulte (Nwagwu *et al.*, 2000; Vehaskari *et al.*, 2001; Battista *et al.*, 2002; Woods *et al.*, 2001; Dodic *et al.*, 1998; Kind *et al.*, 2002; Langley-Evans *et al.*, 1999; Ortiz *et al.*, 2001; Gilbert *et al.*, 2005; Riviere *et al.*, 2005). D'autres conséquences telles que l'obésité, l'hyperleptinémie, l'hyperinsulinémie et l'hyperphagie peuvent également être retrouvées (Vickers *et al.*, 2000).

1.1.2 Le rein et la programmation fœtale

La pression sanguine et la fonction rénale sont grandement déterminées par la structure rénale, notamment par le nombre de néphrons (Guyton *et al.*, 1972). Le rein est particulièrement susceptible d'être atteint lors d'un déficit de croissance. Chez l'humain, une morphologie rénale fine et allongée a été observée lors d'une RCIU (Konje *et al.*, 1996) alors que chez le rat c'est plutôt une morphologie plus large qui a été notée (Nwagwu *et al.*, 2000). Chez des enfants mort-nés ayant une RCIU, le nombre de néphrons est diminué pour cinq des six cas investigués par rapport à celui d'enfants mort-nés ayant un poids supérieur au dixième percentile (Hinchliffe *et al.*, 1992). Ceci est également observé chez des nouveaux-nés morts dans les deux semaines suivant la naissance et ayant un petit poids comparativement à ceux ayant un poids normal (Manalich *et al.*, 2000). Le déficit en néphrons peut aussi survenir suite à différentes manipulations chez les animaux. C'est notamment le cas lorsqu'une diète faible en protéines est donnée à la mère pendant toute la gestation

(Langley-Evans *et al.*, 1999; Woods *et al.*, 2001) ou pendant la deuxième moitié de celle-ci (Vehaskari *et al.*, 2001). Une faible déficience en vitamine A chez la mère au cours de la gestation (Lelievre-Pegorier *et al.*, 1998) ou encore un excès de glucocorticoïdes (Ortiz *et al.*, 2001) ont également comme effet de diminuer le nombre de néphrons chez la progéniture.

Dans une population d'Australiens aborigènes, le ratio urinaire de l'albumine sur la créatinine, la micro-albuminurie étant un marqueur précoce de néphropathie, est inversement relié au poids de naissance (Hoy *et al.*, 1998a). Chez des individus ayant un petit poids de naissance, une augmentation de la prévalence de micro-albuminurie a été notée (Hoy *et al.*, 1998b; Hoy *et al.*, 1999; Nelson *et al.*, 1998). Une diminution du taux de filtration glomérulaire (TFG) ainsi qu'une augmentation de l'excrétion fractionnaire rénale de Na^+ ont été démontrées dès la période post-natale (Robinson *et al.*, 1990; Vanpee *et al.*, 1992). Des observations de ce genre ont également été faites dans les modèles animaux. À 20 semaines, des rats nés de mères ayant reçu une restriction protéique au cours de la gestation montrent une accélération de la vitesse de détérioration de la fonction rénale par rapport aux témoins (augmentation du volume urinaire ainsi que de l'excrétion d'albumine et d'azote uréique sanguin) (Nwagwu *et al.*, 2000). Chez des porcs présentant une RCIU, une diminution du TFG et une altération de la fonction excrétoire rénale ont été notées (Bauer *et al.*, 2000; Bauer *et al.*, 2002).

1.1.3 Modèle d'une diète maternelle faible en sodium

Dans le laboratoire d'accueil, un modèle animal a été développé afin d'approfondir davantage les connaissances en ce qui a trait à la programmation fœtale. Une diète faible en Na^+ est donnée à la troisième et dernière semaine de gestation. Ceci a pour conséquence la réduction du volume sanguin circulant de la mère et du diamètre des artères utérines, diminuant ainsi la perfusion placentaire (Roy-Clavel *et al.*, 1999; St-Louis *et al.*, 2006). En effet, les ratons nés de ces mères présentent un poids et une taille inférieurs à ceux des ratons nés de mères ayant reçu une diète normale, témoignant d'une RCIU (Roy-Clavel *et al.*, 1999). Ce modèle est pertinent puisque chez l'humain, la réduction de l'expansion volumique au cours de la grossesse a déjà été associée à des cas de RCIU idiopathique (Rosso *et al.*, 1993; Salas *et al.*, 1993).

Chez les fœtus RCIU du modèle, le poids du rein est diminué comparativement à celui des témoins alors que les poids du cœur et du cerveau sont similaires (Battista *et al.*, 2002). Ceci suggère une redistribution du flot sanguin vers le cerveau et le cœur au détriment d'autres organes périphériques comme le rein, tel que déjà observé chez l'humain et dans d'autres modèles animaux. À la suite d'un stress fœtal comme l'hypoxie ou l'asphyxie, il y a protection du cerveau et du cœur (Jensen *et al.*, 1999). Dans notre modèle, chez les animaux RCIU âgés de 5 semaines jusqu'à l'âge de 12 semaines, une augmentation de la pression artérielle systolique est observée par rapport à celle des témoins.

Chez les femelles de 12 semaines, l'activité de la rénine plasmatique ainsi que la concentration de la corticostérone sont augmentées, alors que la concentration d'aldostérone est diminuée. Une augmentation du ratio du poids du ventricule cardiaque gauche sur le poids total a également été mesurée, indiquant une hypertrophie cardiaque gauche. Cette observation est corroborée par une augmentation de l'acide ribonucléique messager (ARNm) du peptide natriurétique auriculaire (Battista *et al.*, 2002) ainsi que par des travaux menés par Battista et collègues aux niveaux cellulaire, moléculaire et métabolique (Battista *et al.*, 2005). Une atteinte de la fonction rénale est également suggérée par des concentrations plasmatiques augmentées d'urée et de créatinine. Toutefois, le nombre de glomérules et l'espace qu'ils occupent dans le rein ne sont pas changés (Battista *et al.*, 2002). Des travaux sur l'axe reproducteur effectués par Gaudet et collègues ont démontré une diminution du poids relatif des ovaires, une augmentation de leur synthèse d'estradiol et une augmentation de l'expression de l'enzyme p450scc (Gaudet, R., en préparation).

Chez les mâles, l'effet de la RCIU semble moins considérable. À 12 semaines, l'activité de la rénine plasmatique est augmentée, tout comme la concentration plasmatique de l'urée. Aucune évidence d'hypertrophie cardiaque n'a pu être démontrée (Battista *et al.*, 2002). Les travaux sur l'axe reproducteur ont démontré un retard dans l'apparition de la puberté et une augmentation de la concentration de testostérone dans le testicule (Gaudet, R., en préparation).

Les travaux présentés dans ce mémoire portent essentiellement sur le rein. Il s'avère donc impératif de faire une brève description de cet organe.

1.2 Le rein

1.2.1 Morphologie

Le rein est principalement composé de trois parties distinctes : le cortex, la médulla et le pelvis. Les différentes structures sont représentées à la figure 1. Le cortex est la partie la plus externe et il contient la majorité des néphrons. Du même coup, c'est le cortex qui jouit de la meilleure irrigation sanguine, recevant à lui seul 90% de la circulation sanguine rénale. La médulla est située juste en dessous du cortex rénal et est constituée des pyramides de Malpighi. Ces pyramides sont orientées de façon à ce que leur base soit du côté du cortex et leur pointe vers l'intérieur du rein. Elles sont formées d'une série de tubules microscopiques pratiquement parallèles. Chaque pyramide est séparée des autres par un prolongement cortical, qui délimite la frontière d'un lobe rénal. Les pyramides débouchent sur un calice rénal mineur, suivi d'un calice rénal majeur pour aboutir dans le pelvis rénal et finalement, dans l'uretère qui conduit l'urine jusqu'à la vessie. Les reins sont grandement irrigués, recevant 25% du débit cardiaque total, ce qui correspond environ à 1200 millilitres (ml) de sang par minute (Marieb, 1999).

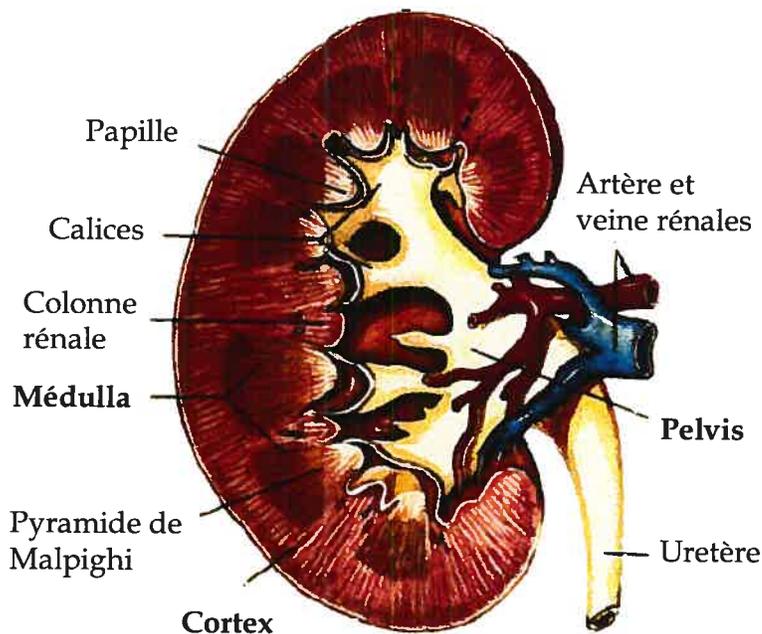


Figure 1. Structure du rein.

(Adapté de (Jenks, 2002))

1.2.2 Embryologie

Trois structures rénales différentes sont formées pendant l'organogenèse, mais deux d'entre elles se dégradent pour laisser la troisième, le métanéphros, devenir le rein futur. C'est suite à l'invasion du métanéphros par le bourgeon de l'uretère, une excroissance du canal de Wolf, que le rein définitif se développe (Gilbert, 2002). C'est le mésenchyme du métanéphros qui se transforme en néphrons. Chez l'humain, la formation des néphrons commence à partir du 30^e jour de gestation et cesse pendant la 36^e semaine de gestation. Chez le rat, les néphrons débutent plutôt leur formation au 12^e jour de gestation et elle se poursuit après la naissance, jusqu'au 8^e jour de vie environ (Moritz *et al.*, 2003; Nigam *et al.*, 1996). Le système rénine-angiotensine (SRA), certains facteurs de croissance, l'apoptose et l'apport nutritionnel sont parmi les éléments qui influencent la néphrogenèse (Schreuder *et al.*, 2006).

1.2.3 Le néphron

Le néphron (figure 2) est considéré comme étant l'unité fonctionnelle du rein; c'est dans celui-ci que s'accomplit la majeure partie du travail rénal. Ses deux structures, le corpuscule et le tubule, sont responsables respectivement de la filtration et de la réabsorption ainsi que de la sécrétion de diverses substances. La grande majorité des néphrons (85%) sont situés presque exclusivement dans le cortex rénal, exception faite d'une partie de l'anse de Henlé et du tubule collecteur qui se retrouvent dans la médulla externe. Ces néphrons sont donc appelés néphrons corticaux. Le corpuscule des autres néphrons, appelés néphrons juxta-médullaires, se retrouve dans le cortex près de la frontière qui le sépare de la médulla et leur anse de Henlé s'enfonce plus profondément dans la médulla rénale. Ces néphrons jouent un rôle particulier dans la formation de l'urine concentrée grâce à une structure de capillaires particuliers, appelés *vasa recta* (Guyton & Hall, 2003b; Marieb, 1999).

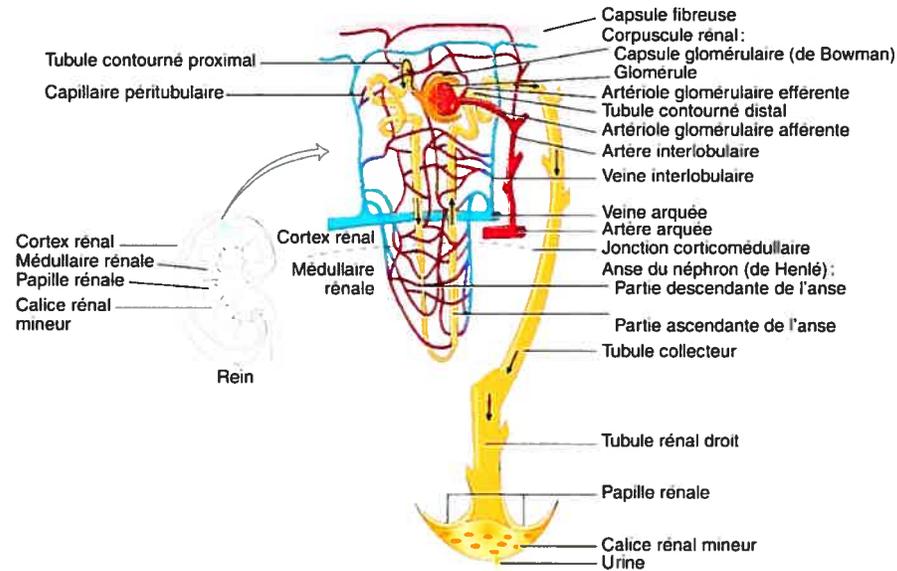


Figure 2. Structure du rein et du néphron.

(Adapté de (Tortora *et al.*, 1994))

1.2.3.1 Le corpuscule

À l'instar du néphron, le corpuscule est formé lui aussi de deux structures, soit la capsule de Bowman et le glomérule. Les différentes parties du corpuscule sont représentées à la figure 3. La capsule, qui enveloppe littéralement le glomérule, est constituée de deux feuillets, le feuillet pariétal externe et le feuillet viscéral, séparés par la chambre glomérulaire dont le prolongement conduit au tubule rénal. Le rôle du premier feuillet est seulement structural. Dans le deuxième feuillet se trouvent les podocytes qui constituent une partie de la membrane de filtration. Ceux-ci se prolongent en pédicelles qui eux, sont liés à la lame basale des capillaires glomérulaires. C'est dans l'interstice entre deux pédicelles, appelé fente de filtration, que passe le filtrat pour aboutir dans la chambre glomérulaire (Marieb, 1999).

Le glomérule est formé d'un bouquet de capillaires artériels. L'endothélium fenestré de ces capillaires laisse passer de grandes quantités de liquide contenant des solutés, tout en séquestrant les protéines plasmatiques trop volumineuses pour pénétrer dans les pores. Ces capillaires sont particuliers dans le fait qu'ils sont alimentés et drainés par des artérioles. Les caractéristiques des artérioles afférentes et efférentes favorisent une grande pression sanguine dans les capillaires. En effet, les

artérioles offrent une grande résistance et l'artériole efférente possède un diamètre plus petit que l'artériole afférente ce qui crée une élévation de la pression sanguine. La grande pression hydrostatique engendrée force le liquide et les solutés du sang à traverser dans la chambre glomérulaire. Environ 20 % du débit plasmatique rénal est ainsi filtré. Ensuite, environ 99 % du filtrat glomérulaire est réabsorbé et retourne dans le sang (Marieb, 1999).

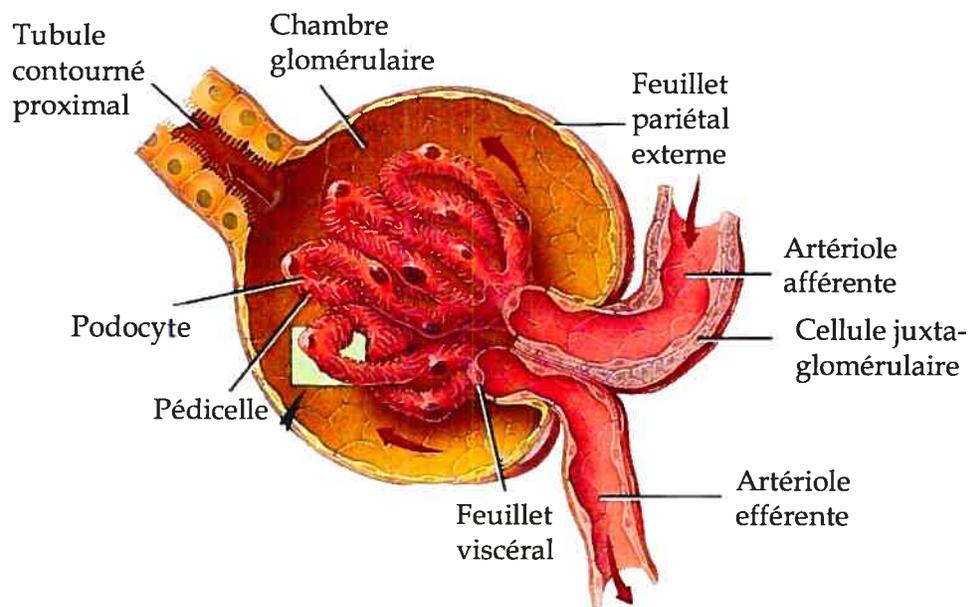


Figure 3. Structure d'un corpuscule rénal.

(Adapté de (Greene, 2004))

Tel que mentionné précédemment, la filtration s'effectue dans le corpuscule rénal. Elle est le résultat de trois pressions qui s'opposent. La plus importante est la pression hydrostatique glomérulaire qui force l'eau et les différents composants dissous dans le sang à passer subséquentement au travers des fenestrations des capillaires, de la membrane basale du glomérule et des fentes de filtration du feuillet viscéral de la capsule glomérulaire pour se retrouver dans la chambre glomérulaire. S'oppose à ce mouvement la pression hydrostatique capsulaire qui résulte du reflux d'une petite quantité de filtrat dans le capillaire en raison des résistances engendrées par les parois de la capsule et par le liquide se trouvant déjà dans la chambre glomérulaire. Finalement, la pression osmotique colloïdale du sang créée par la présence de protéines dans le plasma s'oppose également à la pression hydrostatique. La quantité de filtrat formé dans la totalité des corpuscules rénaux par minute

représente le TFG. Ainsi, tout facteur qui contribue à modifier la pression nette de filtration modifie du même coup le TFG (Tortora *et al.*, 1994). Toutefois, plusieurs mécanismes sont en place pour conserver un TFG relativement constant dans l'organisme, dont l'autorégulation rénale, les mécanismes nerveux et le SRA (Marieb, 1999).

1.2.3.2 Le tubule

Pendant le trajet du filtrat au travers du tubule rénal, deux processus s'opposent, soit la réabsorption dans le sang et la sécrétion dans la lumière tubulaire de certaines substances. Par contre, dans la plupart des cas, l'excrétion finale dépend davantage de ce qui est réabsorbé que de ce qui est sécrété, la réabsorption étant un processus plus considérable. Le tubule est bordé d'une seule épaisseur de cellules tubulaires pour favoriser ces deux processus. Chaque cellule tubulaire possède deux membranes distinctes, soit la membrane luminale qui tapisse la frontière entre la lumière tubulaire et la cellule ainsi que la membrane basolatérale qui est plutôt la jonction entre la cellule et le sang (Gougoux, 1999b).

Les divers segments du tubule rénal sont, dans l'ordre, le tubule contourné proximal, l'anse de Henlé, le tubule contourné distal et le tubule rénal collecteur (Marieb, 1999). La majorité de la réabsorption tubulaire se fait dans le tubule contourné proximal et sa constitution tend donc à augmenter la surface de contact avec les cellules, comme en témoigne la présence de microvillosités qui forment une bordure en brosse du côté luminal. Un autre point qui distingue le tubule contourné proximal est la présence de nombreuses grosses mitochondries en raison de la réabsorption active de plusieurs solutés, ce qui requiert une fraction considérable de l'énergie métabolique produite par le rein. L'anse de Henlé est constituée d'une partie descendante et d'une partie ascendante. Les deux fonctions majeures de l'anse de Henlé consistent à réabsorber environ 25 à 30 % du chlorure de sodium (NaCl) filtré et de réabsorber celui-ci en excès d'eau de façon à engendrer l'excrétion d'urine ayant une osmolalité différente de celle du plasma (Rose & Post, 2001a). La première portion de la partie descendante est en continu avec le tubule contourné proximal et possède des cellules semblables à celles de ce dernier. La deuxième portion est perméable à l'eau et, de façon moins importante, au NaCl et à l'urée. La partie ascendante, quant à elle, est imperméable à l'eau, mais peut transporter du

NaCl dans l'interstitium. La différence de perméabilité hydrique est attribuable à la présence ou à l'absence de canaux laissant passer l'eau, appelés aquaporines, dans la membrane luminale. Les cellules du tubule contourné distal se distinguent de celles du tubule contourné proximal du fait qu'elles sont plus minces et qu'il n'y a presque pas de microvillosités. Ceci met en lumière le rôle sécrétoire prépondérant du tubule contourné distal. Dans la section terminale du tubule contourné distal, les cellules deviennent hétérogènes pour donner deux types distincts, soit les cellules intercalaires et les cellules principales. Les cellules intercalaires possèdent de nombreuses microvillosités et sont spécialisées dans l'équilibre acido-basique. Les cellules principales sont dépourvues de microvillosités et sont plutôt impliquées dans l'équilibre hydrique et sodique de l'organisme (Marieb, 1999).

À l'endroit où le tubule contourné distal entre en contact avec les artérioles afférentes et efférentes se retrouve une structure particulière, appelée appareil juxta-glomérulaire. Dans la paroi des artérioles se situent les cellules juxta-glomérulaires qui contiennent des granules de rénine et qui agissent comme mécanorécepteurs afin de détecter les variations de pression artérielle. Du côté du tubule, un amas de cellules appelé *macula densa* agit comme chémorécepteur pour détecter les variations des solutés du filtrat (Marieb, 1999).

Un réseau de capillaires, dits pérیتubulaires, entoure les tubules rénaux. Ceux-ci sont issus de l'artériole efférente et se jettent dans les veinules rénales. Contrairement aux capillaires glomérulaires, ils sont spécialisés dans l'absorption de substances. Par conséquent, la pression sanguine à l'intérieur est faible et l'endothélium est poreux (Marieb, 1999).

Contrairement à la filtration, la réabsorption se fait de façon très sélective. En effet, la réabsorption est dépendante des besoins de l'organisme et s'ajuste selon ceux-ci. Deux voies distinctes peuvent être empruntées par une substance pour être réabsorbée ou sécrétée. D'abord il y a la voie transcellulaire où la substance doit traverser successivement la membrane luminale, le cytoplasme de la cellule tubulaire et la membrane basolatérale. Ce transport nécessite la dégradation d'adénosine triphosphate (ATP) et est donc considéré comme étant actif. Ensuite, il y a la voie paracellulaire où les substances passent entre les cellules tubulaires, c'est-à-dire dans les espaces intercellulaires latéraux ou à travers les jonctions serrées. Cette voie

implique que les substances aient un faible poids moléculaire et ne nécessite pas d'énergie puisque le transport se fait selon le gradient électrochimique (Gougoux, 1999a).

1.2.4 Principaux rôles

Le rein a comme fonction générale de maintenir l'homéostasie du volume et de la composition ionique des fluides de l'organisme. Il est la principale voie d'élimination des déchets métaboliques devenus inutiles pour l'organisme, dont l'urée, la créatinine, les produits de dégradation de l'hémoglobine ainsi que les métabolites de certaines hormones. S'ajoutent également à cette liste d'autres agents toxiques et substances chimiques comme les pesticides, les médicaments ou les additifs alimentaires. Le rein peut également équilibrer les entrées d'eau et d'électrolytes en ajustant leurs sorties. De plus, il est un élément clé dans la régulation de la pression artérielle. Celle-ci se fait en deux temps, soit à court terme et à long terme. À court terme, le rein se sert de sa capacité à sécréter des substances ou des facteurs vasoactifs comme la rénine. À long terme, c'est plutôt sa capacité à excréter et à retenir des quantités variables d'eau et de Na^+ qui entrent en jeu. Il contribue aussi à l'équilibre acido-basique en excréant des acides et en ajustant les réserves de tampons des liquides de l'organisme. Dans le cas de certains acides produits lors du métabolisme des acides aminés, le rein constitue leur seule voie d'élimination. Bien que souvent oublié, il est responsable de la presque totalité de la sécrétion de l'érythropoïétine, une hormone qui stimule la production d'érythrocytes. De façon détournée, le rein joue un rôle dans l'absorption de calcium par l'intestin et dans son dépôt osseux en produisant la forme active de la vitamine D, le calcitriol. Finalement, le rein, comme le foie, contribue à procurer l'énergie nécessaire lors d'un jeûne prolongé en participant au processus de gluconéogenèse, soit la production de glucose à partir d'acides aminés ou d'autres précurseurs (Guyton & Hall, 2003b).

Les nombreux rôles exercés par le rein requièrent la participation et l'interaction de plusieurs éléments, dont quelques-uns seront décrits dans les sections subséquentes.

1.3 Le système rénine-angiotensine

Le SRA est un puissant régulateur de la pression artérielle en agissant sur la résistance vasculaire ainsi que sur la composition et le volume du fluide extracellulaire. Pour donner un aperçu général de ce système, illustré à la figure 4, la rénine est d'abord sécrétée par les cellules juxta-glomérulaires et agit de façon enzymatique pour convertir l'angiotensinogène en angiotensine I (ang I). L'ang I est ensuite convertie en angiotensine II (ang II) par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA). L'ang II peut alors stimuler la production d'aldostérone dans le cortex surrénalien et la libération de l'hormone antidiurétique (ADH) par l'hypothalamus. Les facteurs stimulant la sécrétion de rénine sont une diminution de l'étirement des cellules juxta-glomérulaires des artérioles afférentes, la stimulation de ces cellules par les cellules activées de la *macula densa* ou encore leur stimulation directe par le système nerveux sympathique (Marieb, 1999).

1.3.1 Système rénine-angiotensine circulant

En réponse à une diminution aiguë du volume circulant, des composantes de différents organes sont sollicitées pour provoquer un effet vasoconstricteur. Cette réponse nécessite la sécrétion de rénine par l'appareil juxta-glomérulaire dans le rein, la sécrétion d'angiotensinogène par le foie et l'ECA localisée dans la surface luminale des endothéliums vasculaires majoritairement dans ceux du poumon (Rohrwasser *et al.*, 1999).

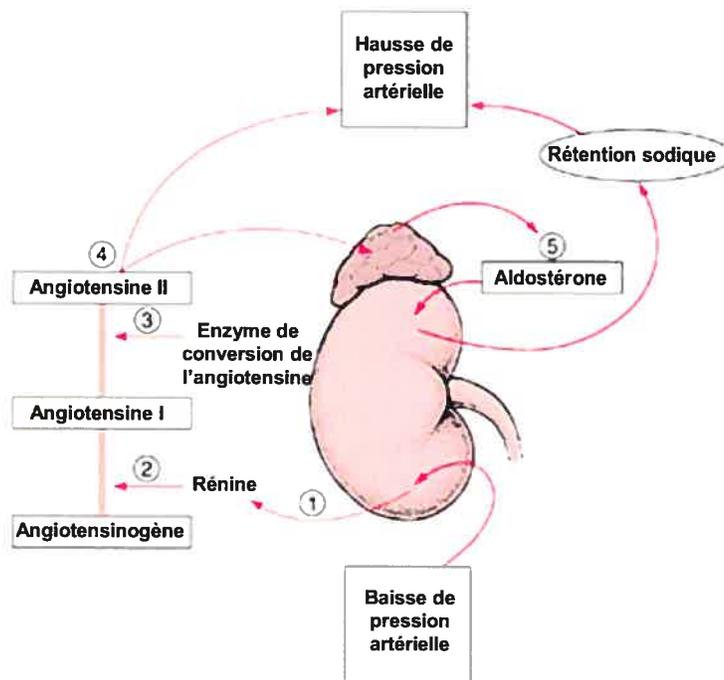


Figure 4. Schématisation du système rénine-angiotensine.

(Adapté de (Beers *et al.*, 2003))

En plus de son rôle dans la régulation des fonctions rénales, le SRA serait également impliqué dans le développement adéquat de cet organe. Chez le rat, les composantes du SRA apparaissent entre le 12^e et le 17^e jour de gestation et sont même, dans certains cas, retrouvées de façon plus importante chez le fœtus et le nouveau-né que chez l'adulte (Gomez & Norwood, 1995; Gomez *et al.*, 1989). Une inhibition de l'ECA ou de la signalisation du récepteur à l'ang II de type 1 (AT₁) chez des animaux pendant la néphrogenèse conduit à un défaut dans la morphologie du rein (inflammation chronique tubulo-interstitielle, divers degrés d'atrophie de la papille rénale et dilatation du pelvis) ainsi que dans sa fonction plus tard dans la vie (Friberg *et al.*, 1994).

1.3.2 Système rénine-angiotensine rénal

Comme c'est le cas dans plusieurs organes, toute la machinerie nécessaire au SRA est présente dans le rein, indiquant la présence d'un SRA exclusivement rénal (Rose & Post, 2001b). L'ang II produit par le rein serait un bon outil de régulation des fonctions de ce tissu. La présence d'un taux d'ang II 1000 fois supérieur à ce

qu'il y a dans la circulation périphérique est en accord avec l'action locale possible de celui-ci (Seikaly *et al.*, 1990). L'activation de ce système pourrait ainsi se faire à la suite de facteurs locaux, tels que les prostaglandines, le monoxyde d'azote (NO) et l'endothéline (Wagner *et al.*, 1998). Le SRA rénal peut ainsi être suractivé sans que ce soit visible dans le bilan plasmatique. Par exemple, dans certains cas d'hypertension essentielle, il y a une vasoconstriction rénale persistante et une rétention sodique causée par une augmentation de l'ang II, même si elle n'est pas augmentée dans le plasma comparativement aux sujets hypertendus montrant une perfusion rénale normale (Redgrave *et al.*, 1985). L'activation du SRA local peut survenir dans plusieurs conditions pathologiques, comme dans le cas de dommages rénaux (Ruiz-Ortega *et al.*, 2003). Ce système peut également être impliqué dans la réponse inflammatoire.

1.3.3 L'angiotensine II

L'effet global de l'action de l'ang II est l'augmentation de pression artérielle moyenne (Marieb, 1999). Les deux effets systémiques principaux sont l'activation des muscles lisses des artérioles (vasoconstriction) et l'augmentation du volume circulant. L'aldostérone, dont la production est stimulée par l'ang II, augmente la réabsorption de Na^+ par les tubules rénaux et, par le fait même, de l'eau, celle-ci suivant le Na^+ dans ses déplacements par osmose. L'ang II agit également sur l'hypothalamus en stimulant le centre de la soif et la libération de l'ADH, ce qui a pour effet de diminuer l'excrétion hydrique rénale. Dans le rein spécifiquement, puisque les artérioles efférentes possèdent plus de récepteurs à l'ang II que les artérioles afférentes, elles se contractent davantage. Cela conduit à une augmentation de la pression capillaire glomérulaire, résultant en une élévation du TFG.

L'ang II constitue le peptide effecteur principal du SRA et est impliqué dans la croissance cellulaire, la fibrose et la réponse inflammatoire. Ce peptide est activement impliqué dans le développement des maladies cardio-vasculaires et rénales. En effet, il agit sur l'expression de plusieurs agents, dont des facteurs de croissance, des cytokines, des chémokines et des molécules d'adhésion (Ruiz-Ortega *et al.*, 2001).

1.3.3.1 Les récepteurs de l'angiotensine II

L'ang II agit principalement via deux récepteurs spécifiques, AT₁ et AT₂. Ceux-ci sont des récepteurs à sept passages transmembranaires couplés aux protéines G et possèdent une homologie de séquence en acides aminés de 32 % (de Gasparo *et al.*, 2000; Carey *et al.*, 2000). L'apparition d' AT₁ et AT₂ semble survenir avant celle des autres composantes du SRA ce qui met en lumière l'implication de ces récepteurs dans le développement normal du rein. Ils montrent cependant un profil différent d'expression pendant la vie intra-utérine. Après la naissance, l'expression génique et protéique d'AT₁ augmente pendant que celle des récepteurs AT₂ diminue (Aguilera *et al.*, 1994; Norwood *et al.*, 1997).

Les AT₁ sont responsables de l'action de l'ang II sur l'hémodynamique rénale, sur la filtration glomérulaire et sur la composition du fluide tubulaire. Ils sont également impliqués lors des effets de l'ang II sur la croissance et lors des processus fibrotiques, thrombotiques et inflammatoires (Ruiz-Ortega *et al.*, 2003). Contrairement aux AT₂, les AT₁ sont présents dans les structures plus différenciées et semblent donc responsables des ajustements fins du développement vasculaire rénal et de l'acquisition des fonctions normalement opérées par l'ang II (Tufro-McReddie *et al.*, 1995). La majorité de ces fonctions est assurée par AT₁ au long de la vie.

Pendant le développement, les AT₂ sont surtout situés dans le mésenchyme indifférencié et semblent impliqués dans la régulation de la morphogenèse en diminuant la prolifération cellulaire, en stimulant l'apoptose et en modulant la transformation du mésenchyme en épithélium (Hilgers *et al.*, 1997). Une augmentation de l'expression de l'AT₂ a été mesurée lors de différents processus comme l'inflammation, la protéinurie et l'apoptose (Ruiz-Ortega *et al.*, 2003). Plusieurs études suggèrent une implication de l'AT₂ dans l'apparition de conditions pathologiques dans le rein (Ruiz-Ortega *et al.*, 2003; de Gasparo *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 1998).

1.3.4 Environnement fœtal et conséquences sur le système rénine-angiotensine

Les résultats obtenus lors des études mettant en relation le SRA et la programmation fœtale et/ou la RCIU sont souvent contradictoires, mais l'implication du SRA dans le développement de l'hypertension et son altération lors de RCIU sont de plus en plus évidentes. Il faut discriminer entre les données obtenues lors de la période néo-natale et celles obtenues plus tard dans la vie, ainsi qu'entre le SRA circulant et le SRA rénal. Dans le sang de cordon de bébés nés avant terme et ayant une RCIU, il y a une augmentation de la concentration d'ang II comparativement aux bébés nés à terme n'ayant pas de RCIU (Kingdom *et al.*, 1993). Une augmentation de l'activité de la rénine plasmatique a été mesurée dans la veine ombilicale chez des bébés petits pour leur âge gestationnel comparativement à ceux de poids appropriés (Konje *et al.*, 1996). Dans cette même étude, une corrélation inverse entre l'activité de la rénine plasmatique et le poids de naissance a également été démontrée. Par ailleurs, une anomalie de maturation du SRA a été décrite chez des bébés mort-nés ayant une RCIU par rapport à ceux ayant un poids normal. En effet, chez ces derniers, le nombre de cellules contenant de la rénine se trouvant dans la zone profonde du cortex rénal diminue tandis que le nombre de celles se trouvant dans la zone superficielle augmente avec l'âge gestationnel (de 20 semaines à 40 semaines de gestation). Chez les bébés ayant une RCIU, il y a autant de cellules contenant de la rénine dans les zones profondes et superficielles à 20 semaines de gestation qu'il y en a à 40 semaines (Kingdom *et al.*, 1999). Un autre groupe a étudié l'activité de l'ECA en fonction du poids de naissance chez des bébés en santé d'un mois et de trois mois. Aucune corrélation significative n'a pu être établie à un mois, tandis qu'à trois mois, une corrélation inverse a été démontrée (Forsyth *et al.*, 2004).

Chez les animaux, il a été démontré chez des rats nés de mères ayant reçu une diète faible en protéine tout au long de la gestation une réduction du SRA rénal chez les nouveau-nés. Ceux-ci présentent, dans le rein, une diminution de l'ARNm et de la concentration de la rénine ainsi qu'une diminution de la concentration d'ang II. Ceci pourrait altérer le développement du rein et conduire à une réduction du nombre de néphrons, contribuant, à l'âge adulte, à l'augmentation de la pression artérielle (Woods *et al.*, 2001). Lors de la période post-natale, d'après les études animales, il semblerait que le SRA soit plutôt suractivé lorsque l'hypertension est établie. Une

augmentation des taux d'aldostérone et d'ang II plasmatiques a été observée chez des rats hypertendus âgés de quatre mois nés de mères ayant subi une restriction nutritionnelle durant la gestation (Riviere *et al.*, 2005). Chez des moutons âgés de neuf mois montrant une augmentation de la pression artérielle et nés de mères ayant reçu une restriction de l'apport en nutriments pendant la gestation, c'est plutôt une augmentation de l'ECA dans le cortex rénal qui a été démontrée (Gilbert *et al.*, 2005). Des résultats contradictoires ont toutefois été obtenus chez des rats nés de mères ayant reçu une diète restreinte en protéines pendant la dernière moitié de la gestation. Pendant la phase préhypertensive (quatre semaines) et lorsque l'hypertension peut être mesurée, ces rats présentent une diminution de l'activité de la rénine plasmatique alors que la concentration d'aldostérone plasmatique est augmentée (Vehaskari *et al.*, 2001). La diminution de l'activité de la rénine plasmatique pourrait être le résultat d'une expansion du volume extracellulaire causée par une rétention sodique et hydrique primaire ou encore par un excès de minéralocorticoïdes. La hausse de la concentration d'aldostérone plasmatique pourrait résulter d'un désordre de la glande surrénale ou d'un stimuli indépendant du volume circulant, comme la balance en potassium (K^+). Finalement, chez des porcs nés avec un petit poids, une diminution de la concentration de l'ECA a été observée comparativement aux porcs ayant un poids de naissance élevé et une relation inverse entre la pression artérielle moyenne et le poids de naissance a été établie (Poore *et al.*, 2002). Ces observations du SRA suggèrent une implication de celui-ci dans la programmation fœtale du développement de l'hypertension.

1.4 La pompe sodium-potassium ATP dépendante

Dans les cellules en général, la pompe sodium-potassium ATP dépendante (Na^+ - K^+ -ATPase) est responsable du maintien des concentrations de Na^+ et de K^+ de part et d'autre de la membrane plasmique. Elle permet à deux ions K^+ d'entrer dans la cellule pendant que trois ions Na^+ en sortent (Guyton & Hall, 2003a). Elle crée ainsi un potentiel électro négatif dans la cellule. C'est l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP qui permet le transport ionique de la pompe. Dans les cellules tubulaires rénales, comme dans tous les épithéliums réabsorbant le Na^+ , la pompe se situe presque exclusivement du côté basolatéral ce qui signifie que le Na^+ est transporté vers le sang.

1.4.1 Sa structure

La pompe $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ est constituée de deux sous-unités principales, soit la sous-unité α et la sous-unité β . Ces deux sous-unités sont représentées à la figure 5. La sous-unité α est catalytique. Elle contient les sites de phosphorylation ainsi que les sites de liaison à l'ATP, au Na^+ , au K^+ et aux divers glycosides cardiaques dont la ouabaïne, la digoxine et la digotoxine. Quatre isoformes existent, mais c'est surtout l'isoforme α_1 , sinon la seule, qui est retrouvée dans le rein. Les quatre isoformes lient les glycosides cardiaques, mais avec des affinités différentes. Par exemple, la sous-unité α_1 présente une affinité à la ouabaïne inférieure que celle de la sous-unité α_3 (Feraille & Doucet, 2001). La sous-unité β est la sous-unité régulatrice. Bien qu'elle ne semble pas avoir d'activité catalytique propre, son association à la sous-unité α est essentielle pour le fonctionnement de la pompe. Elle permet le bon repliement des sous-unité α nouvellement synthétisées, leur translocation du réticulum endoplasmique à la membrane plasmique, leur stabilisation subséquente ainsi que la modulation de l'affinité potassique de la pompe (Eakle *et al.*, 1994; Geering *et al.*, 1989; Geering *et al.*, 1996; Jaunin *et al.*, 1993). Il existe trois isoformes de la sous-unité β et c'est la sous-unité β_1 qui est prépondérante dans le rein adulte. Par contre, il a été démontré que pendant le développement du rein, l'ARNm des sous-unité β_1 et β_2 est exprimé de façon similaire, malgré qu'il y ait un niveau faible d'expression protéique de la sous-unité β_1 (Burrow *et al.*, 1999). L'expression génique et protéique de la sous-unité β_2 diminue en fin de gestation tandis que l'expression protéique de la sous-unité β_1 augmente. L'expression protéique de la sous-unité β_2 pendant le développement rénal pourrait expliquer la présence de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ à la membrane apicale à cette période, soulignant l'importance probable de la sous-unité β_1 dans la localisation quasi exclusive à la membrane basolatérale de la pompe pendant la vie post-natale.

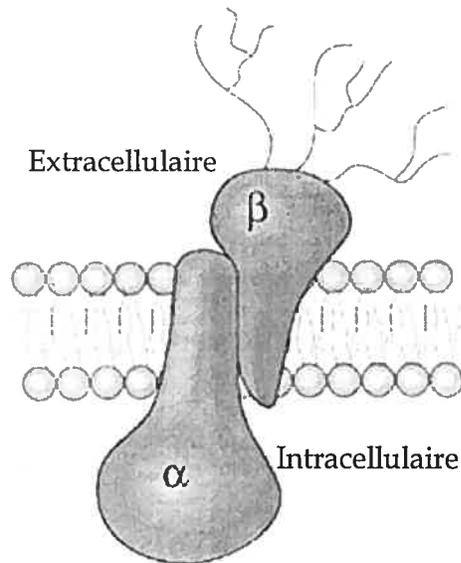


Figure 5. Structure de la pompe $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$.
(Adapté de (Hutson, 2000))

1.4.2 Mécanisme général

Deux conformations différentes existent pour la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, soit les conformations E_1 et E_2 . La conformation E_1 présente une affinité accrue pour ce qui se trouve du côté intracellulaire tandis que la conformation E_2 montre une meilleure affinité pour le K^+ extracellulaire. Selon le modèle Albers-Post (pour une revue (Kaplan, 1985)), c'est à travers des changements de conformation et de phosphorylation que la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ produit son action. Ce modèle est représenté à la figure 6. Tout d'abord, la conformation E_1 permet au Na^+ , au Mg^{++} et à l'ATP de se lier à la pompe. Il s'ensuit alors la phosphorylation de la pompe, séquestrant ainsi le Na^+ . La libération d'adénosine diphosphate (ADP) subséquente provoque le changement de conformation de $E_1\text{-P}$ à $E_2\text{-P}$ ce qui conduit à la relâche du Na^+ et à la liaison du K^+ extracellulaire. Il y a alors déphosphorylation de $E_2\text{-P}$, emprisonnant le K^+ . Le changement de conformation spontané de E_2 à E_1 libère le K^+ à l'intérieur de la cellule, bouclant ainsi le cycle. La ouabaïne, un inhibiteur amplement utilisé *in vitro*, lie la pompe en conformation $E_2\text{-P}$ sur un site extracellulaire. Ceci a comme effet de diminuer l'affinité de la pompe pour le K^+ et donc sa liaison à la pompe, empêchant ainsi la déphosphorylation de la pompe et son changement de conformation de E_2 à E_1 (Feraille & Doucet, 2001).

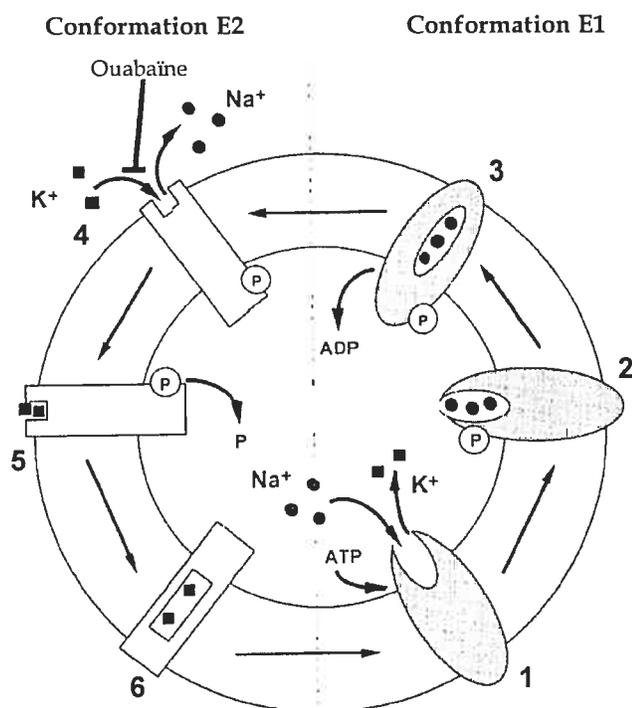


Figure 6. Mécanisme d'action de la pompe $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$.

(Adapté de (Feraille & Doucet, 2001))

1.4.3 Son rôle dans le rein

La $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ joue un rôle primordial dans le rein, comme en fait foi sa grande abondance dans les cellules rénales (environ 50 millions par cellule chez le lapin (el Mernissi & Doucet, 1984)) comparativement aux cellules non-polarisées. La principale fonction de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ rénale est la réabsorption nette de Na^+ . D'ailleurs, l'abondance de la pompe dans la membrane et la capacité de réabsorption sodique des différents segments du néphron ont été directement reliées (Garg *et al.*, 1981). Cependant, elle a aussi un rôle dans le transport secondaire d'autres solutés tels que le glucose ou certains acides aminés (voir figure 7). En effet, la pompe crée un gradient électrochimique favorable à l'entrée de Na^+ dans la cellule qui peut se faire de façon passive en entraînant avec elle d'autres substances. Le mouvement des solutés peut également créer une différence de potentiel qui favorise le transport paracellulaire d'autres substances. Bref, la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ convertit l'énergie métabolique en gradients électrochimiques rapidement mobilisables (Feraille & Doucet, 2001).

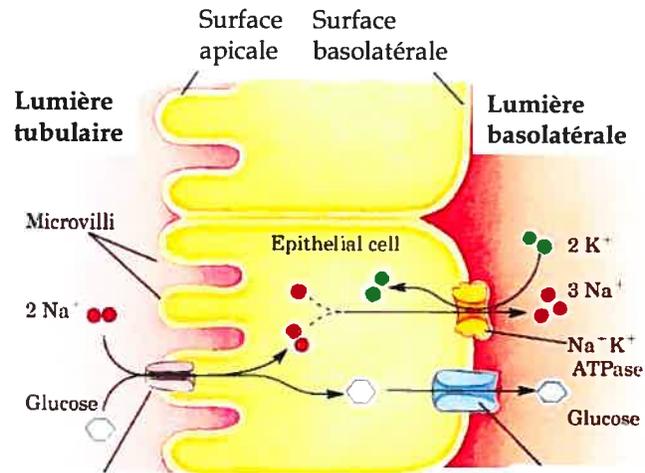


Figure 7. $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ dans une cellule du tubule contourné proximal.
(Adapté de (Department of Biochemistry and Molecular Biophysics The University of Arizona, 2003))

1.4.4 Sa régulation

Par son rôle de pivot dans la réabsorption sodique, la pompe $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ est une cible de prédilection pour différentes voies de régulation. La concentration sodique intracellulaire est un facteur qui influence le degré d'activité de la pompe. Si cette concentration monte, la pompe sera plus active et fera ainsi sortir plus de Na^+ de la cellule ce qui contribuera à rétablir la concentration sodique intracellulaire à une valeur normale. Par le fait même, tout ce qui agit sur l'affinité du Na^+ pour la pompe exerce aussi un pouvoir régulateur sur son activité. En contrepartie, la concentration potassique extracellulaire n'est pas un facteur limitant pour l'activité de la pompe à moins d'une hypokaliémie sévère (Feraille & Doucet, 2001).

La phosphorylation de la sous-unité α de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ est un mécanisme de régulation important, même si son effet réel est souvent contradictoire. Deux voies majeures de signalisation sont impliquées dans ce processus. La première est la modulation de l'activité de l'adénylyl cyclase pour entraîner une perturbation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). Une augmentation de celle-ci conduit à l'activation de la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA). La deuxième voie de signalisation est l'activation de la protéine kinase C (PKC). Lorsque la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ est isolée à partir de la glande rectale de requins et du cortex rénal de rats (total ou dans les membranes basolatérales seulement), la PKA et la PKC inhibent

son activité (Bertorello *et al.*, 1991). Ces résultats sont paradoxaux par rapport à d'autres travaux où les deux protéines kinases stimulent l'activité de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$. L'utilisation du détergent Triton X-100 lors de la purification de la pompe peut toutefois fausser les résultats puisque celui-ci inhibe son activité (Carranza *et al.*, 1996). Dans des cellules intactes de tubules corticaux, par l'addition de deux analogues de l'AMPC ou par l'activation de l'adénylyl cyclase par la forskoline combinée à l'inhibition de phosphodiesterases par la 3-isobutyl-1-méthylxanthine, il a été observé que la PKA stimule l'activité de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ (Carranza *et al.*, 1996). D'autres conditions expérimentales telles que le niveau d'oxygénation pourrait également avoir un effet sur les résultats. De ce fait, dans des cellules de l'anse de Henlé médullaire en présence de forskoline, un agent qui active l'adénylyl cyclase et donc augmente le taux d'AMPC, combinée à la 3-isobutyl-1-méthylxanthine, un inhibiteur des phosphodiesterases, il y a inhibition de l'activité de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ dans des conditions hypoxiques alors que dans des conditions d'oxygénation adéquate, il y a plutôt stimulation de celle-ci (Kiroytcheva *et al.*, 1999). Dans cette étude, l'inhibition de l'activité de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ a par ailleurs été dissociée de la phosphorylation par la PKA. Dans des cellules oxygénées du tubule contourné proximal, l'activation de la PKC stimule l'activité de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ alors qu'une inhibition de celle-ci n'est observée que dans des conditions hypoxiques (Feraille *et al.*, 1995).

Au moins cinq des sept membres d'une famille appelée FXYD interagissent avec la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ et assurent la régulation de sa fonction dans différents tissus (Geering, 2005). Les membres de cette famille sont des petites protéines transmembranaires dont la signature est caractérisée par la présence du motif FXYD, où les acides aminés sont invariants, de deux glycines et d'une sérine conservées (Delprat *et al.*, 2006). La protéine FXYD2, aussi connue sous le nom de sous-unité γ de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, peut s'associer à la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ rénale et ainsi moduler sa fonction. Il a été démontré qu'elle augmente l'affinité apparente de la pompe pour le K^+ lorsqu'il y a un potentiel membranaire fortement négatif, en absence et en présence de Na^+ extracellulaire. L'effet contraire est toutefois observé à des potentiels membranaires moins négatifs, mais seulement en présence de Na^+ extracellulaire. Ceci suggère un transfert de l'équilibre entre les conformations E_1 et E_2 , en faveur de la conformation E_1 (Beguin *et al.*, 2001), tout comme l'augmentation de l'affinité de la pompe pour l'ATP en présence de FXYD2

(Therien *et al.*, 1997;Therien *et al.*, 1999). La protéine FXYD2 augmente également la liaison du K^+ cytoplasmique aux sites intracellulaires de la pompe, entrant ainsi en compétition avec le Na^+ (Pu *et al.*, 2001). Une autre protéine de cette famille, la protéine FXYD4, a été trouvée dans le rein, plus précisément dans les membranes basolatérales des cellules du tubule collecteur médullaire (Capurro *et al.*, 1996;Shi *et al.*, 2001). L'effet global de cette protéine est d'augmenter l'affinité de la pompe pour le Na^+ , ce qui favorise une bonne réabsorption de celui-ci même si sa concentration intracellulaire est faible (Beguïn *et al.*, 2001;Geering, 2005).

1.4.5 Environnement fœtal et ses conséquences sur la pompe sodium-potassium ATP dépendante

Les données concernant la Na^+-K^+ -ATPase dans le contexte d'un environnement fœtal défavorable sont plutôt fragmentaires. Chez les humains, les érythrocytes du cordon ombilical des bébés nés avant terme (moins de 35 semaines de grossesse) présentent une augmentation de l'activité de la Na^+-K^+ -ATPase, mais aucune corrélation n'a pu être établie entre l'âge gestationnel, l'activité de la Na^+-K^+ -ATPase, l'activité de la rénine plasmatique et la concentration plasmatique d'aldostérone (Bistrizter *et al.*, 1999). Dans un modèle animal où les rats sont nés de mères exposées de façon chronique à l'éthanol, l'activité de la Na^+-K^+ -ATPase est diminuée dans le placenta (Fisher *et al.*, 1986). Chez des cochons d'Inde, lorsque la mère est soumise à des conditions hypoxiques pendant la gestation, une diminution de l'activité de la Na^+-K^+ -ATPase dans le cerveau est observée chez la progéniture à terme (60^e jour de gestation) et chez les rats adultes, mais celle-ci demeure inchangée avant terme (50^e jour de gestation) (Mishra & Ivoria-Papadopoulos, 1988). Chez des moutons ayant reçu une injection intramusculaire de bêtaméthasone, un glucocorticoïde de synthèse 40 fois plus puissant que la cortisone, au 126^e jour de gestation, l'activité de la Na^+-K^+ -ATPase rénale est augmentée (Jobe *et al.*, 1996). Toujours dans le rein, chez des rats nés de mères ayant reçu une restriction protéique, une augmentation de l'ARNm codant pour les sous-unités α_1 et β_1 a été observée (Bertram *et al.*, 2001). Quoique incomplètes, ces données ouvrent la voie sur une implication potentielle de la Na^+-K^+ -ATPase dans le développement de conditions pathologiques faisant suite à un environnement fœtal défavorable.

1.5 Métabolisme énergétique

La réabsorption tubulaire des solutés et de l'eau est un processus qui requiert de l'énergie. Considérant que, chez l'humain, environ 180 litres d'ultrafiltrat pénètrent chaque jour dans les tubules et qu'environ 99 % de celui-ci est réabsorbé, le rein doit maintenir un niveau élevé de production énergétique afin de répondre à la demande (Gullans & Hebert, 1996).

La synthèse d'ATP par la mitochondrie constitue la principale source d'énergie métabolique des reins et implique trois étapes différentes. Tout d'abord, des substrats métaboliques, comme le pyruvate ou les acides gras, doivent être oxydés pour produire du nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH) et de la flavine adénine dinucléotide réduite (FADH₂). Ensuite, il y a transfert d'électrons le long de la chaîne respiratoire à partir du NADH et de la FADH₂ jusqu'à l'oxygène (O₂). Cette deuxième étape est couplée à la formation d'un gradient électrochimique transmembranaire de protons (H⁺). La troisième et dernière étape est la diffusion des H⁺ à travers la membrane interne mitochondriale pour mener à la synthèse d'ATP à partir de l'ADP et du phosphate inorganique (Gullans & Mandel, 2000).

1.5.1 Le cycle de Krebs

La première étape de la formation de l'ATP, soit l'oxydation de substrats métaboliques, est accomplie en majorité par le cycle de Krebs. Celui-ci est localisé à l'intérieur de la mitochondrie. Le pyruvate et les acides gras entrent tout d'abord dans la mitochondrie où ils sont oxydés pour former de l'acétylcoenzyme A (acétyl-CoA). Celui-ci est condensé à l'oxaloacétate pour former du citrate au début du cycle. Une série de réactions, illustrées à la figure 8, s'ensuivent afin de régénérer l'oxaloacétate. Au cours de chacun des cycles, une molécule d'acétyl-CoA doit entrer et deux molécules de dioxyde de carbone (CO₂) doivent sortir (Lehninger *et al.*, 1994). Quatre des huit réactions représentent des oxydations où il y a formation de cofacteurs réduits (NADH et FADH₂). L'architecture biochimique du cycle fait en sorte qu'une diminution de l'activité d'une seule enzyme peut diminuer le taux de renouvellement du cycle en entier ou encore détourner un intermédiaire vers d'autres voies métaboliques (Yarian *et al.*, 2006). Le cycle peut également utiliser les intermédiaires qui proviennent des autres voies métaboliques. C'est le cas par

exemple de l'oxaloacétate qui peut provenir de la conversion du pyruvate par l'enzyme pyruvate carboxylase (Pratt & Cornely, 2004). Cette réaction constitue la première étape du processus de gluconéogenèse qui sera discuté plus loin. Le cycle de Krebs subit une régulation à trois étapes différentes, soit lors des réactions catalysées par la citrate synthase, par l'isocitrate déshydrogénase et par l' α -cétoglutarate déshydrogénase.

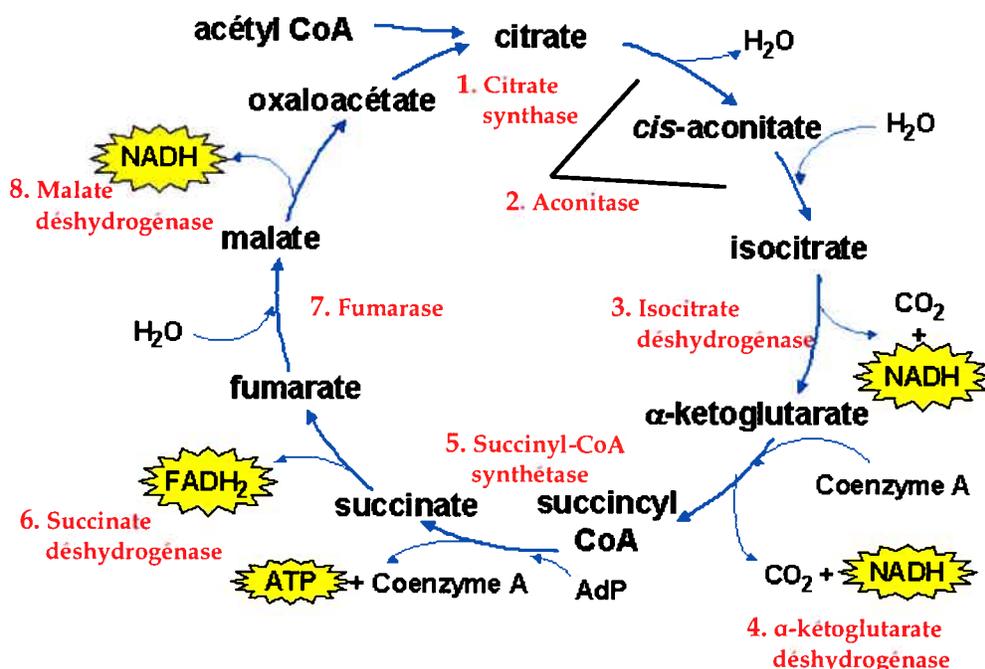


Figure 8. Séquence enzymatique du cycle de Krebs.

(Adapté de (Morin, 2002))

1.5.1.1 La citrate synthase et l'aconitase

La citrate synthase catalyse la première réaction du cycle de Krebs, soit la formation de citrate à partir de la condensation de l'oxaloacétate et de l'acétylCoA (Gullans & Mandel, 2000). Cette réaction est irréversible et fortement exergonique, c'est-à-dire qu'elle dégage de l'énergie. La citrate synthase est inhibée par le citrate, son produit de réaction, par le NADH qui est formé au cours du cycle et par le succinyl-CoA formé à la quatrième étape du cycle (Pratt & Cornely, 2004). Chez des rats ayant subi une ablation des glandes surrénales, l'activité de la citrate synthase augmente trois heures après l'administration d'aldostérone (Law & Edelman, 1978). L'aldostérone, par l'intermédiaire du récepteur aux minéralocorticoïdes, augmente la

synthèse de la citrate synthase. Dans des cellules rénales en culture de tubule collecteur de lapins nouveau-nés, une augmentation croissante de l'activité de la citrate synthase a été observée de une heure à trois heures après un traitement à l'aldostérone. Cette augmentation est toutefois totalement bloquée en présence de spironolactone, un antagoniste de l'aldostérone (Minuth *et al.*, 1989). Il a été proposé que l'augmentation de l'activité de la citrate synthase par l'aldostérone augmente la formation d'ATP et ainsi l'activité de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ (Ullian *et al.*, 2000). Ceci contribuerait à augmenter la réabsorption sodique.

L'aconitase catalyse plutôt une réaction réversible, soit l'isomérisation du citrate en isocitrate (Gullans & Mandel, 2000). À la suite de l'exposition des mitochondries à du peroxyde d'hydrogène, l'activité de l'aconitase ainsi que celle de l' α -cétooglutarate déshydrogénase sont diminuées (Bulteau *et al.*, 2003; Nulton-Persson & Szweda, 2001). Ceci suggère une susceptibilité de ces enzymes aux agents oxydants. L'activité de l'aconitase diminue également avec l'âge (Yarian *et al.*, 2006). Ainsi, à la lumière de ces informations, est-ce qu'un environnement fœtale défavorable pourrait prédisposer au déclin plus rapide de son activité?

1.5.2 La gluconéogenèse

Le glucose est une source d'énergie essentielle pour l'organisme. Celui-ci a donc développé des mécanismes pour optimiser son utilisation, sa conservation et sa formation. Lors d'un jeûne prolongé, où les réserves en glucose peuvent être épuisées, l'organisme fait appel à la gluconéogenèse, aussi appelée néoglucogenèse, qui est le processus par lequel le glucose est formé à partir de substances non glucidiques comme les acides aminés, le lactate ou le glycérol. La gluconéogenèse est stimulée par la parathormone, les catécholamines, l'ang II, les glucocorticoïdes, les hormones thyroïdiennes, la déplétion potassique, le diabète sucré expérimental et le jeûne (Halperin *et al.*, 1982; Kida *et al.*, 1978; Wirthensohn & Guder, 1986). Elle se produit majoritairement dans le foie, mais le rein y participe également. Chez l'humain et le rat, dans certaines circonstances comme dans un contexte de jeûne, d'acidose métabolique ou d'acidocétose diabétique, le rein peut contribuer jusqu'à 50 % de la production de glucose (Kida *et al.*, 1978; Owen *et al.*, 1969). Il existe toutefois des différences appréciables entre les deux organes par rapport à ce processus. La production de glucose dans le foie suit un rythme circadien alors que la

production rénale demeure constante tout au long de la journée (Kida *et al.*, 1978). Le rein et le foie travailleraient ainsi de façon complémentaire afin de maintenir l'homéostasie du glucose dans l'organisme. De plus, le rein fœtal produit du glucose, contrairement au foie foetal (Zorzoli *et al.*, 1969). La gluconéogenèse rénale est restreinte à la partie corticale seulement (Cohen & Kamm, 1981), plus précisément au néphron proximal (Guder & Ross, 1984). La plupart de étapes de la gluconéogenèse, illustrées à la figure 9, constituent les réactions inverses de celles de la glycolyse, où le glucose est converti en pyruvate. Cependant, certaines de ces réactions sont irréversibles et doivent donc suivre une autre voie lors de la gluconéogenèse. Ceci est fait par le biais de quatre enzymes catalysant des étapes limitantes soit la pyruvate carboxylase, la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK), la fructose 1,6-bisphosphatase et la glucose-6-phosphatase.

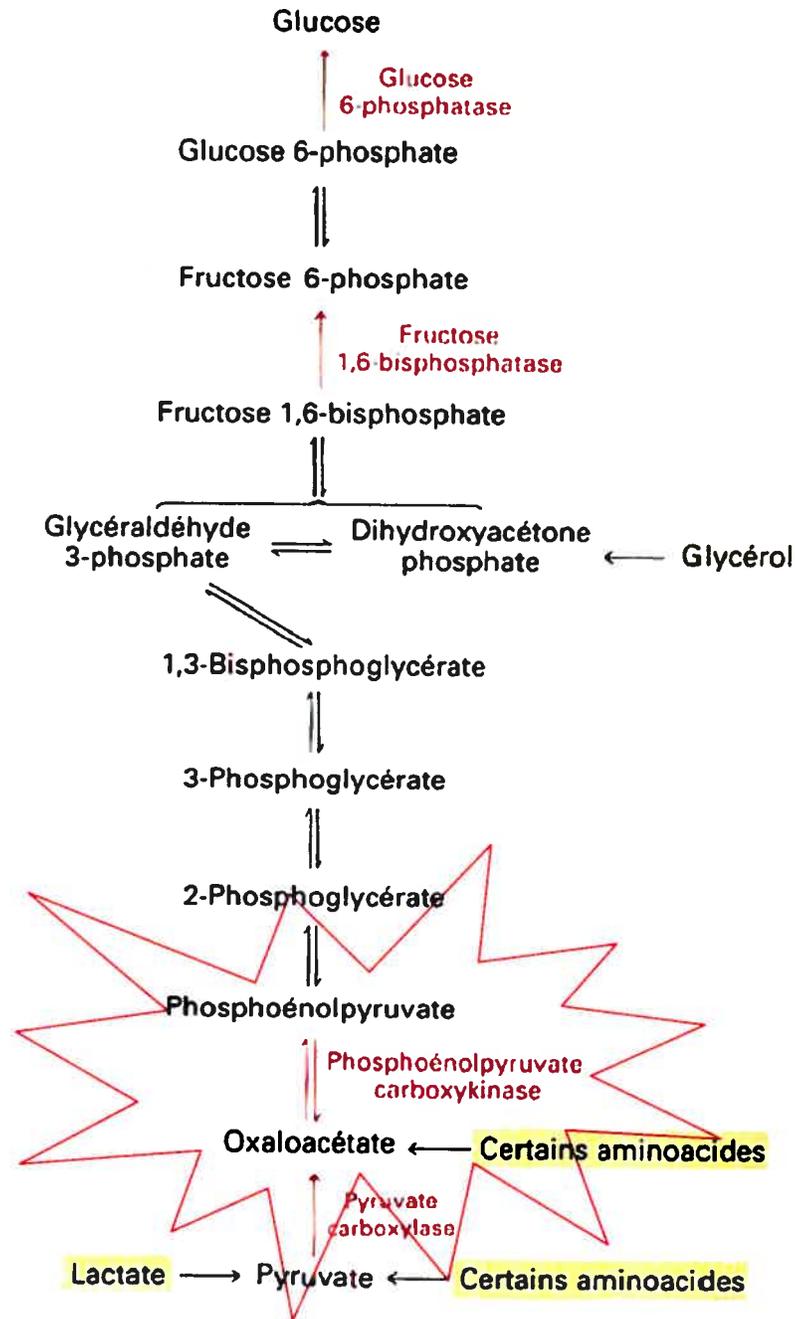


Figure 9. Formation de glucose lors de la gluconéogenèse.

(Adapté de (Département de biologie, 2007))

L'interaction possible entre la gluconéogenèse et le transport du Na^+ est controversée. Lorsque des rats sont traités avec du méthylprednisolone, un glucocorticoïde de synthèse six fois plus puissant que la cortisone, la gluconéogenèse est stimulée alors que la réabsorption sodique n'est pas optimale. Celle-ci est toutefois rétablie à la normale en présence d'un inhibiteur de la gluconéogenèse, le 3-

mercaptopycolinate (Silva *et al.*, 1980). Silva et collègues ont proposé que les deux processus entrent en compétition pour l'utilisation de l'énergie cellulaire (Silva *et al.*, 1980). Dans le même ordre d'idée, la gluconéogenèse est stimulée par une inhibition de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ par la ouabaïne (Friedrichs & Schoner, 1973; Nagami & Lee, 1989). Ces observations sont toutefois contestées par d'autres études qui n'ont pu démontrer de relation réciproque entre le transport de Na^+ et la gluconéogenèse. L'inhibition de la PEPCK n'affecte pas le transport sodique (Gullans *et al.*, 1984) et l'ang II stimule simultanément le transport de Na^+ (Schuster *et al.*, 1984) et la gluconéogenèse (Guder, 1979). La relation entre le transport sodique et la gluconéogenèse semble ainsi beaucoup plus complexe qu'une compétition pour l'énergie. Sous des conditions métaboliques normales, il y aurait suffisamment d'énergie pour les deux processus (Gullans & Hebert, 1996), mais dans le cas d'une acidose métabolique par exemple, le taux de formation de glucose à partir de la glutamine peut devenir limité par le niveau d'utilisation de l'ATP (Halperin *et al.*, 1982).

1.5.2.1 La phosphoénolpyruvate carboxykinase

La PEPCK est une enzyme clé dans le processus de gluconéogenèse dans le foie et dans le rein (Croniger *et al.*, 2002). La PEPCK catalyse la transformation de l'oxaloacétate en phosphoénolpyruvate. L'oxaloacétate est produit dans la mitochondrie à partir du pyruvate par la pyruvate carboxylase ou est synthétisé par la forme cytosolique de la malate déshydrogénase. Il existe deux isoformes différentes de la PEPCK, soit la forme cytosolique (PEPCK-C) et la forme mitochondriale (PEPCK-M). Même si elles sont transcrites par des gènes nucléaires différents, les deux isoformes ont environ le même poids moléculaire et catalysent la même réaction avec des propriétés cinétiques semblables (Hebda & Nowak, 1982; Jomain-Baum & Schramm, 1978; Lee *et al.*, 1981). La distribution tissulaire de ces deux isoformes dépend des espèces. En effet, dans le rein des rats, la PEPCK se distribue en majorité dans le compartiment cytosolique alors que chez les humains, les chiens, les cochons d'Inde et les lapins, la PEPCK rénale se retrouve majoritairement dans la mitochondrie (Schoolwerth *et al.*, 1988). La PEPCK-C est présente dans le rein avant la naissance, mais pas dans le foie (Zorzoli *et al.*, 1969). Pour les deux isoformes, l'activité est modulée par la balance entre leur synthèse et leur dégradation puisque aucun effecteur allostérique n'a été identifié à ce jour. Les deux isoformes se

distinguent entre autres par leur demi-vie (6 à 8 heures pour la PEPCK-C et 48 jours pour la PEPCK-M) et par leur régulation qui se fait davantage par la synthèse dans le cas de la PEPCK-C tandis que pour la PEPCK-M, celle-ci n'est pas sous l'influence d'un contrôle aigu (Hanson & Reshef, 1997). Dans le cortex rénal, les glucocorticoïdes et la balance acido-basique ont une influence sur le taux de transcription du gène de la PEPCK-C (Iynedjian & Hanson, 1977). L'administration de triamcinolone, un glucocorticoïde de synthèse six fois plus puissant que la cortisone, provoque l'augmentation de la synthèse et de l'activité de la PEPCK-C (Iynedjian *et al.*, 1975). Lors d'une acidose métabolique, de l'ammoniaque est produit dans le cortex rénal afin de neutraliser l'urine par la désamination de la glutamine provenant des muscles. Ce processus produit également de l' α -cétoglutarate qui est ensuite converti en glucose, ce qui sollicite la PEPCK et augmente ainsi son activité (Hanson & Reshef, 1997). Lors d'un jeûne, l'activité de la PEPCK-C rénale est augmentée, mais les hormones pancréatiques (insuline et glucagon) ne sont pas impliquées dans le processus comme c'est le cas pour le foie (Tilghman *et al.*, 1976).

1.5.2.2 Environnement fœtal défavorable et gluconéogenèse

L'activité de la PEPCK (Pollak *et al.*, 1979) et le taux de gluconéogenèse (Fatoba *et al.*, 1986) sont diminués dans le foie chez des rats nés de mères dont les artères utérines ont été ligaturées au 17^e jour de gestation. Une relation directe a d'ailleurs été établie entre l'activité de la PEPCK hépatique et le poids de naissance (Pollak *et al.*, 1979). Lorsque l'artère d'une corne utérine seulement est ligaturée chez la rate gestante, les fœtus se trouvant dans cette corne présente, dans le foie, une diminution de l'activité de la fructose-1,6-phosphate par rapport à ceux se trouvant dans l'autre corne et une diminution de l'activité de la pyruvate carboxylase et de la glucose-6-phosphatase par rapport aux témoins (Kollee *et al.*, 1979). L'administration de dexaméthasone, un glucocorticoïde de synthèse 30 fois plus puissant que la cortisone, à des rates lors de la dernière semaine de gestation conduit à une augmentation de l'ARNm et de l'activité de la PEPCK hépatique chez la progéniture adulte (Nyirenda *et al.*, 1998). Une RCIU induite chirurgicalement ou par l'administration de dexaméthasone résulte en une augmentation de l'activité de la PEPCK rénale chez les nouveaux-nés (Levitsky *et al.*, 1986). Ces informations suggèrent une implication

de la gluconéogenèse dans le développement de maladies à l'âge adulte, mais elles demeurent toutefois insuffisantes pour en arriver à une conclusion définitive.

1.6 Facteur de croissance similaire à l'insuline

La croissance et le métabolisme sont sous l'influence de plusieurs systèmes, dont un qui comprend les facteurs de croissance similaires à l'insuline (IGFs), leurs récepteurs (IGFRs) et leurs protéines liantes (IGFBPs). Les actions des IGFs peuvent s'effectuer en tant qu'hormones circulantes ou encore comme facteurs tissulaires locaux agissant de façon paracrine ou autocrine. Dans le sérum, les IGFs (I et II) sont présents en grande concentration, mais sont liés en majorité ($\geq 99\%$) aux IGFBPs. La plupart des IGFs sériques sont liés à l'IGFBP-3 et à une glycoprotéine, formant un complexe de 150 kDa. Ce complexe demeure prisonnier de l'espace intra-vasculaire et constitue ainsi un réservoir d'IGFs. Environ 30% des IGFs sont liés aux autres IGFBPs pour former un complexe d'environ 45 kDa. Celui-ci peut être délivré aux sites de liaison tissulaires (Feld & Hirschberg, 1996). Par contre, pour se lier aux IGFRs, les IGFs doivent être sous forme libre. L'affinité des IGFs pour les IGFRs est environ équivalente à leur affinité pour les IGFBPs. Celles-ci agissent donc comme compétiteurs des IGFRs et assurent la régulation de la biodisponibilité et des actions biologiques des IGFs (Clemmons, 1998). Jusqu'à maintenant, six IGFBPs ont été identifiées (pour une revue, (Feld & Hirschberg, 1996)). Toutes les IGFBPs possèdent des homologies de séquence (Drop *et al.*, 1992) et lient seulement les IGFs. Les IGFBP-1, -3 et -4 lient de façon équivalente les deux types d'IGFs alors que les IGFBP-2, -5 et -6 lient l'IGF-II préférentiellement.

1.6.1 La protéine liante des facteurs de croissance similaires à l'insuline de type 1

L'IGFBP-1 est la première protéine caractérisée de la famille des IGFBPs. Le gène de l'IGFBP-1 est exprimé dans le foie, dans l'endomètre utérin, dans les cellules de la granulosa ovarienne et dans le rein (Lee *et al.*, 1997). Dans le rein, l'expression d'IGFBP-1 et sa localisation diffèrent selon l'espèce étudiée. Chez l'humain, des niveaux très faibles ont été mesurés pendant la néphrogenèse (Matsell *et al.*, 1994) et chez l'adulte, son expression est limitée aux cellules épithéliales pariétales de la capsule glomérulaire (Chin *et al.*, 1994). Chez le rat adulte, son

expression génique est plutôt localisée dans le néphron distal (Price *et al.*, 1995). À la suite d'une insuffisance rénale aiguë provoquée par le chlorure mercurique chez le rat, il y a une baisse de l'ARNm de l'IGF-I conjuguée à une augmentation de celui de l'IGFBP-I. Ceci pourrait expliquer le rétablissement du tissu à la suite de la nécrose tubulaire aiguë provoquée par l'insuffisance rénale (Friedlaender *et al.*, 1995). Lorsque l'insuffisance rénale est induite par l'acide folique, il y a une augmentation de l'expression génique du récepteur à l'IGF-I et des IGFBP-1 et -2 (Hise *et al.*, 1995). Le diurétique furosémide provoque une hypertrophie dans le néphron distal accompagnée d'une augmentation de l'expression protéique d'IGF-I et d'IGFBP-1 sans toutefois qu'il y ait de changement de l'ARNm dans le cas de l'IGF-I. L'IGF-I et l'IGFBP-1 pourraient ainsi être impliqués dans le processus menant à l'hypertrophie tubulaire (Kobayashi *et al.*, 1995a). L'IGF-I, l'hormone de croissance ainsi qu'une diète élevée en protéines diminuent l'expression génique rénale d'IGFBP-1 (Kobayashi *et al.*, 1995b; Chin & Bondy, 1994) tandis que le jeûne et une diète faible en protéines l'augmentent (Nogami *et al.*, 1994; Chin & Bondy, 1994; Lemozy *et al.*, 1994).

1.6.2 Les facteurs de croissance similaires à l'insuline dans le développement rénal

Les IGFs, leurs récepteurs et leurs protéines liantes se retrouvent tous dans le rein. Dans le métanéphros en culture prélevé sur un fœtus de rat de 13 jours, la croissance et le développement sont inhibés par la présence d'anticorps liant l'IGF-I ou l'IGF-II (Rogers *et al.*, 1991). Le blocage du récepteur de l'IGF-I par un oligonucléotide antisens dans le métanéphros en culture conduit à une diminution de la grosseur du rein, à une baisse du nombre de néphrons et à une désorganisation des branches du bourgeon urétéral (Wada *et al.*, 1993). Également, une diminution de l'IGF-I circulant conduit à un déficit du nombre de néphrons (Doublier *et al.*, 2001) et une glomérulosclérose précoce (Doublier *et al.*, 2000).

1.6.3 Les facteurs de croissance similaires à l'insuline et la restriction de croissance intra-utérine

Dans le sang de cordon de fœtus petits pour leur âge gestationnel et ayant souffert d'insuffisance utéroplacentaire, les concentrations d'IGF-I et d'IGFBP-3

sont diminuées (Langford *et al.*, 1994). La concentration sérique d'IGF-I dans le cordon ombilical est diminuée et celle de l'IGFBP-I est augmentée chez des fœtus petits pour leur âge gestationnel par rapport à ceux considérés dans la moyenne pondérale, alors que la concentration de l'IGF-I et de l'IGF-II augmente chez ceux ayant un poids supérieur (Langford *et al.*, 1994; Verhaeghe *et al.*, 1993). Chez les animaux, le plus petit porc d'une portée présente une diminution à la naissance de la concentration de l'IGF-I circulant comparativement à celle des autres animaux de sa portée (Ritacco *et al.*, 1997). Une journée après la ligature bilatérale des artères utérines en fin de gestation, les fœtus petits pour leur âge gestationnel présentent une concentration sérique réduite d'IGF-I et une hausse du taux d'IGFBP-1 circulants (Unterman *et al.*, 1993). D'après ces observations, les IGFs et les IGFBPs pourraient être impliqués dans l'apparition de la RCIU.

1.7 Le système de cytochrome P450

Les cytochromes sont des protéines contenant un groupement hème qui oscille constamment entre sa forme réduite, aussi appelée forme ferreuse (Fe^{2+}), et sa forme oxydée ou forme ferrique (Fe^{3+}) (Horton *et al.*, 1994). Obligatoirement, un seul électron à la fois est transporté par les cytochromes.

Les cytochromes P450 (CYP) sont des oxydases qui catalysent l'oxydation de plusieurs composants exogènes et endogènes. Ils participent à la biotransformation de substances étrangères et à la synthèse des hormones stéroïdiennes, des acides biliaires, des eicosanoïdes et des acides gras insaturés. Les CYP se distribuent de façon ubiquitaire dans les espèces. Ils se retrouvent dans les procaryotes les plus simples jusqu'aux eucaryotes les plus évolués. Les enzymes de ce système se retrouvent en majorité dans le réticulum endoplasmique lisse, mais ils peuvent également se retrouver dans les membranes internes des mitochondries ou dans l'enveloppe nucléaire. Les organes contenant ces enzymes sont principalement le foie, les poumons, les reins et les glandes surrénales (Koolman & Röhm, 1999).

Lors des réactions catalysées par le système de CYP, l'oxygène moléculaire est scindé par une coupure réductrice. Un des deux atomes d'oxygène se lie au substrat alors que le deuxième lie de l'hydrogène pour former une molécule d'eau. Au cours du processus, il y a transfert de deux électrons fournis par le nicotinamide adénine

dinucléotide phosphate (NADPH). Au total, huit étapes, schématisées dans la figure 10, sont nécessaires afin de compléter ces réactions. Tout d'abord, il y a liaison du substrat à l'enzyme pour former un complexe. Il y a ensuite réduction du complexe ferrique par un électron. La troisième étape est la liaison d'une molécule d'oxygène au complexe CYP dioxygéné ferreux. Des espèces superoxydes peuvent être produites à cette étape. Le deuxième électron est transféré lors de la quatrième étape, soit par l'enzyme cytochrome P450 réductase ou par le cytochrome b5. Lors de la cinquième étape, il y a rupture de la liaison entre les deux atomes d'oxygène, conduisant à l'incorporation d'un des atomes d'oxygène pour former une molécule d'eau. Pendant la sixième étape, le substrat est activé. Il y a ensuite transfert du deuxième atome d'oxygène au substrat. Finalement, il y a dissociation suivie de la libération du produit (Biomar.net, 2004).

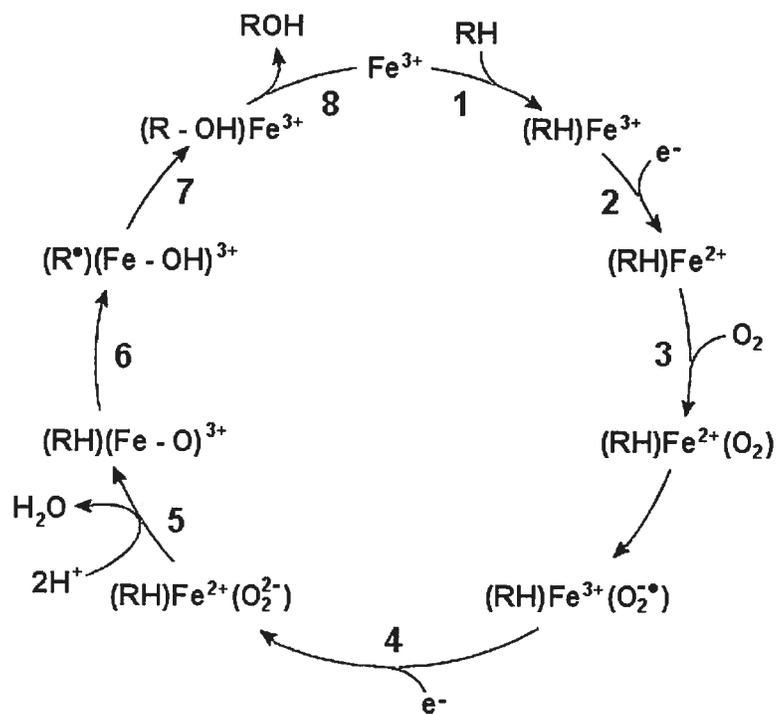


Figure 10. Séquence catalytique de l'insertion d'un atome d'oxygène lors des réactions auxquelles participent les cytochromes P450. La lettre R représente le substrat

(Tiré de (Biomar.net, 2004))

Plusieurs CYP sont inductibles dans le rein et sont impliqués dans la régulation des fonctions physiologiques rénales et la susceptibilité aux agents toxiques (Makita *et al.*, 1996; Nakamura *et al.*, 1994; Zanelli *et al.*, 1996; Zangar *et al.*, 1996). Quelques enzymes responsables de l'oxydation des substances endogènes sont également

impliquées dans celle de xénobiotiques s'attaquant au rein ainsi que de leur toxicité (Pons *et al.*, 1991). Certains produits issus des réactions de ce système altèrent également les fonctions de transport tubulaire (Escalante *et al.*, 1991; Hirt *et al.*, 1989).

1.7.1 Le cytochrome b5

Le cytochrome b5 a une masse moléculaire de 16 kiloDaltons (kDa) et est constituée de deux domaines, soit une queue hydrophobique qui est imbriquée à la membrane du réticulum endoplasmique et un domaine à groupement hème qui est impliqué dans les réactions d'oxydoréduction (Vergeres & Waskell, 1995). L'enzyme NADH cytochrome b5 réductase ou l'enzyme NADPH cytochrome P450 réductase peuvent transférer un électron au cytochrome b5. Celui-ci donne ensuite cet électron à un membre des CYP. Le cytochrome b5 stimule le métabolisme dépendant du système de CYP de certaines substances endogènes comme des prostaglandines (Vatsis *et al.*, 1982), des acides gras (Laethem *et al.*, 1993), des vitamines (Roberts *et al.*, 1992) et des stéroïdes (Onoda & Hall, 1982). En raison du rôle qu'il joue dans le système des CYPs, un défaut au niveau du cytochrome b5 pourrait entraîner des dommages dans la fonction rénale et contribuer au développement de conditions pathologiques suite à un environnement fœtal défavorable.

1.8 Les rétinoïdes

Les rétinoïdes sont des composés structurellement apparentés à l'activité biologique de la vitamine A, celle-ci faisant ainsi partie des rétinoïdes (Lequeu, 1990). Les principaux rétinoïdes sont le rétinol, ou vitamine A₁, le rétinal et l'acide rétinoïque, acide correspondant au rétinol. La vitamine A constitue une composante essentielle de la diète et joue un rôle dans la croissance, la reproduction, la vision et dans le maintien de l'état différencié des cellules épithéliales (Mourey *et al.*, 1993). Le rétinol, l'acide rétinoïque ainsi que d'autres rétinoïdes se lient à des protéines intracellulaires spécifiques qui les entraînent jusqu'au noyau où ils se lient à des récepteurs nucléaires. Les protéines liantes spécifiques et les récepteurs nucléaires des rétinoïdes seraient responsables du transport cellulaire, du métabolisme ainsi que de l'activité biologique de ceux-ci.

Il est maintenant connu que les rétinoïdes influencent le développement rénal en modulant l'expression de gènes spécifiques (Gilbert & Merlet-Benichou, 2000; Schreuder *et al.*, 2006). L'approvisionnement adéquat de vitamine A au fœtus pourrait ainsi être déterminant dans l'acquisition du nombre de néphrons optimal. Une diminution maternelle de 50% de vitamine A circulante pendant la gestation induit une diminution du nombre de néphrons chez la progéniture sans affecter le développement global du fœtus (Lelievre-Pegorier *et al.*, 1998). De plus, le nombre de néphrons est fortement corrélé au taux circulant de vitamine A chez le fœtus.

1.8.1 La protéine liante du rétinol

La protéine liante du rétinol (RBP) est une protéine d'environ 20 kDa qui transporte le rétinol dans le plasma (Whitman *et al.*, 1990). Principalement, la RBP sécrétée dans le plasma est liée au rétinol et interagit avec une autre protéine, la transthyréline (TTR) pour former le complexe RBP-TTR (Smith & Goodman, 1971). La formation de ce complexe stabilise la liaison de la RBP et du rétinol et le rend trop gros pour être filtré lors de la filtration glomérulaire (Lequeu, 1990). La RBP non liée à la TTR est librement filtrée puis en grande partie réabsorbée par le tubule contourné proximal et dégradée (Vahlquist *et al.*, 1973). Une fois que le rétinol a atteint la cellule cible, il lie la protéine liante du rétinol cellulaire (CRBP) à l'aide vraisemblablement d'un récepteur spécifique pour ensuite rejoindre le noyau (Berni *et al.*, 1993). Le foie a longtemps été considéré comme étant le seul site de synthèse de la RBP (Soprano & Blaner, 1994). Par contre, avec l'avènement de nouvelles technologies, il a été possible de démontrer la synthèse de cette protéine par des tissus extra-hépatiques dont le rein (Makover *et al.*, 1989b; Soprano *et al.*, 1986a), le tissu adipeux (Makover *et al.*, 1989b) et le sac vitellin (Makover *et al.*, 1989a; Soprano *et al.*, 1986b). Bien que la synthèse dans ces autres sites ne correspondent qu'à une petite fraction de celle du foie, la quantité totale de RBP synthétisée à l'extérieur du foie pourrait être considérable (Soprano & Blaner, 1994). Dans la plupart des sites extra-hépatiques, la RBP localement synthétisée pourrait entre autres servir au transport du rétinol entre les cellules de ce tissu. Le rôle de la RBP synthétisée dans le foie serait plutôt de transporter le rétinol de son lieu d'entreposage (le foie) jusqu'aux organes cibles.

Dans le cas du rein, en utilisant la technique d'hybridation *in situ*, la présence d'ARNm de RBP a été démontrée dans le troisième segment du tubule contourné proximal, celui-ci étant divisé en trois segments distincts (S₁, S₂ et S₃) (Makover *et al.*, 1989b). La fonction du segment S₃ n'est pas très bien connue, mais ses caractéristiques cellulaires, dont un appareil de Golgi proéminent, laissent penser qu'il pourrait être un site de synthèse active de protéines sécrétoires. Des études d'immunohistochimie ont démontré la présence de RBP et de CRBP dans le tubule contourné proximal, particulièrement dans le segment S₁ (Kato *et al.*, 1984; Usuda *et al.*, 1983). Les cellules des segments S₁ et S₂ possèdent un appareil endocytotique bien développé et une grande quantité de lysosomes, ce qui suggère que ces deux segments correspondent aux sites majeurs de réabsorption et de catabolisme des protéines (Soprano & Blaner, 1994). Il est d'ailleurs suggéré que le segment S₁ est le site de réabsorption et de catabolisme de la RBP, ainsi que de la réabsorption du rétinol. Si le rôle de la RBP synthétisée dans le rein est le recyclage du rétinol réabsorbé par celui-ci, le mécanisme par lequel la RBP synthétisée dans le segment S₃ s'associe au rétinol dans le segment S₁ n'est pas encore connu (Soprano & Blaner, 1994). Ce rôle demeure donc hypothétique et d'autres études sont nécessaires. L'implication des rétinoïdes dans le développement rénal en fait une cible potentielle pour expliquer les désordres rénaux apparaissant à la suite d'un environnement fœtal défavorable.

1.9 Hypothèse de travail

Les maladies de l'âge adulte sont souvent associées à des mauvaises habitudes de vie ou encore à des composantes génétiques. Toutefois, l'émergence d'études sur l'environnement intra-utérin a mis en évidence son importance sur le devenir d'un individu et, donc, sur le développement de maladies au cours de la vie.

Un modèle animal a été développé dans le laboratoire afin d'étudier les mécanismes mis en place lors de la programmation fœtale de maladies apparaissant à l'âge adulte (Battista *et al.*, 2002; Roy-Clavel *et al.*, 1999). Les rates gestantes reçoivent une diète faible en Na⁺ lors de la dernière semaine de gestation, ce qui a comme conséquence de réduire le volume sanguin circulant et la circulation placentaire, et ainsi de diminuer l'apport nutritif maternel au fœtus. À plus long terme, la progéniture montre des perturbations au niveau des systèmes

cardiovasculaire, reproducteur et rénal. Une augmentation des concentrations plasmatiques d'urée et de créatinine suggère une atteinte de la fonction rénale chez les femelles de 12 semaines (Battista *et al.*, 2002). Ceci est d'ailleurs corroboré dans la littérature où plusieurs études ont pu associer la RCIU à des altérations au niveau de cet organe (Hoy *et al.*, 1998b;Langley-Evans *et al.*, 1999;Nwagwu *et al.*, 2000;Vehaskari *et al.*, 2004;Woods *et al.*, 2001). Chez les mâles de 12 semaines, seule la concentration plasmatique d'urée est augmentée. Chez les deux sexes, le nombre de néphrons et l'espace qu'ils occupent dans le rein sont inchangés (Battista *et al.*, 2002). À la lumière de ces informations, l'hypothèse de travail est que des altérations mises en place tôt dans le développement aux niveaux moléculaire et cellulaire pourraient conduire à une atteinte de la fonction rénale chez le rat adulte né de mère ayant reçu une diète faible en sodium.

L'étude a été menée, lorsque possible et pertinent, à trois périodes différentes de la vie du rat, soit chez les fœtus (jour 22 de gestation), chez les animaux immatures (5 semaines de vie) et chez les jeunes adultes (12 semaines de vie) afin de voir l'évolution des paramètres mesurés. Les objectifs de l'étude sont de cribler les gènes pouvant être impliqués dans la dysfonction rénale, de valider les résultats obtenus lors du criblage, de mesurer l'expression protéique et l'activité de la pompe $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase et de mesurer l'activité des enzymes citrate synthase et aconitase afin d'avoir un indice du métabolisme énergétique.

2. ARTICLE

Adverse intrauterine environments: consequences for the kidneys from fetal to adult life

Marie-Eve Gagnon, Sabrina Boukercha and Michèle Brochu

Department of Obstetrics and Gynecology, Université de Montréal and Research Centre, Hôpital Sainte-Justine, Montréal, Québec, Canada

Corresponding author:

Dr. Michèle Brochu

Centre de recherche, Hôpital Sainte-Justine

3175 Côte Ste-Catherine

Montréal, QC, Canada, H3T 1C5

Telephone: 514-345-4931 Extension 5035

Fax: 514-345-4801

e-mail: 

Running title: Renal fetal programming in a rat model

Key words: kidney disorder, developmental plasticity, maternal low-sodium diet, fetal programming

Grants:

CIHR (Canada)

NSERC (Canada)

Reprint requests to corresponding author

Disclosure statement: The authors of this manuscript have nothing to declare.

* Cet article sera soumis à la revue « Endocrinology ». Marie-Eve Gagnon a effectué la majorité des manipulations et du travail de rédaction. Sabrina Boukercha a effectué une partie des PCR chez les mâles. Michèle Brochu est la directrice du laboratoire et a contribué à l'élaboration du projet et à la rédaction de l'article.

Abstract

Genetic components or lifestyle are often perceived to be responsible for the onset of adult diseases, such as hypertension, stroke or type 2 diabetes. According to the fetal programming theory, intrauterine life should be considered as well. In a maternal low-sodium diet model of intrauterine growth restriction (IUGR), renal function alteration (increased plasma urea and creatinine) was previously demonstrated in adult offspring. No morphological change (glomeruli number and area) was found in comparison to control animals. The hypothesis is that impaired renal function is due to altered molecular and cellular mechanisms. Genes differentially expressed between fetuses, 5- and 12-wk IUGR and control females were identified by Affymetrix RU-34A genechip technology. Then, gene-by-gene validation was undertaken for specific genes in the kidneys of both sexes. Subsequently, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ protein expression and activity as well as aconitase and citrate synthase activity were measured. Using stringent criteria ($p < 0.05$ and > 2 -fold change), 36 differentially-expressed genes were identified in IUGR fetus kidneys, 10 in 5-wk and 6 in 12-wk animals. $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ activity was increased in the renal cortex of 5-wk animals and in the renal medulla of 12-wk males. No change was observed for aconitase and citrate synthase activities. Results suggest that in fetuses, adaptation to nutrient deprivation increased glucose metabolism with sodium retention and decreased cell proliferation. Animals at puberty (5 wks) seem to present diminished cell growth in a period of massive changes, and young adults (12 wks) appear to manifest augmented salt retention, which could lead to high blood pressure.

Introduction

Genetic components or lifestyle are often perceived to be responsible for the onset of adult diseases, such as hypertension, stroke or type 2 diabetes. However, a correlation between low birth weight and the risk of dying from ischemic heart diseases was observed in the late 1980s in a cohort of over 5,000 men (1). In Britain, it was demonstrated that systolic blood pressure was inversely related to birth weight in a study population of more than 9,000 10-year-old children and over 3,000 adults (2). These and other epidemiological findings have led to the fetal programming theory, which holds that the intrauterine environment could be implicated in the etiology of adult diseases. The organs are malleable during fetal life, allowing adaptation to surrounding conditions (3). However, adaptations can persist after birth and predispose individuals to adult diseases (4). Animal models of intrauterine growth restriction (IUGR) are powerful tools to study the underlying mechanisms implicated in the development of pathologic conditions later in life.

When the fetus is subject to maternal undernutrition, blood flow is distributed preferentially to the brain and heart, leading to deprivation of other organs such as the kidneys (5). This redistribution of blood flow could impede nephrogenesis or alter renal function. In fact, lower nephron number is seen in human stillbirths resulting from IUGR compared to babies born with normal weight (6). In the presence of fetal growth retardation, the volume of the fetal kidneys is smaller and the hourly fetal urinary production rate is lower than in healthy fetuses (7). The glomerular filtration rate (GFR) of fetuses is also reduced in complicated pregnancies, complications being fetal growth retardation, diabetes, polyhydramnios or anencephaly (8). In an Australian aboriginal population, the urinary albumin/creatinine ratio, a marker of nephropathies, is inversely correlated with birth

weight (9). A higher prevalence of microalbuminuria is associated with low birth weight (10-12).

In the low-protein diet IUGR model, 4-wk-old rats have shorter and wider kidneys with diminished creatinine clearance (13). This is accompanied by increased blood pressure at 4 and 12 wks. At 20 wks, blood urea nitrogen, urinary output and urinary albumin excretion are augmented. In male and female spontaneously hypertensive rats, intrauterine undernutrition decreases the number of nephrons and aggravates hypertension in adulthood (14). The progeny of rats submitted to 50% food restriction in the first half or throughout gestation show a reduced GFR, renal plasma flow and urinary flow compared to controls at 3 months of age (15).

In the laboratory, an animal model was developed in which pregnant rats received a low-sodium diet in the last week of gestation (16). The offspring presented lower body and kidney weights at birth, 1 wk and 12 wks compared to the controls (17). Changes in the plasma concentrations of renin-angiotensin-aldosterone system components were seen with blood pressure elevation in adult IUGR rats of both sexes (17) while left cardiac ventricular remodeling was observed in females (18). Plasma urea was increased in both IUGR males and females, and plasma creatinine levels were augmented in females, suggesting altered renal function. Moreover, urinary sodium was decreased in both sexes, whereas urinary potassium declined only in males (17).

In our model, even though altered renal function is suggested, no changes occur in glomeruli number and area (18). In view of the above, we hypothesized that a maternal low-sodium diet during pregnancy induces molecular and cellular changes

in the offspring that lead to impaired renal function. The objective of the study was to identify genes differentially expressed in IUGR that could result in modulated renal function. This was followed by gene-by-gene validation for specific genes in the renal cortex of IUGR offspring at 3 different ages (fetuses, 5 wks and 12 wks) compared to control rats. Since the gene expression of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ subunits was markedly changed in the IUGR group and because of its implication in sodium reabsorption, the expression and activity of this protein were measured. Reabsorption of solutes and water is a process that requires energy. Renal energetic metabolism was therefore evaluated in IUGR and control rats by measuring the activity of the first two enzymes involved in the tricarboxylic acid (TCA) cycle, citrate synthase and aconitase.

Materials and methods

Animals, experimental design, diet and housing

Experimental procedures were reviewed and approved by the local Animal Care Committee that is accredited by the Canadian Council on Animal Care. Female Sprague-Dawley rats (Charles River Canada, St-Constant, QC, Canada) were obtained, bred and housed as detailed previously (16). Control rats were the offspring of dams maintained on a normal diet containing 0.2% sodium (basal diet 5755; PMI Feed, Ren's Feed and Supplies, Oakville, ON, Canada) and tap water. IUGR rats were the offspring of dams placed on a 0.03% sodium diet (low-sodium diet 5881; PMI Feed) and demineralized water for the last wk of gestation. Some dams and fetuses were sacrificed by decapitation at day 22 of gestation, and fetal kidneys were removed (between 8 H to 9 H AM). Others received normal rat chow (0.23% sodium, Tecklab global 18% protein rodent diet 2018, Harlan Tecklab, Montreal, QC, Canada) and tap water and were sacrificed by decapitation either at 5 or 12 wks of life, and their kidneys were removed. For molecular analysis and TCA cycle enzyme activity assays, tissues were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until used. For Na^+/K^+ -ATPase activity measurement, the kidneys were processed immediately.

Total RNA isolation

Total RNA was extracted from three whole kidneys of fetuses and from about 100 mg of the renal cortex of 5-wk and 12-wk rats with TRIzol reagent (Invitrogen Canada Inc., Burlington, ON, Canada). For microarray assay, tissues were pooled to reduce inter-individual variations and to better characterize the study populations (IUGR vs controls). The kidneys of five animals from different litters were pooled and reduced to powder for RNA extraction. Microarray analysis was

conducted only on females since plasma creatinine level was not increased in males. To confirm the microarray results obtained, renal cortices of 5-10 animals from different litters were reduced separately for RNA extraction, and RT-PCR assays were performed. Both females and males were investigated in order to determine if changes occurring for females are also seen in males.

Gene expression microarray

Gene expression was quantified as described previously(17;19). Fragmented cRNA (15 mg) was hybridized to U34A genechip (Affymetrix, Santa Clara, CA). The microarray was processed in an Affymetrix GeneChip Fluidic Station 400. The results were analyzed as described elsewhere (20). Genes were considered to be present at 95% confidence ($p < 0.05$) for their expression, and differentially expressed when at least a 2-fold (arbitrary cut-off) difference between control and experimental values was evident.

Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR)

For validation of the results obtained from gene expression microarray, RT-PCR was undertaken on triplicate samples from individual animals. Even though microarray analysis was performed only on females, RT-PCR was conducted on both females and males. Four selected genes (cytochrome b5 [cyt b5], insulin-like growth factor-binding protein 1 [IGFBP-1], phosphoenolpyruvate carboxykinase [PEPCK] and retinol-binding protein [RBP]) were validated by RT-PCR. mRNA was analyzed by RT-PCR for four other genes that were not investigated or not differently expressed on microarray (angiotensin II receptor types I and II [AT₁ and AT₂ respectively] and Na⁺-K⁺-ATPase α_1 and β_1), because of their involvement in blood pressure regulation and renal reabsorption. Results were reported for

glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as internal controls. Specific PCR primers were designed by PRIMER3 (www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi), using sequence data from the national centre for biotechnology information (NCBI) database (Table 1).

Single-stranded cDNA was created by reverse transcription (SuperScript™ II RNase H- Reverse Transcriptase, Invitrogen Canada Inc.) from extracted RNA, and PCR (Taq DNA Polymerase, Invitrogen Canada Inc.) was performed according to the procedure detailed by the manufacturer. The annealing step was carried out for 1 min at temperatures previously determined for each gene (PEPCK, 54°C; Na⁺-K⁺-ATPase α₁, 55°C; cyt b5 and GAPDH, 56°C; AT₁, 57°C; Na⁺-K⁺-ATPase β₁, 58°C; AT₂ and RBP, 59°C; and IGFBP-1, 60°C). The extension step was performed at 72°C for 1 min. To ensure that results were collected during the exponential phase, a cycle gradient was established for each gene, and optimal cycle number was established (22 for GAPDH and Na⁺-K⁺-ATPase β₁, 25 for Na⁺-K⁺-ATPase α₁, 26 for cyt b5 and PEPCK, 30 for AT₁, 31 for IGFBP-1, 32 for RBP, and 36 for AT₁). The PCR products were electrophoresed on 1% agarose gels with further coloration by a solution containing 0.02% ethidium bromide. Amplification products were quantified by Alpha Imager software (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA).

Western blotting of Na⁺-K⁺-ATPase α₁ and β₁

Protein expression of Na⁺-K⁺-ATPase α₁ and β₁ subunits was measured by Western blotting. Because only Na⁺-K⁺-ATPase localized on cell membrane can pump Na⁺ and K⁺ efficiently, membrane fractions were isolated (21) and used for Western blotting. All groups (both sexes; fetuses, 5-wk and 12-wk) were

investigated. One hundred mg of frozen slices from each renal cortex (whole kidneys from fetuses, n = 12 per group) were homogenized in sucrose buffer (pH 7.6) and centrifuged (α_1 , 1,000 g x 5 min and 10,000 g x 10 min; β_1 2,500 g x 15 min), supernatants collected were then ultracentrifuged at 300,000 g x 1 h, and the pellets were resuspended in sample buffer. Protein concentrations were quantified with BioRad Assay kits (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada), and BSA served as standard. Proteins (α_1 , 3 μ g/lane; β_1 , 50 μ g/lane) were separated on SDS-PAGE (α_1 , 7%; β_1 , 15%) and transferred to nitrocellulose membranes (Fisher Scientific, Nepean, ON, Canada). Rat brain microsomal preparations were taken as positive controls (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), and sucrose buffer as negative controls. Membranes were blocked for 1 h with TBS/0.1% Tween 20/5% milk and then incubated with mouse anti- Na^+ - K^+ -ATPase α_1 or β_1 subunit antibodies (Upstate Biotechnology) (α_1 , 1:20,000; β_1 , 1:500) overnight at 4°C. They were washed and incubated with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK) (1:4,000) for 30 min at room temperature. Immunoreactive bands were visualized with the enhanced ECL chemoluminescence detection system (GE Healthcare Biosciences Inc., Montreal, QC, Canada). β -Actin Western blotting on the same membrane was the internal control.

Na^+ - K^+ -ATPase activity assay

Na^+ - K^+ -ATPase activity was assayed by measuring the amount of inorganic phosphate (Pi) liberated from ATP during incubation of the tissue (renal cortex or medulla) homogenates at 37°C. First, the tissues were homogenized in buffer containing 250 mM sucrose, 5 mM EDTA and 20 mM imidazole, and then incubated for 15 min at 4°C. The homogenates were preincubated for 15 min at room

temperature in an equal volume of 2.6 mM SDS solution and then incubated at 37°C for 10 min in either a solution containing 100 mM NaCl, 83.3 mM Tris, 15 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM NaN₃ and 1 mM ouabain or a solution containing all the products cited except for ouabain, which acts as a selective inhibitor of Na⁺-K⁺-ATPase. Then, 30 mM Na₂ATP was added. After 5 min, the enzymatic reaction was terminated by adding 0.025 ml of ice-cold 3.9% HClO₄. The samples were centrifuged at 1,500 g for 15 min at 2°C. The supernatant (200 µl) was added to 400 µl of a coloration solution containing 144 mM FeSO₄.7H₂O, 8 mM (NH₄)₆MO₇O₂₄.4H₂O and 3% H₂SO₄. Absorbance was read at 750 nm to assess Pi production. Na⁺,K⁺-ATPase activity (ouabain-sensitive fraction), calculated as the difference between total ATPase (assayed in the absence of ouabain) and the ouabain-resistant fraction, was expressed in µmol of Pi liberated by 1 mg of tissue during 1 h (µmol/h/mg tissue). Each sample was assayed in triplicate, and the difference between averaged total ATPase and averaged ouabain-resistant ATPase was used in further calculations.

Enzyme assay

Aconitase and citrate synthase activities, the first two enzymes of the TCA cycle, were measured to assess energetic metabolism in each group. Sixty mg of frozen slices from each renal cortex (three whole kidneys for fetuses) were homogenized in 0.1 mM Tris-HCl, 15 mM tricarballic acid solution (pH 7.8), centrifuged at 9,500 g x 10 min at 4°C, and the supernatant collected was immediately processed for enzyme determinations. Citrate synthase activity was quantified at 412 nm with 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid as substrate(22). Aconitase activity was assessed at 340 nm by the formation of NADPH after α-ketoglutarate production from isocitrate (23). Protein concentrations were measured

with the BioRad reagent. Enzyme activities are expressed in units (U) per mg of tissue, where each U is defined as the amount of enzyme catalyzing the conversion of 1 μmol of substrate per min at 37°C. Activities for each enzyme were determined for ten animals of different litters per group.

Statistical analysis

The results are expressed as mean \pm SEM and compared by Student's *t*-test. Significance assumed at $p < 0.05$.

Results

Gene expression

In the microarray assay, genes for which expression was altered by at least 2-fold in the IUGR groups when compared to the controls were grouped by function (Table 2). These differently-expressed genes were mostly found in fetuses. In fact, ten genes related to metabolic enzymes were overexpressed (four genes for carbohydrate metabolism), whereas the expression of genes related to the cellular machinery and signaling was reduced in IUGR fetuses. In 5-wk female rats, the genes involved in cell growth were down-regulated. In 12-wk IUGR female rats, only six mRNAs were differently-expressed compared to the controls; their function were metabolism, ligand-binding or immune response and blood pressure regulation. Gene expression microarray methodology was deployed to screen for gene products that may be implicated in altered renal function. We validated some results with mRNAs from individual animals from at least five different litters of both sexes. Thus, RT-PCR assays were carried out for cyt b5, IGFBP-1, PEPCK and RBP. These genes were chosen in consideration of their role in the kidneys, and since they were the most differentially-expressed between IUGR and control females in one or more age groups. As assessed by microarray, cyt b5 in fetuses was reduced in IUGR females, and RBP was unchanged (Figure 1A). RBP and IGFBP-1 expressions were too low to be quantified in male fetuses. RBP mRNA was increased in 5-wk females (Figure 2A) in contrast to decreased expression seen by microarray. PEPCK, cyt b5, RBP and IGFBP-1 were similar in 12-wk IUGR animals and their controls (Figure 3). RBP expression was below detectable level in 12-wk males.

Gene expressions of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ α_1 and β_1 subunits and of AT_1 and AT_2 receptors were also measured in regard to their involvement in blood pressure

regulation. In fetuses, AT_1 was decreased and Na^+K^+ -ATPase β_1 was increased in IUGR females and Na^+K^+ -ATPase α_1 was increased in both sexes (Figure 4). Na^+K^+ -ATPase α_1 mRNA was also augmented in 5-wk (Figure 5A) and 12-wk IUGR females (Figure 6A) and in 12-wk IUGR males (Figure 6A). Na^+K^+ -ATPase β_1 was diminished in 12-wk animals, and AT_1 was reduced in 12-wk males only (Figure 6B). AT_2 levels were below detectable limit for 5-wk and 12-wk males.

Na^+K^+ -ATPase protein expression and activity

Protein expression and activity were quantified in view of the different mRNA levels of Na^+K^+ -ATPase subunits between IUGR and control animals. In contrast to gene expression, only IUGR female fetuses showed an increase of the α_1 subunit (Figure 7). The level of the β_1 subunit for fetuses was not detectable. Na^+K^+ -ATPase activity was significantly greater in the cortex of 5-wk IUGR females (Figure 8A) and males (Figure 8B) than in their respective controls. In the medulla, Na^+K^+ -ATPase activity was greater in 12-wk IUGR males (Figure 8D).

Enzyme assays

Citrate synthase and aconitase activities were not different between IUGR animals and their controls of both sexes (Figure 9).

Discussion

A previously studied IUGR model induced by a maternal low-sodium diet showed altered renal function (increased plasma urea and creatinine) with smaller kidneys in the progeny compared to the controls. Since no changes in the number and size of glomeruli were seen, we hypothesized that molecular and cellular modulation could explain this phenomenon. To screen for potential genes involved, microarray analysis was undertaken in the female renal cortex (fetuses, 5-wk and 12-wk). We observed that the low-sodium diet given to pregnant rats for the last week of gestation, corresponding to the time of fetal nephrogenesis, induced the differential expression of 36 genes in fetal kidneys, 10 in 5-wk and 6 in 12-wk animals. This suggests that decreased in differential expression occurs with increasing age and that adverse intrauterine environment could have long-term consequences for gene expression.

After microarray analysis and in consideration of their role in the kidneys, four genes were selected for RT-PCR validation. It is important to remember that microarrays are useful for screening differentially-expressed genes, but validation on a gene-by-gene basis and on separate samples is necessary (24;25). However, discrepancies between the results obtained by both methods are often seen. Those discrepancies may be due to the fact that in microarray, the renal cortices are pooled to minimize variability, whereas in RT-PCR, the renal cortex of each animal is analyzed separately. Using Sprague-Dawley rat, an outbred strain, increases the variation between animals and thus, diminish the power to obtain statistical difference. However, it has the advantage to reflect the genetic diversity and heterozygosity found in human populations.

Fetuses

In IUGR fetuses, the expression of genes related to carbohydrate metabolism, such as PEPCK1, solute carrier family 2, fructose-1,6-biphosphatase 1 and aldolase B, was increased compared to the controls. Uterine arcuate artery diameter and placental weight were decreased in mothers on the low-sodium diet (26), indicating reduced placental perfusion and probably diminished transport of nutrients to the fetuses. Hence, the overexpression of these genes in kidney fetuses could suggest adaptation to compensate for decreased nutrients to achieve cell development. Indeed, at this moment, nephrogenesis is in process. Increases in IGFBP-1 mRNA (significant in microarray only) limit IGF-I bioavailability and, thus, cell growth. This is in accordance with the literature where elevated serum IGFBP-1 has been reported in human fetuses small for their gestational age (27;28) and in rats after bilateral uterine ligation (29). At the same time, several genes related to cell proliferation (nuclear transcription factor-Y gamma, cyclin L1, WD repeat domain 39 and core-binding factor beta) are down-regulated, and one gene associated with proteolysis is up-regulated (mephrin 1 alpha), whereas one gene connected to protein biosynthesis (ribosomal protein S15) is overexpressed. This suggests a decrease in cell proliferation and maturation to maintain the needs of existing cells.

Cyt b5, which mRNA expression is diminished in microarray and in RT-PCR, is responsible for electron transport and xenobiotic metabolism. Cyt b5 is the second carrier in oxidase reactions catalyzed by monooxygenase cytochrome P450 enzymes (30). Renal cytochromes P450 are important in the maintenance of physiological function, such as salt balance (31), and susceptibility to toxic agents (32). Decreased cyt b5 female fetus mRNA indicates that the monooxygenase system may be impaired.

Overexpression of the renin gene may be due to diminished plasma sodium in fetuses and their mothers (26). AT_1 gene expression is decreased in IUGR female fetuses in RT-PCR. The renin-angiotensin system (RAS) is involved in normal kidney development, in electrolyte balance and in blood pressure control. There are two main receptors of angiotensin II (ANG II), AT_1 and AT_2 , and most ANG II actions are mediated by AT_1 . Moderate maternal protein restriction during pregnancy suppresses the newborn intrarenal RAS, decreases the number of glomeruli and renal function, and increases arterial blood pressure in adulthood (33). By losartan blockade of AT_1 , it was shown that stimulation of renal growth during normal development was mediated by this receptor (34). The same group demonstrated that in newborn Sprague-Dawley rats, blockade of AT_1 induced an arrest in nephrovascular maturation and reduced glomerular size and number with tubular dilatation (35). We have previously reported that there was no change in glomerular size and number in our IUGR model. However, no data are available on nephrovascular maturation and tubular dilatation in our model. Such studies need to be done.

Na^+K^+ -ATPase plays a central role in sodium reabsorption and thus in water and other electrolyte reabsorption. Hence, Na^+K^+ -ATPase is important for the maintenance of blood pressure and electrolyte balance. We investigated both catalytic (α_1) and regulatory (β_1) subunit mRNA expressions by RT-PCR. Genes of the Na^+K^+ -ATPase α_1 and β_1 subunits were increased in IUGR female fetuses, and α_1 was augmented in males as well. As plasma sodium was decreased in IUGR, increased Na^+K^+ -ATPase synthesis could contribute to restore sodium balance to a normal level.

Briefly, fetuses adapt to nutritional deprivation by increasing carbohydrate metabolism and sodium reabsorption, and by reducing cell proliferation.

Puberty

In 5-wk females, genes related to cell growth were down-regulated (IGFBP-5, rat fibroblast growth factor receptor subtype 4, heat shock protein 1 and RAB10). This could have a great impact on later life since females are in the puberty period at 5 wks and are thus submitted to several hormonal, structural and functional changes.

RBP mRNA expression was decreased in IUGR females in microarray, whereas an increase was seen in the same group by RT-PCR. It has been shown that RBP mRNA expression is induced by estrogen in rat kidneys (36). The estrous cycle of females used in our study is not known, thus, discrepancy between the RT-PCR and the microarray results could be due to various estrogen levels in our animals. Little is known about the role of locally-synthesized RBP in the kidneys, but it seems to be implicated in retinol conservation, recycling and reutilization in the body.

Aldose-reductase catalyzes the conversion of glucose to sorbitol, an organic osmolyte in the renal medulla that is involved in urine concentrating mechanism. Aldose-reductase deficiencies lead to diabetes insipidus, as observed in aldose-reductase knockout mice. Urinary sodium, potassium, creatinine and urea are decreased in these mice but are partially rescued by specific aldose-reductase knockin in collecting tubule epithelial cells (37). Moreover, cell shrinkage and apoptosis are observed in the kidneys of the knockout mice. In our model, the

decrease in aldose-reductase in 5-wk IUGR rats could result in apoptosis and to potential kidney damage.

$\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha_1$ mRNA is increased in IUGR females only, whereas there is no change in $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \beta_1$ gene expression. However, activity of the pump is higher in the renal cortex in IUGR of both sexes. This suggests long-term adaptation of the kidneys to reabsorb more sodium.

In view of the above, cell growth is inhibited in 5-wk IUGR females in a period where considerable changes occur. These animals could never catch up from the growth delay.

Young adults

12-wk IUGR females, like their 5-wk-counterparts, showed down-regulation of the aldose-reductase gene, in accordance with the diminished urinary sodium already found in these rats (17). ANG-infused rats fed a normal or high-salt diet developed hypertension. An inhibitor of epoxide hydrolase lowered blood pressure in these animals (38). In the present study, epoxide hydrolase mRNA increased in 12-wk IUGR rats, indicating that it could be implicated in the higher blood pressure observed in these animals (17).

As in fetuses and in 5-wk animals, 12-wk females presented an elevation of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \alpha_1$ gene expression. $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase } \beta_1$ mRNA was rather diminished in both sexes with IUGR. Males and females manifested an increase in the activity of this pump. Thus, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ could be implicated in the higher blood pressure as well. However, the decrease in AT_1 receptor mRNA for 12-wk

males is surprising in that it is more likely to favor a decline in blood pressure rather than an elevation. It is important to keep in mind that mRNA is not always perfectly correlated with functional protein, as seen for $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ in our study. The results obtained for 12-wk animals indicate that sodium retention could be involved in the onset of higher blood pressure seen in adult animals.

Aconitase and citrate synthase

Citrate synthase and aconitase activities were similar in IUGR and control animals of all groups. This suggests that energy metabolism by the TCA cycle is probably not affected in IUGR rats. Aconitase is a member of a growing family of $\text{O}_2^{\bullet-}$ -sensitive dehydratases that contains sites of $\text{O}_2^{\bullet-}/\text{O}_2$ toxicity where $\text{O}_2^{\bullet-}$ binding leads to inactivation of the enzyme (39). Its suppression may serve as a useful marker for oxidative stress as we have shown in left cardiac ventricles of 12-wk IUGR females (18). Thus, we can not conclude that oxidative stress is present in kidney. More investigation must be done to confirm.

In conclusion, molecular analysis of the IUGR kidney provides evidence that the mechanisms occurring in early life can lead to disorders in adulthood. We have demonstrated that there are changes in renal glucose metabolism, in cell growth and in sodium retention in the first 12 wks of life of pups born from mothers who received a low-sodium diet in the last week of gestation. These changes could participate in the development of altered renal function. We have also clearly shown an immediate impact of maternal low-sodium diet on the gene expression of fetuses with their long term programming in pubertal animals and young adults.

Acknowledgments

Supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-37902) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. Personnel support was provided by the Sainte-Justine Hospital Foundation to M.E.G.

References

1. **Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ** 1989 Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* 2:577-580
2. **Barker DJ, Osmond C, Golding J, Kuh D, Wadsworth ME** 1989 Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ* 298:564-567
3. **Barker DJ** 2004 Developmental origins of adult health and disease. *J Epidemiol Community Health* 58:114-115
4. **Barker DJ, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, Robinson JS** 1993 Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* 341:938-941
5. **Jensen A, Garnier Y, Berger R** 1999 Dynamics of fetal circulatory responses to hypoxia and asphyxia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 84:155-172
6. **Hinchliffe SA, Lynch MR, Sargent PH, Howard CV, Van VD** 1992 The effect of intrauterine growth retardation on the development of renal nephrons. *Br J Obstet Gynaecol* 99:296-301
7. **Deutinger J, Bartl W, Pfersmann C, Neumark J, Bernaschek G** 1987 Fetal kidney volume and urine production in cases of fetal growth retardation. *J Perinat Med* 15:307-315
8. **Kurjak A, Kirkinen P, Latin V, Ivankovic D** 1981 Ultrasonic assessment of fetal kidney function in normal and complicated pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 141:266-270
9. **Hoy WE, Mathews JD, McCredie DA, Pugsley DJ, Hayhurst BG, Rees M, Kile E, Walker KA, Wang Z** 1998 The multidimensional nature of renal disease: rates and associations of albuminuria in an Australian Aboriginal community. *Kidney Int* 54:1296-1304
10. **Hoy WE, Rees M, Kile E, Mathews JD, McCredie DA, Pugsley DJ, Wang Z** 1998 Low birthweight and renal disease in Australian aborigines. *Lancet* 352:1826-1827
11. **Hoy WE, Rees M, Kile E, Mathews JD, Wang Z** 1999 A new dimension to the Barker hypothesis: low birthweight and susceptibility to renal disease. *Kidney Int* 56:1072-1077
12. **Nelson RG, Morgenstern H, Bennett PH** 1998 Birth weight and renal disease in Pima Indians with type 2 diabetes mellitus. *Am J Epidemiol* 148:650-656
13. **Nwagwu MO, Cook A, Langley-Evans SC** 2000 Evidence of progressive deterioration of renal function in rats exposed to a maternal low-protein diet in utero. *Br J Nutr* 83:79-85

14. **Franco MC, Arruda RM, Fortes ZB, de Oliveira SF, Carvalho MH, Tostes RC, Nigro D** 2002 Severe nutritional restriction in pregnant rats aggravates hypertension, altered vascular reactivity, and renal development in spontaneously hypertensive rats offspring. *J Cardiovasc Pharmacol* 39:369-377
15. **Lucas SR, Costa-Silva VL, Zaladek-Gil F** 1989 Effects of intrauterine undernutrition on the renal function of the progeny. *Braz J Med Biol Res* 22:1303-1306
16. **Roy-Clavel E, Picard S, St-Louis J, Brochu M** 1999 Induction of intrauterine growth restriction with a low-sodium diet fed to pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol* 180:608-613
17. **Battista MC, Oligny LL, St-Louis J, Brochu M** 2002 Intrauterine growth restriction in rats is associated with hypertension and renal dysfunction in adulthood. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283:E124-E131
18. **Battista MC, Calvo E, Chorvatova A, Comte B, Corbeil J, Brochu M** 2005 Intra-uterine growth restriction and the programming of left ventricular remodelling in female rats. *J Physiol* 565:197-205
19. **Vasseur S, Malicet C, Calvo EL, Labrie C, Berthezene P, Dagorn JC, Iovanna JL** 2003 Gene expression profiling by DNA microarray analysis in mouse embryonic fibroblasts transformed by rasV12 mutated protein and the E1A oncogene. *Mol Cancer* 2:19
20. **Sasik R, Calvo E, Corbeil J** 2002 Statistical analysis of high-density oligonucleotide arrays: a multiplicative noise model. *Bioinformatics* 18:1633-1640
21. **Kang DG, Oh H, Sohn EJ, Hur TY, Lee KC, Kim KJ, Kim TY, Lee HS** 2004 Lithospermic acid B isolated from *Salvia miltiorrhiza* ameliorates ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats. *Life Sci* 75:1801-1816
22. **Nulton-Persson AC, Szweda LI** 2001 Modulation of mitochondrial function by hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 276:23357-23361
23. **Comte B, Vincent G, Bouchard B, Benderdour M, Des RC** 2002 Reverse flux through cardiac NADP(+)-isocitrate dehydrogenase under normoxia and ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:H1505-H1514
24. **Firestein GS, Pisetsky DS** 2002 DNA microarrays: boundless technology or bound by technology? Guidelines for studies using microarray technology. *Arthritis Rheum* 46:859-861
25. **Miron M, Woody OZ, Marcil A, Murie C, Sladek R, Nadon R** 2006 A methodology for global validation of microarray experiments. *BMC Bioinformatics* 7:333
26. **Bedard S, Sicotte B, St-Louis J, Brochu M** 2005 Modulation of body fluids and angiotensin II receptors in a rat model of intra-uterine growth restriction. *J Physiol* 562:937-950

27. **Verhaeghe J, van BR, van HE, Laureys J, Bouillon R, Van Assche FA** 1993 C-peptide, insulin-like growth factors I and II, and insulin-like growth factor binding protein-1 in umbilical cord serum: correlations with birth weight. *Am J Obstet Gynecol* 169:89-97
28. **Langford K, Blum W, Nicolaides K, Jones J, McGregor A, Miell J** 1994 The pathophysiology of the insulin-like growth factor axis in fetal growth failure: a basis for programming by undernutrition? *Eur J Clin Invest* 24:851-856
29. **Unterman TG, Simmons RA, Glick RP, Ogata ES** 1993 Circulating levels of insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF-II, and IGF-binding proteins in the small for gestational age fetal rat. *Endocrinology* 132:327-336
30. **Vergeres G, Waskell L** 1995 Cytochrome b5, its functions, structure and membrane topology. *Biochimie* 77:604-620
31. **Makita K, Falck JR, Capdevila JH** 1996 Cytochrome P450, the arachidonic acid cascade, and hypertension: new vistas for an old enzyme system. *FASEB J* 10:1456-1463
32. **Cummings BS, Zangar RC, Novak RF, Lash LH** 1999 Cellular distribution of cytochromes P-450 in the rat kidney. *Drug Metab Dispos* 27:542-548
33. **Woods LL, Ingelfinger JR, Nyengaard JR, Rasch R** 2001 Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. *Pediatr Res* 49:460-467
34. **Tufro-McReddie A, Johns DW, Geary KM, Dagli H, Everett AD, Chevalier RL, Carey RM, Gomez RA** 1994 Angiotensin II type 1 receptor: role in renal growth and gene expression during normal development. *Am J Physiol* 266:F911-F918
35. **Tufro-McReddie A, Romano LM, Harris JM, Ferder L, Gomez RA** 1995 Angiotensin II regulates nephrogenesis and renal vascular development. *Am J Physiol* 269:F110-F115
36. **Whitman MM, Harnish DC, Soprano KJ, Soprano DR** 1990 Retinol-binding protein mRNA is induced by estrogen in the kidney but not in the liver. *J Lipid Res* 31:1483-1490
37. **Yang JY, Tam WY, Tam S, Guo H, Wu X, Li G, Chau JF, Klein JD, Chung SK, Sands JM, Chung SS** 2006 Genetic restoration of aldose reductase to the collecting tubules restores maturation of the urine concentrating mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol* 291:F186-F195
38. **Imig JD, Zhao X, Zaharis CZ, Olearczyk JJ, Pollock DM, Newman JW, Kim IH, Watanabe T, Hammock BD** 2005 An orally active epoxide hydrolase inhibitor lowers blood pressure and provides renal protection in salt-sensitive hypertension. *Hypertension* 46:975-981
39. **Hausladen A, Fridovich I** 1994 Superoxide and peroxynitrite inactivate aconitases, but nitric oxide does not. *J Biol Chem* 269:29405-29408

Figure legends

Figure 1: RT-PCR analysis of PEPCK, cyt b5, RBP and IGFBP-1 mRNAs in fetal kidneys from females (A) and males (B). Values are means \pm SEM; n = 5 or 6 animals per group. Results are expressed as a ratio of the gene of interest on GAPDH gene, which acts as an internal control. RBP and IGFBP-1 were undetectable in males. **p < 0.01

Figure 2: RT-PCR analysis of PEPCK, cyt b5, RBP and IGFBP-1 mRNAs in 5-wk kidneys from females (A) and males (B). Values are means \pm SEM; n = 6 or 10 animals per group. Results are expressed as a ratio of the gene of interest on GAPDH gene, which acts as an internal control. ***p < 0.001

Figure 3: RT-PCR analysis of PEPCK, cyt b5, RBP and IGFBP-1 mRNAs in 12-wk kidneys from females (A) and males (B). Values are means \pm SEM; n = 5 or 6 animals per group. Results are expressed as a ratio of the gene of interest on GAPDH gene, which acts as an internal control. RBP was undetectable in males.

Figure 4: RT-PCR analysis of AT₁, AT₂, Na⁺-K⁺-ATPase α_1 and β_1 mRNAs in fetal kidneys from females (A) and males (B). Values are means \pm SEM; n = 5 or 6 animals per group. Results are expressed as a ratio of the gene of interest on GAPDH gene, which acts as an internal control. *p < 0.5, **p < 0.01

Figure 5: RT-PCR analysis of AT₁, AT₂, Na⁺-K⁺-ATPase α_1 and β_1 mRNAs in 5-wk kidneys from females (A) and males (B). Values are means \pm SEM; n = 6 or 10 animals per group. Results are expressed as a ratio of the gene of interest on

GAPDH gene, which acts as an internal control. AT₂ was undetectable in males.

***p < 0.001

Figure 6: RT-PCR analysis of AT₁, AT₂, Na⁺-K⁺-ATPase α₁ and β₁ mRNAs in 12-wk kidneys from females (A) and males (B). Values are means ± SEM; n = 5 or 6 animals per group. Results are expressed as a ratio of the gene of interest on GAPDH gene, which acts as an internal control. AT₂ was undetectable in males.

*p < 0.05, ***p < 0.001

Figure 7: Western blot analysis of Na⁺-K⁺-ATPase α₁ and β₁ protein from the renal cortex of male and female control (■) and IUGR (▲) rats. Representative immunoblot of a 12-wk female (A). Each dot corresponds to the ratio of Na⁺-K⁺-ATPase protein expression on β-actin expression of 1 sample. n = 12 animals per group. α₁ subunit of females (B) and males (C); β₁ subunit of females (D) and males (E). Brain microsomes serve as positive controls and buffer as a negative control. *p < 0.05

Figure 8: Na⁺-K⁺-ATPase activity measurements in the kidneys of male and female control (■) and IUGR (▲) rats. Each dot corresponds to the activity value of 1 sample. n = 12 animals per group. Activity in the cortex of females (A) and males (B); activity in the medulla of females (C) and males (D). *p < 0.05, *** p < 0.001

Figure 9: Results on TCA cycle enzyme activities in control (■) and IUGR (▲) animals. Each dot corresponds to the activity value of 1 sample. n = 10 animals per group. Citrate synthase activity in the renal cortex of females (A) and males (B). Aconitase activity in the renal cortex of females (C) and males (D).

Table 1: Primer designs used for RT-PCR

Gene	FP: Forward Primer (5'→3') RP: Reverse Primer (5'→3')	Size (bp)
AT1	FP : GCTAAGCAGCTCACTCACTAC RP : AACTCTTGACCTCCCATCTC	363
AT2	FP : GAAGGACAACCTCAGTTTTGC RP : CAAGGGGAACTACATAAGATGC	497
Cyt b5	FP : GCACCTGGGTGATCCTACAT RP : TCTCGTGCATCCGTAGAGTG	148
GAPDH	FP : GGTGATGCTGGTGCTGAGTA RP : GGATGCAGGGATGATGTTCT	369
IGFBP-1	FP : TGGATAGCTTCCACCTCATG RP : AGATGTCTCGCACTGTTTGC	257
Na ⁺ -K ⁺ -ATPase α 1	FP : AGATTTGAGCCGAGGCCTAACACC RP : TCCGCCCTTCACCTCCACCAGAT	418
Na ⁺ -K ⁺ -ATPase β 1	FP : TGGAGACTTACCCTCTGACGATG RP : GGCTAGTGGGAAAGATTTGTGC	357
PEPCK	FP : ATACGGTGGGAACTCACTGC RP : GTTATGCCCAGGATCAGCAT	111
RBP	FP : GACAAGGCTCGTTTCTCTGG RP : GGAATACTGCAGAGCGAAGG	312

Table 2: Relative changes in the expression of genes modulated by IUGR in the renal cortex of female rats.

Gene name	Probe set name	Fold change		
		fetus	5-wk	12-wk
Metabolic enzymes related to carbohydrates				
Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1	K03243mRNA_s_at	3.89		-2.09
Solute carrier family 2, member 2	L28135_at	2.95		
Fructose-1,6- biphosphatase 1	M86240_at	2.52		
Aldolase B	rc_AA892395_s_at	2.49		
	X02284_at	2.30		
	X02291exon_s_at	2.11		
Aldose reductase	M60322_g_at		- 10.91	- 2.59
	M60322_at		- 5.70	
Other metabolic enzymes				
3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2	M33648_g_at	4.14		
Kidney-specific protein	AF062389_at	2.61		
Adenylate kinase 3-like 1	rc_AA891949_at	2.42		
UDP-glucuronosyltransferase 1 family, member 1	J02612mRNA_s_at	2.15		
	D83796_s_at	2.06		
Alcohol dehydrogenase 1	M15327_at	2.10		
	X72792cgs_s_at	2.05		
4-Hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase	AF082834_s_at	2.02		
Catechol-O-methyltransferase	M93257_s_at		2.73	
Dopa decarboxylase	M84648mRNA_s_at			- 2.06
Cytochrome P450-related protein				
Cytochrome P450, subfamily 4A, polypeptide 11	M33936_s_at	2.89		
Cytochrome b5	rc_AA945054_s_at	- 4.66		
Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1)	AF056333_s_at			- 2.38
Ligand-binding and carrier				
Solute carrier family 25, member 3	rc_AA818982_at	2.06		
Glycine amidinotransferase (L-arginine:glycine amidinotransferase)	U07971_at	2.06		
Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J member 1	AF081366_s_at	- 2.21		
	AF081365_s_at	- 2.06		
S100 calcium-binding protein A4	X06916_at		- 5.45	
Retinol-binding protein	M10934_s_at		- 3.39	
ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit b, isoform 1	rc_AA799778_at		- 2.69	
Solute carrier family 6, member 19	rc_AA893060_s_at			- 2.13
Cellular machinery and organization				
Ribosomal protein S15	rc_AA892895_i_at	3.12		
Mephrin 1 alpha	S43408_g_at	2.04		
ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein 4	rc_AA892318_at	- 2.33		
Peroxisomal membrane protein 3	X57988mRNA_s_at	- 2.19		
Nuclear transcription factor-Y gamma	rc_AA875121_at	- 2.15		
Dynamin 1-like	AF020210_s_at	- 2.15		
Cyclin L1	AF030091UTR#1_g_at	- 2.14		
WD repeat domain 39	rc_AA891829_at	- 2.05		
MutS homolog 2	rc_AA874919_at	- 2.02		
Core-binding factor beta	AF087437UTR#1_s_at	- 2.01		
Immune response and blood pressure regulation				
Renin 1	S60054_s_at	2.98		
Complement component 4a	U42719_at	2.28		
MHC class I antigen gene	AF074609mRNA_f_at	- 2.35		
Cytosolic epoxide hydrolase	X60328_at			2.21
	X60328_g_at			2.13
Cell growth				
Insulin-like growth factor-binding protein 1	M58634_at	2.51		
Insulin-like growth factor-binding protein 5	rc_A1029920_s_at		- 2.32	
Rat fibroblast growth factor receptor subtype 4	M91599mRNA_g_at		- 2.28	
Heat shock 27 kDa protein 1	rc_AA998683_g_at		- 2.19	
	rc_A1176658_s_at		- 2.07	
Annexin A4	rc_A1171167_at		- 2.14	
RAB10, member RAS oncogene family	rc_AA955306_at		- 2.02	
Signal transduction				
Protein tyrosine phosphatase, receptor type, O	D45412_s_at	2.01		
Activity and neurotransmitter-induced early gene protein 4	AF030089UTR#1_at	- 2.80		
Tyrosine kinase, non-receptor, 2	rc_H31144_g_at	- 2.03		

Values are expressed as fold change in expression in IUGR females when compared to control rats. Genes are considered to be differentially expressed when at least a 2-fold (arbitrary cut-off) difference between control and experimental values is evident.

Figure 1

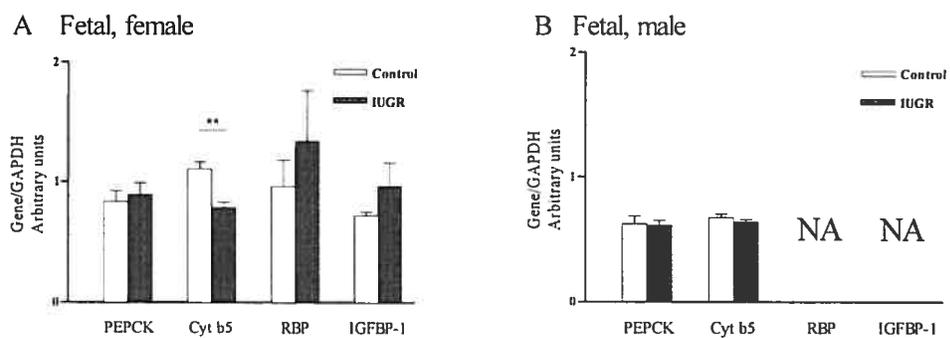


Figure 2

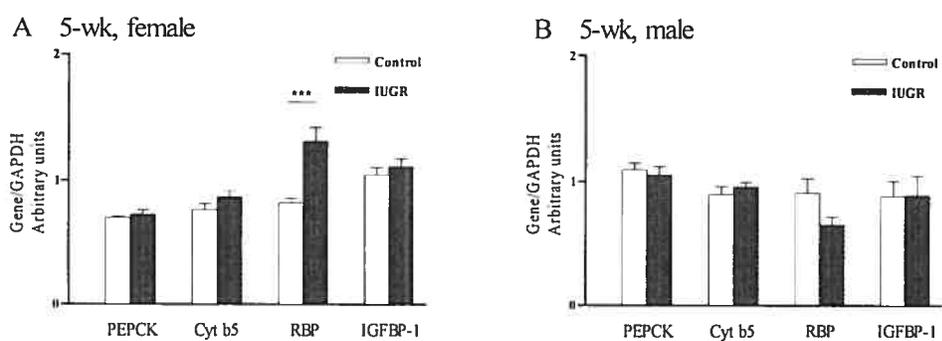


Figure 3

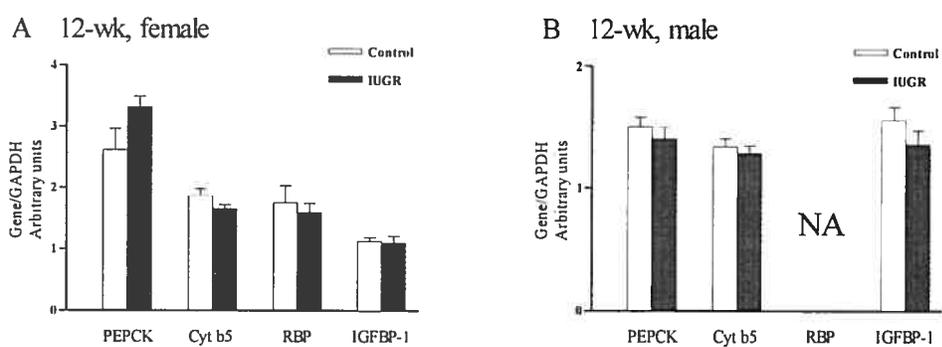


Figure 4

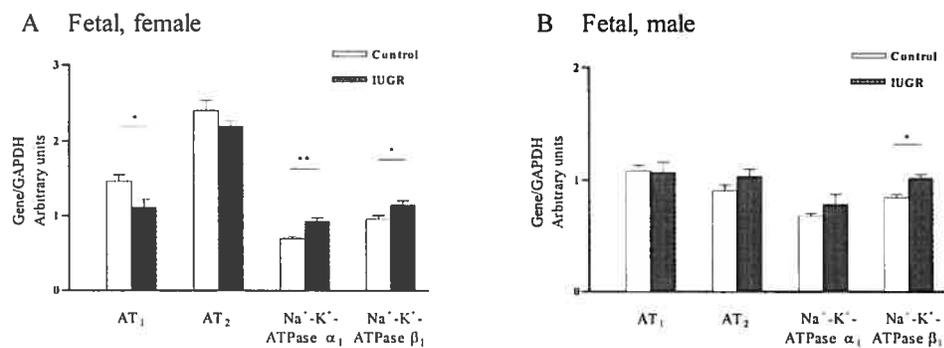


Figure 5

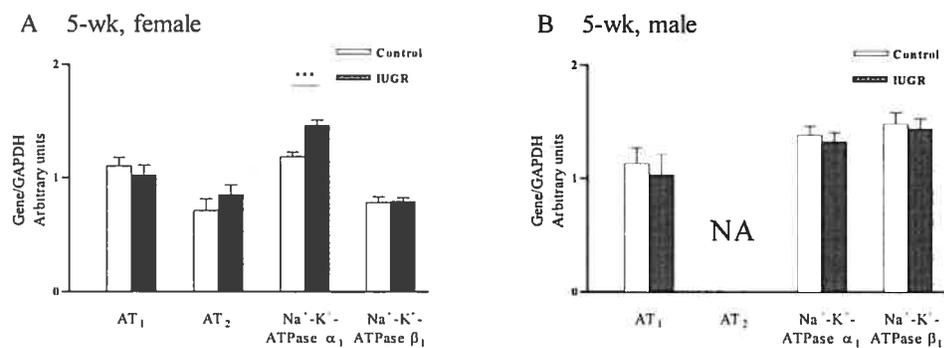


Figure 6

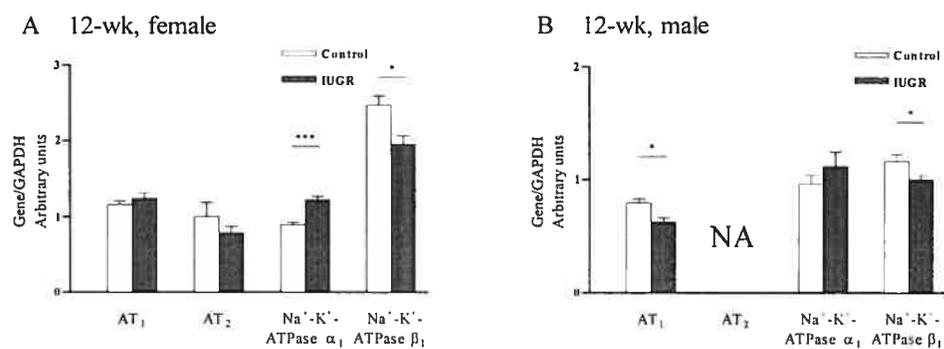
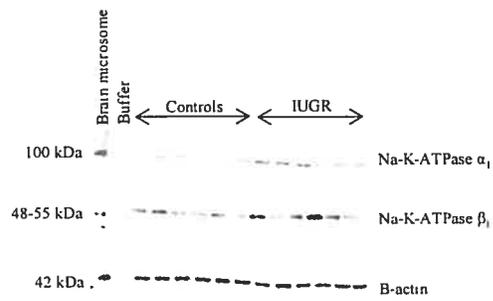
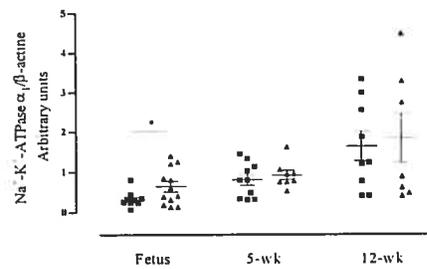


Figure 7

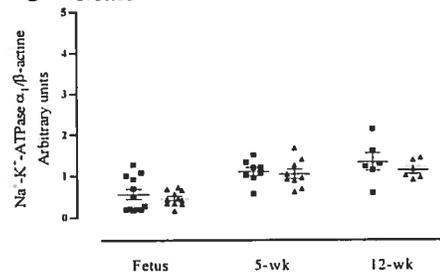
A Representative immunoblot



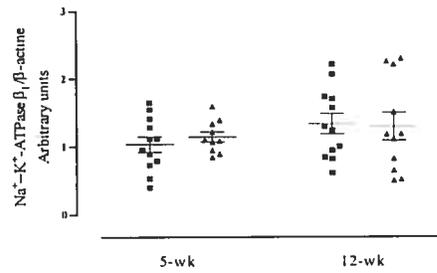
B Female



C Male



D Female



E Male

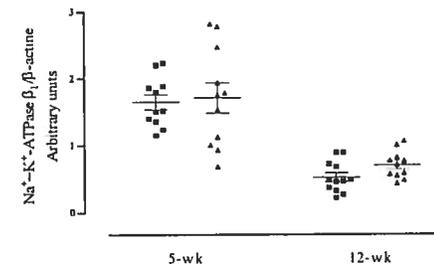


Figure 8

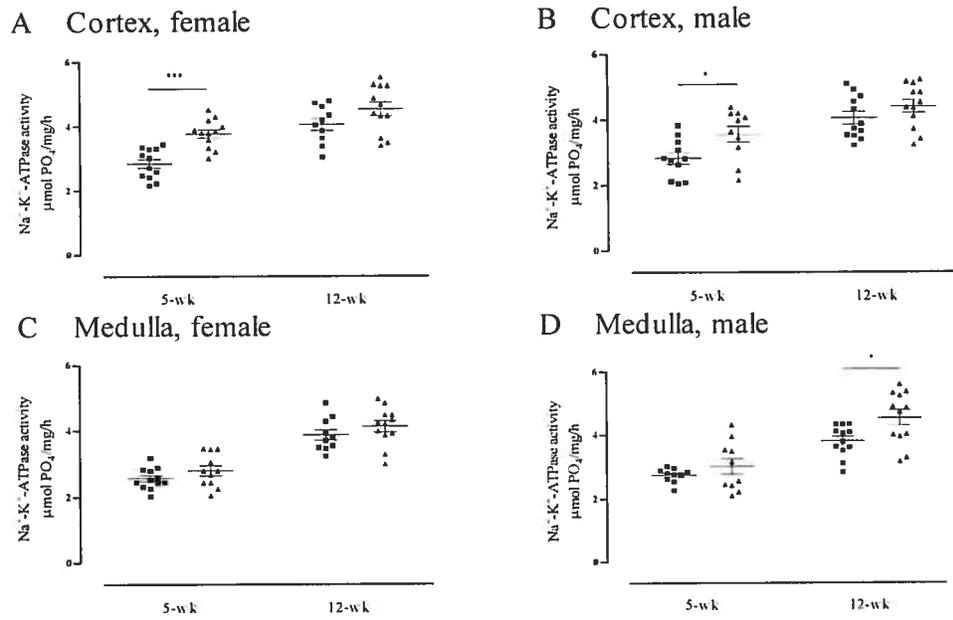
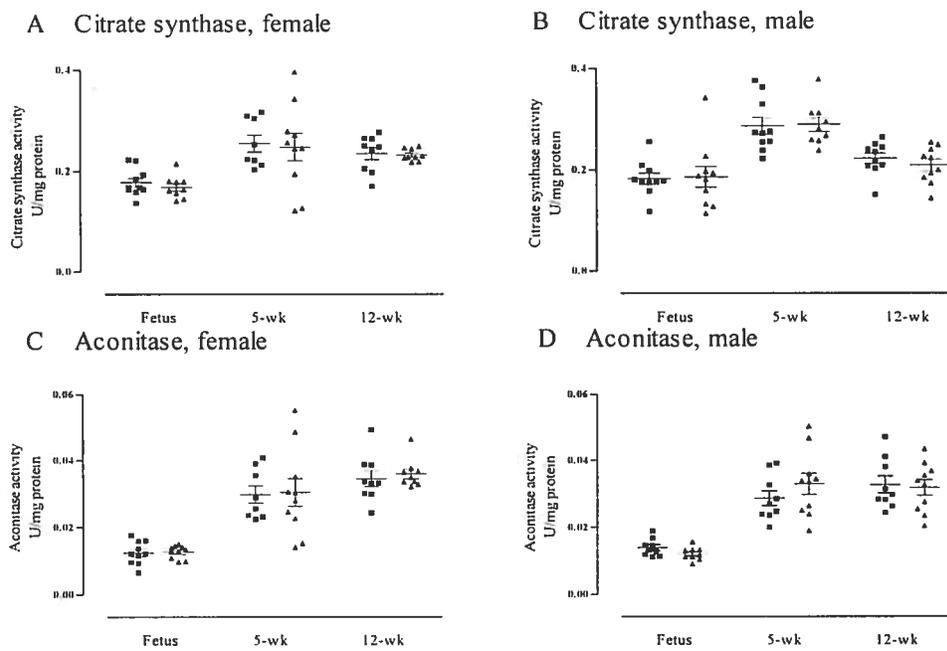


Figure 9



3. DISCUSSION

Puisque les résultats obtenus ont déjà fait l'objet d'une discussion dans l'article, les paragraphes qui suivent amèneront un résumé de l'étude, quelques points complémentaires et quelques perspectives. Des limites de l'étude seront également analysées.

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes moléculaires rénaux ayant un rôle à jouer dans l'apparition de conditions pathologiques à l'âge adulte lorsque l'individu a subi un environnement fœtal défavorable, un criblage génique a été effectué à partir du cortex rénal de rates nées de mères ayant reçu une diète faible en Na^+ lors de la dernière semaine de gestation. Certains gènes dont l'expression est particulièrement différente par rapport à celle des rates témoins ont par la suite fait l'objet d'une validation individuelle. Afin de suivre l'évolution au cours de la vie, ces expérimentations ont été effectuées sur des rats d'âge fœtal, de 5 semaines et de 12 semaines. À la lumière des résultats obtenus, l'étude a été approfondie dans le cas de la pompe $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ pour laquelle l'expression protéique et l'activité ont été mesurées. Finalement, l'activité de l'aconitase et de la citrate synthase, les deux premières enzymes du cycle de Krebs, ont été mesurées afin d'estimer le métabolisme énergétique global. Globalement, les résultats suggèrent que le fœtus s'adapte à la privation de nutriments dans le rein par une augmentation du métabolisme du glucose et de la réabsorption sodique et par une diminution de la prolifération cellulaire, que les animaux à l'âge de la puberté (5 semaines) diminuent leur croissance cellulaire rénale et que les jeunes adultes (12 semaines) augmentent la réabsorption sodique, ce qui pourrait conduire à l'augmentation de pression artérielle déjà mesurée par une étude antérieure (Battista *et al.*, 2002).

Le profil des différences observées lors du criblage génique est très différent d'un groupe d'âge à un autre. Tout d'abord, beaucoup plus de gènes sont différemment exprimés chez les fœtus comparativement aux animaux de 5 et de 12 semaines. Puisque la période du traitement expérimental est à la dernière semaine de gestation, les résultats obtenus chez les fœtus pourraient être directement la conséquence de la diète faible en Na^+ . Cependant, ceux-ci pourraient également être le produit d'une adaptation survenue chez le fœtus pour compenser la diminution de nutriments qui leur est acheminés. Pendant la période de la puberté, soit à 5 semaines, les gènes différemment exprimés chez les fœtus redeviennent semblables aux témoins, mais de nouvelles différences apparaissent. Ceci témoigne d'une adaptation à long terme qui

est présente dans une période de changements massifs pour l'animal. Chez le jeune adulte, les gènes différemment exprimés sont encore une fois moins nombreux et en majorité distincts de ceux qui l'étaient à 5 semaines. Les changements survenant à la suite de la diète maternelle faible en Na^+ ne seraient donc pas statiques, mais évolueraient en même temps que l'animal.

Lors de la validation par la méthode de PCR, plusieurs différences entre les sexes ont été observées. Dans la plupart des cas, la femelle semble plus affectée que le mâle, ce qui est en accord avec les études antérieures et en cours sur le modèle animal de restriction sodique maternelle. Au stade où en est rendue l'étude présente, il est difficile, voire même hasardeux, de tirer des conclusions quant à ces différences relatives au sexe. Des études sur les promoteurs des gènes concernés pourraient être effectuées afin de déterminer s'ils sont sensibles à l'action des hormones stéroïdiennes (la testostérone ou l'œstrogène par exemple) ou encore pour déterminer s'ils sont méthylés de façon différente selon le sexe. Les différences entre les sexes semblent d'ailleurs plus notables dans le cas de l'expression génique que pour l'activité protéique. En effet, même si les augmentations observées dans le cas de l'activité de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ ne sont pas toutes significatives, elles suivent le même profil sans égard au sexe étudié. Ceci est également vrai pour le profil des résultats obtenus pour l'activité de la citrate synthase et de l'aconitase.

L'expression génique de la sous-unité α_1 de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ est augmentée pour les trois groupes d'âge chez les femelles, mais aucun changement à ce niveau n'est observé chez les mâles. Chez des rats ayant une insuffisance rénale aiguë à la suite d'une ischémie, l'ARNm de la sous-unité α_1 de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ et l'activité de la pompe sont augmentés chez les femelles comparativement aux mâles (Fekete *et al.*, 2004). Dans le cas de l'expression génique de la sous-unité β_1 , les différences observées suivent le même modèle pour les deux sexes, soit une augmentation chez les fœtus, aucun changement à 5 semaines et une diminution à 12 semaines. Il a été démontré que les deux sous-unités ne suivent pas toujours le même profil d'expression et qu'elles peuvent être modulées de façon indépendante (Fekete *et al.*, 2004; Pressley *et al.*, 1988).

Puisque l'ARNm des sous-unités de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ a montré plusieurs changements significatifs, l'étude a été complétée par la mesure de l'expression

protéique des sous-unités α_1 et β_1 ainsi que de l'activité de la pompe. Le seul changement observé dans le cas de l'expression protéique est une augmentation de la sous-unité α_1 chez les fœtus femelles. Celle-ci est en accord avec l'augmentation d'ARNm mesurée. Les autres différences obtenues pour l'expression génique n'ont donc pas pu être corroborées, ce qui implique qu'il y a des mécanismes de régulation qui interviennent entre la traduction de la protéine et son insertion dans la membrane. De plus, il semble que le nombre de pompes membranaires ne soit pas toujours le reflet du niveau de pompes fonctionnelles puisque la mesure de l'activité de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ a démontré des augmentations dans le cortex rénal des animaux de 5 semaines. Il est à noter que les reins utilisés pour la mesure de l'expression protéique et pour celle de l'activité proviennent des mêmes animaux. Des augmentations de la pompe à 5 semaines sans changement chez les rats plus vieux ont été mesurées dans des modèles reliés à l'hypertension (Beach & DuBose, Jr., 1990; Garg *et al.*, 1985), témoignant de l'implication probable de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ dans sa pathogenèse. L'activité de la pompe est également augmentée dans la médulla des mâles de 12 semaines, mais ce résultat ne peut pas être relié à l'ARNm et à la protéine puisque ceux-ci ont été mesurés dans le cortex uniquement.

Le premier objectif de l'étude, soit la détermination de gènes susceptibles d'être impliqués dans l'altération rénale, a été accompli à l'aide de micropuces d'ADN. Cette méthode, bien que très utile pour étudier des milliers de gènes à la fois, possède ses limites et il faut être prudent dans l'interprétation des résultats ainsi obtenus. Tout d'abord, l'établissement d'un seuil minimum pour une différence significative est arbitraire et varie selon l'étude. L'analyse statistique des données obtenues ne devrait pas reposer uniquement sur ce seuil arbitraire, mais plutôt sur l'établissement d'une moyenne à partir des données obtenues de plusieurs essais de micropuces indépendants (Firestein & Pisetsky, 2002). Des essais supplémentaires auraient nécessité un budget nettement supérieur et il ne semblait pas primordial de poursuivre en ce sens puisque cette étape ne constitue qu'un outil afin de déterminer des voies possibles pour continuer l'étude. La littérature fait état de la nécessité de valider les résultats obtenus par micropuces d'ADN, préférablement par une méthode où les gènes sont étudiés de façon individuelle et avec des échantillons séparés (Benes & Muckenthaler, 2003; Firestein & Pisetsky, 2002; Miron *et al.*, 2006). Il ne faut pas oublier que dans les essais de micropuces d'ADN, les échantillons provenant de plusieurs animaux sont regroupés ensemble, ne tenant ainsi pas compte de la

variabilité inter-animal. Par contre, la validation possède également ses limites. Même si une augmentation (ou une diminution) est répertoriée par les deux méthodes, il arrive fréquemment qu'elle ne soit pas du même ordre de grandeur, c'est-à-dire qu'elle peut être de 200 % dans un cas et de 300 % dans l'autre. Il faut alors se questionner sur la représentativité de tels résultats. Il est donc impératif de corroborer tout résultat avec une étude plus directe sur la protéine. Pour toutes ces raisons, les micropuces d'ADN effectuées ici constituent seulement la première étape dans l'étude de gènes potentiellement impliqués dans l'altération rénale. D'ailleurs, l'utilisation des micropuces devrait se limiter au criblage génique dans le but d'identifier les meilleures cibles pour des études ultérieures (Firestein & Pisetsky, 2002).

Pour l'étude des gènes de façon indépendante, la technique d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) précédée d'une transcription inverse (RT) a été utilisée. Bien que cette technique ait également ses limites, plusieurs éléments ont été respectés afin d'augmenter la fiabilité de la méthode. Tout d'abord, les échantillons ont été mesurés en triplicata pour chaque gène étudié. Ensuite, malgré que la concentration d'ADN soit supposée être la même entre chaque échantillon, une différence pouvant être apparue lors de la mesure de cette concentration ou encore lors de la RT pourrait fausser les résultats obtenus lors du PCR. Pour s'assurer que tel n'est pas le cas, un contrôle interne a été utilisé, soit le gène de l'enzyme glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) qui est présent de façon ubiquitaire dans les cellules. Les analyses statistiques ont donc été effectuées à partir de la moyenne des triplicatas du gène étudié rapportée sur la moyenne des triplicatas du GAPDH de chaque animal. Aussi, la température optimale d'hybridation des amorces a été déterminée pour chaque gène et plusieurs nombres de cycles différents ont été effectués pour s'assurer que le nombre de cycle choisi corresponde à la phase exponentielle d'amplification et non à la phase de plateau. Bien que la technique de RT-PCR demeure semi-quantitative et qu'elle permette seulement de déterminer un changement possible dans l'expression génique et non son ordre de grandeur avec précision, cette technique s'applique à l'étude présente dans la mesure où celle-ci est exploratoire et permettra de déterminer dans quelle voie poursuivre les études futures.

La totalité des expériences réalisées au cours de cette étude l'ont été sur du tissu total, sans égard aux différents types cellulaires. Or, les reins possèdent plus de 15 types cellulaires distincts ayant différents rôles. Seulement dans le corpuscule rénal, au moins cinq types de cellules sont retrouvés, soit les cellules endothéliales, épithéliales viscérales, mésangiales, épithéliales pariétales et les cellules péripolaires (Tisher & Madsen, 1996). Viennent ensuite les cellules de l'appareil juxtaglomérulaire et les cellules des différents segments du tubule, sans compter les cellules interstitielles qui correspondent à 3% de la fraction occupé par l'interstitium dans le volume cortical, c'est-à-dire de 7 à 9% (Pfaller, 1982). L'hétérogénéité des échantillons étudiés peut mener à des erreurs d'interprétation des résultats ou encore masquer des résultats qui auraient été significatifs si un type cellulaire particulier avait été ciblé. Dans le cas où un gène est exprimé seulement dans un type cellulaire, sa concentration dans le tissu total pourrait être trop faible pour noter un changement appréciable. Par contre, dans le cas où le gène est exprimé dans plusieurs types cellulaires, il peut survenir un changement dans un de ceux-ci sans que son expression soit changée dans les autres, ce qui pourrait mener à masquer un résultat ou encore à l'interpréter de façon erronée. De ce fait, il aurait été intéressant d'isoler les cellules tubulaires et de séparer les différents segments afin de les étudier indépendamment les uns des autres et, plus spécifiquement, le tubule collecteur cortical puisqu'il est un site privilégié dans l'homéostasie du Na^+ et du K^+ et qu'il est sous le contrôle de l'aldostérone et de l'ADH. La mise au point d'une technique d'isolation et de séparation est d'ailleurs en cours présentement dans le laboratoire ce qui permettra d'étudier certains gènes et/ou protéines dans un segment tubulaire particulier.

La souche de rat utilisée dans l'étude n'est pas consanguine, c'est-à-dire que les rats étudiés n'ont pas le même bagage génétique. Cette caractéristique en fait un meilleur reflet d'une population humaine où le matériel génétique peut être très varié d'un individu à l'autre (Hartl, 2001). Par contre, à la différence d'une telle population, les paramètres externes comme la température, la luminosité ou l'humidité sont contrôlés afin que le seul paramètre différent entre les deux groupes d'animaux soit la diète maternelle faible en Na^+ . Ceci permet donc d'associer de façon plus certaine l'environnement fœtal aux variations observées à l'âge adulte. Toutefois, une telle diète ne se trouve pas naturellement chez l'humain et est utilisée seulement comme outil afin de diminuer la perfusion placentaire et ainsi

l'acheminement de nutriments aux fœtus. Cette approche combinée à celles répertoriées dans la littérature (diète restreinte en protéines, ligature des artères utérines, etc.) où des phénotypes similaires apparaissent à l'âge adulte (augmentation de pression artérielle, diabète), permettent d'obtenir une multitude d'informations sur des mécanismes variés pouvant conduire au développement de ces conditions pathologiques. Parmi ceux-ci, certains pourront être identifiés chez l'humain et ainsi amener des pistes de solution.

Afin de poursuivre l'étude présentée dans ce mémoire, plusieurs avenues sont offertes. Premièrement, les mécanismes épigénétiques correspondants aux modifications trouvées par criblage génique et par PCR doivent maintenant être investigués. Ensuite, une étude plus approfondie de la fonction rénale pourrait être effectuée afin de déterminer jusqu'à quel point les reins des animaux RCIU sont affectés. Ceci pourrait entre autres se faire par la mesure de la clairance de l'inuline, une substance qui n'est pas réabsorbée par les glomérules. Aussi, la réabsorption sodique rénale pourrait être mesurée par la mesure de la concentration sodique urinaire à différents temps à la suite d'une injection de salin dans la jugulaire. La tonicité cellulaire le long du tubule rénal pourrait également être mesurée, puisqu'il a été démontré qu'une hypotonie extracellulaire augmente l'influx de Na^+ provoquant ainsi une augmentation du Na^+ intracellulaire et, par le fait même, un recrutement de la $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ à la membrane (Vinciguerra *et al.*, 2004). À la lumière des résultats obtenus lors du criblage génique, des études plus approfondies sur le métabolisme du glucose, en mesurant l'activité des différentes enzymes impliquées par exemple, pourraient être effectuées. Également, l'équilibre entre l'apoptose et la prolifération cellulaire pourrait être mesuré par la méthode de TUNEL et par l'incorporation *in vivo* de la thymidine tritiée, cet équilibre joue en effet un rôle dans le remodelage des tissus (Hamet *et al.*, 2001). Malgré que les résultats sur l'aconitase et la citrate synthase ne démontrent aucun changement, il serait intéressant de mesurer d'autres marqueurs de stress oxydatif, comme le glutathion par exemple. Finalement, les études devraient être effectuées chez des animaux plus âgés, à 20 ou 30 semaines par exemple, puisque les rats de 12 semaines sont considérés comme des jeunes adultes et n'ont pas nécessairement développé totalement les conditions pathologiques. Étudier les animaux plus âgés pourrait donc amener des données supplémentaires et ainsi éclairer davantage sur l'évolution du développement des maladies de l'âge adulte.

L'utilisation d'un modèle où un seul paramètre est modifié, soit l'environnement fœtal, ainsi que l'approche expérimentale (criblage génique, validation et fonction) ont permis de cibler des mécanismes impliqués ou, du moins, associés à l'environnement fœtal défavorable. Bien qu'exploratoire, l'étude présentée dans ce mémoire a permis d'amener des pistes d'investigations futures afin de mieux cibler les recherches. Il a été démontré ici que les changements sont dynamiques et spécifiques au sexe, ce qui confirme les résultats obtenus précédemment par Battista et collègues (Battista *et al.*, 2002; Battista *et al.*, 2005). Également, il a été clairement démontré que des changements dans l'expression génique surviennent, plus particulièrement chez les fœtus, mais également chez les animaux pubères et jeunes adultes. Une meilleure compréhension des mécanismes rénaux impliqués dans le développement des maladies adultes pourrait amener des solutions pour diminuer leur apparition et ainsi contrer ce qui demeure un véritable fléau dans la société actuelle. En effet, l'hypertension à elle seule cause environ 7 millions de décès dans le monde à chaque année, et, au Québec, c'est plus de 1 million de personnes qui souffrent de cette condition pathologique (Grondin, 2005).

4. BIBLIOGRAPHIE

- Aguilera G, Kapur S, Feuillan P, Sunar-Akbasak B, & Bathia AJ (1994). Developmental changes in angiotensin II receptor subtypes and AT1 receptor mRNA in rat kidney. *Kidney Int* **46**, 973-979.
- Barker DJ (2004). Developmental origins of adult health and disease. *J Epidemiol Community Health* **58**, 114-115.
- Barker DJ (1995). Intrauterine programming of adult disease. *Mol Med Today* **1**, 418-423.
- Barker DJ, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, & Robinson JS (1993). Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* **341**, 938-941.
- Battaglia FC & Lubchenco LO (1967). A practical classification of newborn infants by weight and gestational age. *J Pediatr* **71**, 159-163.
- Battista MC, Calvo E, Chorvatova A, Comte B, Corbeil J, & Brochu M (2005). Intrauterine growth restriction and the programming of left ventricular remodelling in female rats. *J Physiol* **565**, 197-205.
- Battista MC, Oligny LL, St-Louis J, & Brochu M (2002). Intrauterine growth restriction in rats is associated with hypertension and renal dysfunction in adulthood. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **283**, E124-E131.
- Bauer R, Walter B, Bauer K, Klupsch R, Patt S, & Zwiener U (2002). Intrauterine growth restriction reduces nephron number and renal excretory function in newborn piglets. *Acta Physiol Scand* **176**, 83-90.
- Bauer R, Walter B, Ihring W, Kluge H, Lampe V, & Zwiener U (2000). Altered renal function in growth-restricted newborn piglets. *Pediatr Nephrol* **14**, 735-739.
- Beach RE & DuBose TD, Jr. (1990). Adrenergic regulation of (Na⁺, K⁺)-ATPase activity in proximal tubules of spontaneously hypertensive rats. *Kidney Int* **38**, 402-408.
- Beers MH, Fletcher AJ, Jones TV, Porter R, Berkwits M, & Kaplan JL. High blood pressure. <http://www.merck.com/mmhe/sec03/ch022/ch022a.html> The merck manual of medical information . 2003.
- Beguin P, Crambert G, Guennoun S, Garty H, Horisberger JD, & Geering K (2001). CHIF, a member of the FXYD protein family, is a regulator of Na,K-ATPase distinct from the gamma-subunit. *EMBO J* **20**, 3993-4002.
- Benes V & Muckenthaler M (2003). Standardization of protocols in cDNA microarray analysis. *Trends Biochem Sci* **28**, 244-249.
- Berni R, Zanotti G, Sartori G, & Monaco HL (1993). Plasma retinol-binding protein and its interaction with transthyretin. In *Retinoids*, eds. Livrea MA & Packer L, pp. 91-102. Marcel Dekker Inc., New York.

- Bertorello AM, Aperia A, Walaas SI, Nairn AC, & Greengard P (1991). Phosphorylation of the catalytic subunit of Na⁺,K⁺-ATPase inhibits the activity of the enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 11359-11362.
- Bertram C, Trowern AR, Copin N, Jackson AA, & Whorwood CB (2001). The maternal diet during pregnancy programs altered expression of the glucocorticoid receptor and type 2 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase: potential molecular mechanisms underlying the programming of hypertension in utero. *Endocrinology* **142**, 2841-2853.
- Biomar.net. Biomarqueurs spécifiques. <http://www.chez.com/biomar/ecotox07.html> . 2004.
- Bistritzer T, Berkovitch M, Rappoport MJ, Evans S, Arieli S, Goldberg M, Tavori I, & Aladjem M (1999). Sodium potassium adenosine triphosphatase activity in preterm and term infants and its possible role in sodium homeostasis during maturation. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **81**, F184-F187.
- Bulteau AL, Ikeda-Saito M, & Szweda LI (2003). Redox-dependent modulation of aconitase activity in intact mitochondria. *Biochemistry* **42**, 14846-14855.
- Burrow CR, Devuyt O, Li X, Gatti L, & Wilson PD (1999). Expression of the beta2-subunit and apical localization of Na⁺-K⁺-ATPase in metanephric kidney. *Am J Physiol* **277**, F391-F403.
- Capurro C, Coutry N, Bonvalet JP, Escoubet B, Garty H, & Farman N (1996). Cellular localization and regulation of CHIF in kidney and colon. *Am J Physiol* **271**, C753-C762.
- Carey RM, Wang ZQ, & Siragy HM (2000). Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. *Hypertension* **35**, 155-163.
- Carranza ML, Feraille E, Kiroytcheva M, Rousselot M, & Favre H (1996). Stimulation of ouabain-sensitive 86Rb⁺ uptake and Na⁺,K⁺-ATPase alpha-subunit phosphorylation by a cAMP-dependent signalling pathway in intact cells from rat kidney cortex. *FEBS Lett* **396**, 309-314.
- Chin E & Bondy CA (1994). Dietary protein-induced renal growth: correlation between renal IGF-I synthesis and hyperplasia. *Am J Physiol* **266**, C1037-C1045.
- Chin E, Michels K, & Bondy CA (1994). Partition of insulin-like growth factor (IGF)-binding sites between the IGF-I and IGF-II receptors and IGF-binding proteins in the human kidney. *J Clin Endocrinol Metab* **78**, 156-164.
- Clemmons DR (1998). Role of insulin-like growth factor binding proteins in controlling IGF actions. *Mol Cell Endocrinol* **140**, 19-24.
- Cohen JJ & Kamm DE (1981). Renal metabolism: relation to renal function. In *The kidney* pp. 144-248.
- Croniger CM, Olswang Y, Reshef L, Kalhan SC, Tilghman SM, & Hanson RW (2002). Phosphoenolpyruvate carboxykinase revisited. *Biochem Mol Bio Educ* **30**, 14-20.

- de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, & Unger T (2000). International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* **52**, 415-472.
- Delprat B, Bibert S, & Geering K (2006). [FXYP proteins: novel regulators of Na,K-ATPase]. *Med Sci (Paris)* **22**, 633-638.
- Département de biologie UdLM. Gluconéogenèse. biologie.univ-mrs.fr/upload/p222/05_GluconeogeneseL3BioCell.pdf . 2007.
- Department of Biochemistry and Molecular Biophysics The University of Arizona. Membrane transport. <http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc462/462a/NOTES/LIPIDS/transport.html> . 2003.
- Desai M, Gayle D, Babu J, & Ross MG (2005). Permanent reduction in heart and kidney organ growth in offspring of undernourished rat dams. *Am J Obstet Gynecol* **193**, 1224-1232.
- Dodic M, May CN, Wintour EM, & Coghlan JP (1998). An early prenatal exposure to excess glucocorticoid leads to hypertensive offspring in sheep. *Clin Sci (Lond)* **94**, 149-155.
- Doublier S, Amri K, Seurin D, Moreau E, Merlet-Benichou C, Striker GE, & Gilbert T (2001). Overexpression of human insulin-like growth factor binding protein-1 in the mouse leads to nephron deficit. *Pediatr Res* **49**, 660-666.
- Doublier S, Seurin D, Fouqueray B, Verpont MC, Callard P, Striker LJ, Striker GE, Binoux M, & Baud L (2000). Glomerulosclerosis in mice transgenic for human insulin-like growth factor-binding protein-1. *Kidney Int* **57**, 2299-2307.
- Drake AJ, Walker BR, & Seckl JR (2005). Intergenerational consequences of fetal programming by in utero exposure to glucocorticoids in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **288**, R34-R38.
- Drop SL, Schuller AG, Lindenbergh-Kortleve DJ, Groffen C, Brinkman A, & Zwarthoff EC (1992). Structural aspects of the IGFBP family. *Growth Regul* **2**, 69-79.
- Eakle KA, Kabalin MA, Wang SG, & Farley RA (1994). The influence of beta subunit structure on the stability of Na⁺/K⁺-ATPase complexes and interaction with K⁺. *J Biol Chem* **269**, 6550-6557.
- el Mernissi G & Doucet A (1984). Quantitation of [3H]ouabain binding and turnover of Na-K-ATPase along the rabbit nephron. *Am J Physiol* **247**, F158-F167.
- Escalante B, Erljij D, Falck JR, & McGiff JC (1991). Effect of cytochrome P450 arachidonate metabolites on ion transport in rabbit kidney loop of Henle. *Science* **251**, 799-802.
- Fatoba IO, Cha CJ, & Oh W (1986). Effect of respiratory acidosis on glucose homeostasis in experimental intrauterine growth retardation in rats. *Early Hum Dev* **13**, 107-114.

- Fekete A, Vannay A, Ver A, Vasarhelyi B, Muller V, Ouyang N, Reusz G, Tulassay T, & Szabo AJ (2004). Sex differences in the alterations of Na(+), K(+)-ATPase following ischaemia-reperfusion injury in the rat kidney. *J Physiol* **555**, 471-480.
- Feld S & Hirschberg R (1996). Growth hormone, the insulin-like growth factor system, and the kidney. *Endocr Rev* **17**, 423-480.
- Feraille E, Carranza ML, Buffin-Meyer B, Rousselot M, Doucet A, & Favre H (1995). Protein kinase C-dependent stimulation of Na(+)-K(+)-ATPase epsilon in rat proximal convoluted tubules. *Am J Physiol* **268**, C1277-C1283.
- Feraille E & Doucet A (2001). Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: hormonal control. *Physiol Rev* **81**, 345-418.
- Firestein GS & Pisetsky DS (2002). DNA microarrays: boundless technology or bound by technology? Guidelines for studies using microarray technology. *Arthritis Rheum* **46**, 859-861.
- Fisher SE, Duffy L, & Atkinson M (1986). Selective fetal malnutrition: effect of acute and chronic ethanol exposure upon rat placental Na,K-ATPase activity. *Alcohol Clin Exp Res* **10**, 150-153.
- Forsyth JS, Reilly J, Fraser CG, & Struthers AD (2004). Angiotensin converting enzyme activity in infancy is related to birth weight. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **89**, F442-F444.
- Fowden AL (1995). Endocrine regulation of fetal growth. *Reprod Fertil Dev* **7**, 351-363.
- Friberg P, Sundelin B, Bohman SO, Bobik A, Nilsson H, Wickman A, Gustafsson H, Petersen J, & Adams MA (1994). Renin-angiotensin system in neonatal rats: induction of a renal abnormality in response to ACE inhibition or angiotensin II antagonism. *Kidney Int* **45**, 485-492.
- Friedlaender M, Popovtzer MM, Weiss O, Nefesh I, Kopolovic J, & Raz I (1995). Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) enhances recovery from HgCl₂-induced acute renal failure: the effects on renal IGF-1, IGF-1 receptor, and IGF-binding protein-1 mRNA. *J Am Soc Nephrol* **5**, 1782-1791.
- Friedrichs D & Schoner W (1973). Stimulation of renal gluconeogenesis by inhibition of the sodium pump. *Biochim Biophys Acta* **304**, 142-160.
- Fuller KE (2000). Low birth-weight infants: the continuing ethnic disparity and the interaction of biology and environment. *Ethn Dis* **10**, 432-445.
- Garg LC, Knepper MA, & Burg MB (1981). Mineralocorticoid effects on Na-K-ATPase in individual nephron segments. *Am J Physiol* **240**, F536-F544.
- Garg LC, Narang N, & McArdle S (1985). Na-K-ATPase in nephron segments of rats developing spontaneous hypertension. *Am J Physiol* **249**, F863-F869.
- Geering K (2005). Function of FXYD proteins, regulators of Na, K-ATPase. *J Bioenerg Biomembr* **37**, 387-392.

Geering K, Beggah A, Good P, Girardet S, Roy S, Schaer D, & Jaunin P (1996). Oligomerization and maturation of Na,K-ATPase: functional interaction of the cytoplasmic NH2 terminus of the beta subunit with the alpha subunit. *J Cell Biol* **133**, 1193-1204.

Geering K, Theulaz I, Verrey F, Hauptle MT, & Rossier BC (1989). A role for the beta-subunit in the expression of functional Na⁺-K⁺-ATPase in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol* **257**, C851-C858.

Gilbert JS, Lang AL, Grant AR, & Nijland MJ (2005). Maternal nutrient restriction in sheep: hypertension and decreased nephron number in offspring at 9 months of age. *J Physiol* **565**, 137-147.

Gilbert T (2002). Vitamin A and kidney development. *Nephrol Dial Transplant* **17 Suppl 9**, 78-80.

Gilbert T & Merlet-Benichou C (2000). Retinoids and nephron mass control. *Pediatr Nephrol* **14**, 1137-1144.

Gomez RA, Lynch KR, Sturgill BC, Elwood JP, Chevalier RL, Carey RM, & Peach MJ (1989). Distribution of renin mRNA and its protein in the developing kidney. *Am J Physiol* **257**, F850-F858.

Gomez RA & Norwood VF (1995). Developmental consequences of the renin-angiotensin system. *Am J Kidney Dis* **26**, 409-431.

Gougoux A (1999a). Réabsorption et sécrétion tubulaires. In *La physiologie du rein et des liquides corporels* pp. 97-108. Gaëtan Morin éditeur, Montréal, Paris, Casablanca.

Gougoux A (1999b). Structure et fonctions des reins. In *La physiologie du rein et des liquides corporels* pp. 55-61. Gaëtan Morin éditeur, Montréal, Paris, Casablanca.

Greene P. The glomerulus.
<http://coe.fgcu.edu/faculty/greenep/kidney/Glomerulus.html> Florida gulf coast university . 2004.

Grondin. L'hypertension artérielle : un fléau non-contrôlé mais contrôlable.
<http://www.rqct.qc.ca/index.php?id=41,101,0,0,1,0> Santé et services sociaux du Québec . 2005.

Guder WG (1979). Stimulation of renal gluconeogenesis by angiotensin II. *Biochim Biophys Acta* **584**, 507-519.

Guder WG & Ross BD (1984). Enzyme distribution along the nephron. *Kidney Int* **26**, 101-111.

Gullans SR, Brazy PC, Dennis VW, & Mandel LJ (1984). Interactions between gluconeogenesis and sodium transport in rabbit proximal tubule. *Am J Physiol* **246**, F859-F869.

Gullans SR & Hebert SC (1996). Metabolic basis of ion transport. In *The kidney*, ed. Brenner BM, pp. 211-246. Saunders, Philadelphia.

Gullans SR & Mandel LJ (2000). Coupling of energy to transport in nephron. In *The kidney. Physiology and pathophysiology*, eds. Seldin DW & Giebisch G, pp. 443-482. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

Guyton AC, Coleman TG, Cowley AV, Jr., Scheel KW, Manning RD, Jr., & Norman RA, Jr. (1972). Arterial pressure regulation. Overriding dominance of the kidneys in long-term regulation and in hypertension. *Am J Med* **52**, 584-594.

Guyton AC & Hall JE (2003a). Transport de substances à travers la membrane cellulaire. In *Précis de physiologie rénale* pp. 44-56. Piccin, Padoue.

Guyton AC & Hall JE (2003b). Formation de l'urine dans les reins: 1. Filtration glomérulaire, débit sanguin rénal et leur contrôle. In *Précis de physiologie médicale* pp. 305-320. Piccin, Padoue.

Halperin ML, Jungas RL, Pichette C, & Goldstein MB (1982). A quantitative analysis of renal ammoniogenesis and energy balance: a theoretical approach. *Can J Physiol Pharmacol* **60**, 1431-1435.

Hamet P, Thorin-Trescases N, Moreau P, Dumas P, Tea BS, deBlois D, Kren V, Pravenec M, Kunes J, Sun Y, & Tremblay J (2001). Workshop: excess growth and apoptosis: is hypertension a case of accelerated aging of cardiovascular cells? *Hypertension* **37**, 760-766.

Hanson RW & Reshef L (1997). Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annu Rev Biochem* **66**, 581-611.

Hartl DL. Genetic management of outbred laboratory rodent populations. www.criver.com Department of Organismic and Evolutionary biology, Harvard University, Cambridge, Massachusetts . 2001.

Hebda CA & Nowak T (1982). Phosphoenolpyruvate carboxykinase. Mn²⁺ and Mn²⁺ substrate complexes. *J Biol Chem* **257**, 5515-5522.

Hilgers KF, Norwood VF, & Gomez RA (1997). Angiotensin's role in renal development. *Semin Nephrol* **17**, 492-501.

Hinchliffe SA, Lynch MR, Sargent PH, Howard CV, & Van VD (1992). The effect of intrauterine growth retardation on the development of renal nephrons. *Br J Obstet Gynaecol* **99**, 296-301.

Hirt DL, Capdevila J, Falck JR, Breyer MD, & Jacobson HR (1989). Cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid are potent inhibitors of vasopressin action on rabbit cortical collecting duct. *J Clin Invest* **84**, 1805-1812.

Hise MK, Li L, Mantzouris N, & Rohan RM (1995). Differential mRNA expression of insulin-like growth factor system during renal injury and hypertrophy. *Am J Physiol* **269**, F817-F824.

Horton HR, Moran LA, Ochs RS, Rawn JD, & Scrimgeour KG (1994). Oxydation phosphorylante. In *Principes de biochimie* pp. 391-411. De Boeck-Wesmael, Bruxelles.

Hoy WE, Mathews JD, McCredie DA, Pugsley DJ, Hayhurst BG, Rees M, Kile E, Walker KA, & Wang Z (1998a). The multidimensional nature of renal disease: rates and associations of albuminuria in an Australian Aboriginal community. *Kidney Int* **54**, 1296-1304.

Hoy WE, Rees M, Kile E, Mathews JD, McCredie DA, Pugsley DJ, & Wang Z (1998b). Low birthweight and renal disease in Australian aborigines. *Lancet* **352**, 1826-1827.

Hoy WE, Rees M, Kile E, Mathews JD, & Wang Z (1999). A new dimension to the Barker hypothesis: low birthweight and susceptibility to renal disease. *Kidney Int* **56**, 1072-1077.

Hutson C. The Na,K-pump and active transport.
<http://www.ttuhschool.edu/som/physiology/Figures/NaKATPase.shtml> Texas tech university health sciences center . 2000.

Ilyedjian PB, Ballard FJ, & Hanson RW (1975). The regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) synthesis in rat kidney cortex. The role of acid-base balance and glucocorticoids. *J Biol Chem* **250**, 5596-5603.

Ilyedjian PB & Hanson RW (1977). Messenger RNA for renal phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP). Its translation in a heterologous cell-free system and its regulation by glucocorticoids and by changes in acid-base balance. *J Biol Chem* **252**, 8398-8403.

Jackson AA (2000). Nutrients, growth, and the development of programmed metabolic function. *Adv Exp Med Biol* **478**, 41-55.

Jansson T, Thordstein M, & Kjellmer I (1986). Placental blood flow and fetal weight following uterine artery ligation. Temporal aspects of intrauterine growth retardation in the guinea pig. *Biol Neonate* **49**, 172-180.

Jaunin P, Jaisser F, Beggah AT, Takeyasu K, Mangeat P, Rossier BC, Horisberger JD, & Geering K (1993). Role of the transmembrane and extracytoplasmic domain of beta subunits in subunit assembly, intracellular transport, and functional expression of Na,K-pumps. *J Cell Biol* **123**, 1751-1759.

Jenks K. The fluid regulation system.
http://www.bway.net/~rjnoonan/humans_in_space/fluid.html Space biomedical research institute . 2002. Raymond J. Noonan.

Jensen A, Garnier Y, & Berger R (1999). Dynamics of fetal circulatory responses to hypoxia and asphyxia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **84**, 155-172.

Jobe AH, Polk DH, Ervin MG, Padbury JF, Rebello CM, & Ikegami M (1996). Preterm betamethasone treatment of fetal sheep: outcome after term delivery. *J Soc Gynecol Investig* **3**, 250-258.

Jomain-Baum M & Schramm VL (1978). Kinetic mechanism of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) from rat liver cytosol. Product inhibition, isotope exchange at equilibrium, and partial reactions. *J Biol Chem* **253**, 3648-3659.

- Jones SE, Nyengaard JR, Flyvbjerg A, Bilous RW, & Marshall SM (2001). Birth weight has no influence on glomerular number and volume. *Pediatr Nephrol* **16**, 340-345.
- Kaplan JH (1985). Ion movements through the sodium pump. *Annu Rev Physiol* **47**, 535-544.
- Kato M, Kato K, & Goodman DS (1984). Immunocytochemical studies on the localization of plasma and of cellular retinol-binding proteins and of transthyretin (prealbumin) in rat liver and kidney. *J Cell Biol* **98**, 1696-1704.
- Kida K, Nakajo S, Kamiya F, Toyama Y, Nishio T, & Nakagawa H (1978). Renal net glucose release in vivo and its contribution to blood glucose in rats. *J Clin Invest* **62**, 721-726.
- Kind KL, Simonetta G, Clifton PM, Robinson JS, & Owens JA (2002). Effect of maternal feed restriction on blood pressure in the adult guinea pig. *Exp Physiol* **87**, 469-477.
- Kingdom JC, Hayes M, McQueen J, Howatson AG, & Lindop GB (1999). Intrauterine growth restriction is associated with persistent juxtamedullary expression of renin in the fetal kidney. *Kidney Int* **55**, 424-429.
- Kingdom JC, McQueen J, Connell JM, & Whittle MJ (1993). Fetal angiotensin II levels and vascular (type I) angiotensin receptors in pregnancies complicated by intrauterine growth retardation. *Br J Obstet Gynaecol* **100**, 476-482.
- Kiroytcheva M, Cheval L, Carranza ML, Martin PY, Favre H, Doucet A, & Feraille E (1999). Effect of cAMP on the activity and the phosphorylation of Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase in rat thick ascending limb of Henle. *Kidney Int* **55**, 1819-1831.
- Kobayashi S, Clemmons DR, Nogami H, Roy AK, & Venkatachalam MA (1995a). Tubular hypertrophy due to work load induced by furosemide is associated with increases of IGF-1 and IGFBP-1. *Kidney Int* **47**, 818-828.
- Kobayashi S, Nogami H, & Ikeda T (1995b). Growth hormone and nutrition interact to regulate expressions of kidney IGF-I and IGFBP mRNAs. *Kidney Int* **48**, 65-71.
- Kollee LA, Monnens LA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Janssen AJ, & van Haard-Hustings H (1979). Gluconeogenic key enzymes in normal and intrauterine growth-retarded newborn rats. *Early Hum Dev* **3**, 345-352.
- Konje JC, Bell SC, Morton JJ, de CR, & Taylor DJ (1996). Human fetal kidney morphometry during gestation and the relationship between weight, kidney morphometry and plasma active renin concentration at birth. *Clin Sci (Lond)* **91**, 169-175.
- Koolman J & Röhm KH (1999). *Atlas de poche de biochimie*, 2ième ed. Médecine-Sciences Flammarion.
- Koupilova I, Leon DA, Lithell HO, & Berglund L (1997). Size at birth and hypertension in longitudinally followed 50-70-year-old men. *Blood Press* **6**, 223-228.

- Lackland DT, Bendall HE, Osmond C, Egan BM, & Barker DJ (2000). Low birth weights contribute to high rates of early-onset chronic renal failure in the Southeastern United States. *Arch Intern Med* **160**, 1472-1476.
- Laethem RM, Balazy M, Falck JR, Laethem CL, & Koop DR (1993). Formation of 19(S)-, 19(R)-, and 18(R)-hydroxyeicosatetraenoic acids by alcohol-inducible cytochrome P450 2E1. *J Biol Chem* **268**, 12912-12918.
- Langford K, Blum W, Nicolaidis K, Jones J, McGregor A, & Miell J (1994). The pathophysiology of the insulin-like growth factor axis in fetal growth failure: a basis for programming by undernutrition? *Eur J Clin Invest* **24**, 851-856.
- Langley-Evans SC, Welham SJ, & Jackson AA (1999). Fetal exposure to a maternal low protein diet impairs nephrogenesis and promotes hypertension in the rat. *Life Sci* **64**, 965-974.
- Law CM & Shiell AW (1996). Is blood pressure inversely related to birth weight? The strength of evidence from a systematic review of the literature. *J Hypertens* **14**, 935-941.
- Law PY & Edelman IS (1978). Induction of citrate synthase by aldosterone in the rat kidney. *J Membr Biol* **41**, 41-64.
- Lee MH, Hebda CA, & Nowak T (1981). The role of cations in avian liver phosphoenolpyruvate carboxykinase catalysis. Activation and regulation. *J Biol Chem* **256**, 12793-12801.
- Lee PD, Giudice LC, Conover CA, & Powell DR (1997). Insulin-like growth factor binding protein-1: recent findings and new directions. *Proc Soc Exp Biol Med* **216**, 319-357.
- Lehninger AL, Cox MM, & Nelson DL (1994). Cycle de l'acide citrique. In *Principes de biochimie* pp. 446-478. Médecine-Sciences, Flammarion, New York.
- Lelievre-Pegorier M, Vilar J, Ferrier ML, Moreau E, Freund N, Gilbert T, & Merlet-Benichou C (1998). Mild vitamin A deficiency leads to inborn nephron deficit in the rat. *Kidney Int* **54**, 1455-1462.
- Lemozy S, Pucilowska JB, & Underwood LE (1994). Reduction of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in protein-restricted rats is associated with differential regulation of IGF-binding protein messenger ribonucleic acids in liver and kidney, and peptides in liver and serum. *Endocrinology* **135**, 617-623.
- Lequeu B (1990). *La vitamine A* Éditions médicales internationales, Paris.
- Levitsky LL, Edidin DV, Menella JA, Spaulding NH, & Hsieh LC (1986). The effect of dexamethasone and surgically induced intrauterine growth retardation on renal and hepatic levels of phosphoenolpyruvate carboxykinase in the rat. *Biol Neonate* **49**, 36-42.
- Lewis RM, Forhead AJ, Petry CJ, Ozanne SE, & Hales CN (2002). Long-term programming of blood pressure by maternal dietary iron restriction in the rat. *Br J Nutr* **88**, 283-290.

- Ma J, Nishimura H, Fogo A, Kon V, Inagami T, & Ichikawa I (1998). Accelerated fibrosis and collagen deposition develop in the renal interstitium of angiotensin type 2 receptor null mutant mice during ureteral obstruction. *Kidney Int* **53**, 937-944.
- Makita K, Falck JR, & Capdevila JH (1996). Cytochrome P450, the arachidonic acid cascade, and hypertension: new vistas for an old enzyme system. *FASEB J* **10**, 1456-1463.
- Makover A, Soprano DR, Wyatt ML, & Goodman DS (1989a). An in situ-hybridization study of the localization of retinol-binding protein and transthyretin messenger RNAs during fetal development in the rat. *Differentiation* **40**, 17-25.
- Makover A, Soprano DR, Wyatt ML, & Goodman DS (1989b). Localization of retinol-binding protein messenger RNA in the rat kidney and in perinephric fat tissue. *J Lipid Res* **30**, 171-180.
- Manalich R, Reyes L, Herrera M, Melendi C, & Fundora I (2000). Relationship between weight at birth and the number and size of renal glomeruli in humans: a histomorphometric study. *Kidney Int* **58**, 770-773.
- Marieb EN (1999). Le système urinaire. In *Anatomie et physiologie humaines* pp. 972-1007. Éditions du renouveau pédagogique inc., Saint-Laurent.
- Matsell DG, Delhanty PJ, Stepaniuk O, Goodyear C, & Han VK (1994). Expression of insulin-like growth factor and binding protein genes during nephrogenesis. *Kidney Int* **46**, 1031-1042.
- Minuth WW, Struck M, Zwanzig M, & Gross P (1989). Action of aldosterone on citrate synthase in cultured renal collecting duct cells. *Ren Physiol Biochem* **12**, 85-95.
- Miron M, Woody OZ, Marcil A, Murie C, Sladek R, & Nadon R (2006). A methodology for global validation of microarray experiments. *BMC Bioinformatics* **7**, 333.
- Mishra OP & Iivoria-Papadopoulos M (1988). Na⁺,K⁺-ATPase in developing fetal guinea pig brain and the effect of maternal hypoxia. *Neurochem Res* **13**, 765-770.
- Morin A. Animaux: Structures et fonctions.
<http://simulium.bio.uottawa.ca/bio2525/notes/Metabolisme.htm> Département de biologie, Université d'Ottawa . 2002.
- Moritz KM, Dodic M, & Wintour EM (2003). Kidney development and the fetal programming of adult disease. *Bioessays* **25**, 212-220.
- Mourey MS, Quadro L, Panariello L, & Colantuoni V (1993). Retinol-binding protein expression and its regulation in liver and cultured cell lines. In *Retinoids*, eds. Livrea MA & Packer L, pp. 129-145. Marcel Dekker Inc., New York.
- Nagami GT & Lee P (1989). Effect of luminal perfusion on glucose production by isolated proximal tubules. *Am J Physiol* **256**, F120-F127.

- Nakamura M, Imaoka S, Miura K, Tanaka E, Misawa S, & Funae Y (1994). Induction of cytochrome P450 isozymes in rat renal microsomes by cyclosporin A. *Biochem Pharmacol* **48**, 1743-1746.
- Nelson RG, Morgenstern H, & Bennett PH (1998). Birth weight and renal disease in Pima Indians with type 2 diabetes mellitus. *Am J Epidemiol* **148**, 650-656.
- Nigam SK, Aperia AC, & Brenner BM (1996). Development and maturation of the kidney. In *The kidney*, ed. Brenner BM, pp. 72-98. Saunders, Philadelphia.
- Nogami H, Watanabe T, & Kobayashi S (1994). IGF-I and IGF-binding protein gene expressions in spontaneous dwarf rat. *Am J Physiol* **267**, E396-E401.
- Norwood VF, Craig MR, Harris JM, & Gomez RA (1997). Differential expression of angiotensin II receptors during early renal morphogenesis. *Am J Physiol* **272**, R662-R668.
- Nulton-Persson AC & Szweda LI (2001). Modulation of mitochondrial function by hydrogen peroxide. *J Biol Chem* **276**, 23357-23361.
- Nusken KD, Warnecke C, Hilgers KF, & Schneider H (2007). Intrauterine growth after uterine artery ligation in rats: dependence on the fetal position in the uterine horn and need for prenatal marking of the animals. *J Hypertens* **25**, 247-248.
- Nwagwu MO, Cook A, & Langley-Evans SC (2000). Evidence of progressive deterioration of renal function in rats exposed to a maternal low-protein diet in utero. *Br J Nutr* **83**, 79-85.
- Nyirenda MJ, Lindsay RS, Kenyon CJ, Burchell A, & Seckl JR (1998). Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring. *J Clin Invest* **101**, 2174-2181.
- Onoda M & Hall PF (1982). Cytochrome b5 stimulates purified testicular microsomal cytochrome P-450 (C21 side-chain cleavage). *Biochem Biophys Res Commun* **108**, 454-460.
- Ortiz LA, Quan A, Weinberg A, & Baum M (2001). Effect of prenatal dexamethasone on rat renal development. *Kidney Int* **59**, 1663-1669.
- Osmond C, Barker DJ, Winter PD, Fall CH, & Simmonds SJ (1993). Early growth and death from cardiovascular disease in women. *BMJ* **307**, 1519-1524.
- Owen OE, Felig P, Morgan AP, Wahren J, & Cahill GF, Jr. (1969). Liver and kidney metabolism during prolonged starvation. *J Clin Invest* **48**, 574-583.
- Pfaller W (1982). Structure function correlation on rat kidney. Quantitative correlation of structure and function in the normal and injured rat kidney. *Adv Anat Embryol Cell Biol* **70**, 1-106.
- Pollak A, Susa JB, Stonestreet BS, Schwartz R, & Oh W (1979). Phosphoenolpyruvate carboxykinase in experimental intrauterine growth retardation in rats. *Pediatr Res* **13**, 175-177.

- Pons C, Dansette PM, Amar C, Jaouen M, Wolf CR, Gregeois J, Homberg JC, & Mansuy D (1991). Detection of human hepatitis anti-liver kidney microsomes (LKM2) autoantibodies on rat liver sections is predominantly due to reactivity with rat liver P-450 IIC11. *J Pharmacol Exp Ther* **259**, 1328-1334.
- Poore KR, Forhead AJ, Gardner DS, Giussani DA, & Fowden AL (2002). The effects of birth weight on basal cardiovascular function in pigs at 3 months of age. *J Physiol* **539**, 969-978.
- Pratt CW & Cornely K (2004). The citric acid cycle. In *Essential biochemistry*, eds. Pratt CW & Cornely K, pp. 342-369. John Wiley & Sons, Inc..
- Pressley TA, Ismail-Beigi F, Gick GG, & Edelman IS (1988). Increased abundance of Na⁺-K⁺-ATPase mRNAs in response to low external K⁺. *Am J Physiol* **255**, C252-C260.
- Price GJ, Berka JL, Edmondson SR, Werther GA, & Bach LA (1995). Localization of mRNAs for insulin-like growth factor binding proteins 1 to 6 in rat kidney. *Kidney Int* **48**, 402-411.
- Pu HX, Cluzeaud F, Goldshleger R, Karlsh SJ, Farman N, & Blostein R (2001). Functional role and immunocytochemical localization of the gamma a and gamma b forms of the Na,K-ATPase gamma subunit. *J Biol Chem* **276**, 20370-20378.
- Redgrave J, Rabinowe S, Hollenberg NK, & Williams GH (1985). Correction of abnormal renal blood flow response to angiotensin II by converting enzyme inhibition in essential hypertensives. *J Clin Invest* **75**, 1285-1290.
- Rich-Edwards JW, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Rosner B, Speizer FE, & Hennekens CH (1995). Height and the risk of cardiovascular disease in women. *Am J Epidemiol* **142**, 909-917.
- Ritacco G, Radecki SV, & Schoknecht PA (1997). Compensatory growth in runt pigs is not mediated by insulin-like growth factor I. *J Anim Sci* **75**, 1237-1243.
- Riviere G, Michaud A, Breton C, VanCamp G, Laborie C, Enache M, Lesage J, Deloof S, Corvol P, & Vieau D (2005). Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and ACE activities display tissue-specific sensitivity to undernutrition-programmed hypertension in the adult rat. *Hypertension* **46**, 1169-1174.
- Roberts ES, Vaz AD, & Coon MJ (1992). Role of isozymes of rabbit microsomal cytochrome P-450 in the metabolism of retinoic acid, retinol, and retinal. *Mol Pharmacol* **41**, 427-433.
- Robinson D, Weiner CP, Nakamura KT, & Robillard JE (1990). Effect of intrauterine growth retardation on renal function on day one of life. *Am J Perinatol* **7**, 343-346.
- Rogers SA, Ryan G, & Hammerman MR (1991). Insulin-like growth factors I and II are produced in the metanephros and are required for growth and development in vitro. *J Cell Biol* **113**, 1447-1453.

- Rohrwasser A, Morgan T, Dillon HF, Zhao L, Callaway CW, Hillas E, Zhang S, Cheng T, Inagami T, Ward K, Terreros DA, & Lalouel JM (1999). Elements of a paracrine tubular renin-angiotensin system along the entire nephron. *Hypertension* **34**, 1265-1274.
- Rose BD & Post TW (2001b). Renal circulation and glomerular filtration rate. In *Clinical physiology of acid-base and electrolyte disorders*, eds. Wonsiewicz M, McCullough K, & Davis K, pp. 21-70. McGraw-Hill.
- Rose BD & Post TW (2001a). Loop of Henle and the countercurrent mechanism. In *Clinical physiology of acid-base and electrolyte disorders*, eds. Wonsiewicz M, McCullough K, & Davis K, pp. 112-142. McGraw-Hill.
- Rosso P, Donoso E, Braun S, Espinoza R, Fernandez C, & Salas SP (1993). Maternal hemodynamic adjustments in idiopathic fetal growth retardation. *Gynecol Obstet Invest* **35**, 162-165.
- Roy-Clavel E, Picard S, St-Louis J, & Brochu M (1999). Induction of intrauterine growth restriction with a low-sodium diet fed to pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol* **180**, 608-613.
- Ruiz-Ortega M, Esteban V, Suzuki Y, Ruperez M, Mezzano S, Ardiles L, Justo P, Ortiz A, & Egido J (2003). Renal expression of angiotensin type 2 (AT2) receptors during kidney damage. *Kidney Int Suppl* S21-S26.
- Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, Ruperez M, & Egido J (2001). Proinflammatory actions of angiotensins. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **10**, 321-329.
- Salas SP, Rosso P, Espinoza R, Robert JA, Valdes G, & Donoso E (1993). Maternal plasma volume expansion and hormonal changes in women with idiopathic fetal growth retardation. *Obstet Gynecol* **81**, 1029-1033.
- Schoolwerth AC, Smith BC, & Culpepper RM (1988). Renal gluconeogenesis. *Miner Electrolyte Metab* **14**, 347-361.
- Schreuder M, emarre-van de WH, & van WA (2006). Consequences of intrauterine growth restriction for the kidney. *Kidney Blood Press Res* **29**, 108-125.
- Schreuder MF, Nyengaard JR, Fodor M, van Wijk JA, & Delemarre-van de Waal HA (2005). Glomerular number and function are influenced by spontaneous and induced low birth weight in rats. *J Am Soc Nephrol* **16**, 2913-2919.
- Schuster VL, Kokko JP, & Jacobson HR (1984). Angiotensin II directly stimulates sodium transport in rabbit proximal convoluted tubules. *J Clin Invest* **73**, 507-515.
- Seikaly MG, Arant BS, Jr., & Seney FD, Jr. (1990). Endogenous angiotensin concentrations in specific intrarenal fluid compartments of the rat. *J Clin Invest* **86**, 1352-1357.
- Shi H, Levy-Holzman R, Cluzeaud F, Farman N, & Garty H (2001). Membrane topology and immunolocalization of CHIF in kidney and intestine. *Am J Physiol Renal Physiol* **280**, F505-F512.

- Silva P, Ross B, & Spokes K (1980). Competition between sodium reabsorption and gluconeogenesis in kidneys of steroid-treated rats. *Am J Physiol* **238**, F290-F295.
- Smith FR & Goodman DS (1971). The effects of diseases of the liver, thyroid, and kidneys on the transport of vitamin A in human plasma. *J Clin Invest* **50**, 2426-2436.
- Soprano DR & Blaner WS (1994). Plasma retinol-binding protein. In *The retinoids*, eds. Sporn MB, Roberts AB, & Goodman DS, pp. 257-281. Daven press, New York.
- Soprano DR, Soprano KJ, & Goodman DS (1986a). Retinol-binding protein messenger RNA levels in the liver and in extrahepatic tissues of the rat. *J Lipid Res* **27**, 166-171.
- Soprano DR, Soprano KJ, & Goodman DS (1986b). Retinol-binding protein and transthyretin mRNA levels in visceral yolk sac and liver during fetal development in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 7330-7334.
- St-Louis J, Sicotte B, Beausejour A, & Brochu M (2006). Remodeling and angiotensin II responses of the uterine arcuate arteries of pregnant rats are altered by low- and high-sodium intake. *Reproduction* **131**, 331-339.
- Stein CE, Fall CH, Kumaran K, Osmond C, Cox V, & Barker DJ (1996). Fetal growth and coronary heart disease in south India. *Lancet* **348**, 1269-1273.
- Therien AG, Goldshleger R, Karlsh SJ, & Blostein R (1997). Tissue-specific distribution and modulatory role of the gamma subunit of the Na,K-ATPase. *J Biol Chem* **272**, 32628-32634.
- Therien AG, Karlsh SJ, & Blostein R (1999). Expression and functional role of the gamma subunit of the Na, K-ATPase in mammalian cells. *J Biol Chem* **274**, 12252-12256.
- Tilghman SM, Hanson RW, & Ballard FJ (1976). Hormonal regulation of phosphoenol pyruvate carboxykinase (GTP) in mammalian tissues. In *Glucogenesis. Its regulation in mammalian species* pp. 47-91. Wiley, New York.
- Tisher CC & Madsen KM (1996). Anatomy of the kidney. In *The Kidney*, ed. Brenner BM, pp. 3-71. Saunders, Philadelphia.
- Tortora GJ, Grabowski SR, & Parent JC (1994). Le système urinaire. In *Principes d'anatomie et de physiologie* pp. 920-962. Centre Éducatif et Culturelle inc., Anjou.
- Tufro-McReddie A, Romano LM, Harris JM, Ferder L, & Gomez RA (1995). Angiotensin II regulates nephrogenesis and renal vascular development. *Am J Physiol* **269**, F110-F115.
- Ullian ME, Robinson CJ, Evans CT, Melnick JZ, & Fitzgibbon WR (2000). Role of citrate synthase in aldosterone-mediated sodium reabsorption. *Hypertension* **35**, 875-879.
- Unterman TG, Simmons RA, Glick RP, & Ogata ES (1993). Circulating levels of insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF-II, and IGF-binding proteins in the small for gestational age fetal rat. *Endocrinology* **132**, 327-336.

- Usuda N, Kameko M, Kanai M, & Nagata T (1983). Immunocytochemical demonstration of retinol-binding protein in the lysosomes of the proximal tubules of the human kidney. *Histochemistry* **78**, 487-490.
- Vahlquist A, Peterson PA, & Wibell L (1973). Metabolism of the vitamin A transporting protein complex. I. Turnover studies in normal persons and in patients with chronic renal failure. *Eur J Clin Invest* **3**, 352-362.
- Vanpee M, Blennow M, Linne T, Herin P, & Aperia A (1992). Renal function in very low birth weight infants: normal maturity reached during early childhood. *J Pediatr* **121**, 784-788.
- Vatsis KP, Theoharides AD, Kupfer D, & Coon MJ (1982). Hydroxylation of prostaglandins by inducible isozymes of rabbit liver microsomal cytochrome P-450. Participation of cytochrome b5. *J Biol Chem* **257**, 11221-11229.
- Vehaskari VM, Aviles DH, & Manning J (2001). Prenatal programming of adult hypertension in the rat. *Kidney Int* **59**, 238-245.
- Vehaskari VM, Stewart T, Lafont D, Soyez C, Seth D, & Manning J (2004). Kidney angiotensin and angiotensin receptor expression in prenatally programmed hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* **287**, F262-F267.
- Vergeres G & Waskell L (1995). Cytochrome b5, its functions, structure and membrane topology. *Biochimie* **77**, 604-620.
- Verhaeghe J, van BR, van HE, Laureys J, Bouillon R, & Van Assche FA (1993). C-peptide, insulin-like growth factors I and II, and insulin-like growth factor binding protein-1 in umbilical cord serum: correlations with birth weight. *Am J Obstet Gynecol* **169**, 89-97.
- Vickers MH, Breier BH, Cutfield WS, Hofman PL, & Gluckman PD (2000). Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279**, E83-E87.
- Vidonho AF, Jr., da Silva AA, Catanozi S, Rocha JC, Beutel A, Carillo BA, Furukawa LN, Campos RR, de Toledo Bergamaschi CM, Carpinelli AR, Quintao EC, Dolnikoff MS, & Heimann JC (2004). Perinatal salt restriction: a new pathway to programming insulin resistance and dyslipidemia in adult wistar rats. *Pediatr Res* **56**, 842-848.
- Vinciguerra M, Arnaudeau S, Mordasini D, Rousselot M, Bens M, Vandewalle A, Martin PY, Hasler U, & Feraille E (2004). Extracellular hypotonicity increases Na,K-ATPase cell surface expression via enhanced Na⁺ influx in cultured renal collecting duct cells. *J Am Soc Nephrol* **15**, 2537-2547.
- Wada J, Liu ZZ, Alvares K, Kumar A, Wallner E, Makino H, & Kanwar YS (1993). Cloning of cDNA for the alpha subunit of mouse insulin-like growth factor I receptor and the role of the receptor in metanephric development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10360-10364.
- Wagner C, Jensen BL, Kramer BK, & Kurtz A (1998). Control of the renal renin system by local factors. *Kidney Int Suppl* **67**, S78-S83.

- Whitman MM, Harnish DC, Soprano KJ, & Soprano DR (1990). Retinol-binding protein mRNA is induced by estrogen in the kidney but not in the liver. *J Lipid Res* **31**, 1483-1490.
- Wirthensohn G & Guder WG (1986). Renal substrate metabolism. *Physiol Rev* **66**, 469-497.
- Woods LL, Ingelfinger JR, Nyengaard JR, & Rasch R (2001). Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. *Pediatr Res* **49**, 460-467.
- Woods LL & Weeks DA (2004). Naturally occurring intrauterine growth retardation and adult blood pressure in rats. *Pediatr Res* **56**, 763-767.
- Yarian CS, Toroser D, & Sohal RS (2006). Aconitase is the main functional target of aging in the citric acid cycle of kidney mitochondria from mice. *Mech Ageing Dev* **127**, 79-84.
- Zanelli U, Puccini P, Acerbi D, Ventura P, & Gervasi PG (1996). Induction of peroxisomal beta-oxidation and P-450 4A-dependent activities by pivalic and trichloroacetic acid in rat liver and kidney. *Arch Toxicol* **70**, 145-149.
- Zangar RC, Woodcroft KJ, & Novak RF (1996). Differential effects of ciprofibrate on renal and hepatic cytochrome P450 2E1 expression. *Toxicol Appl Pharmacol* **141**, 110-116.
- Zorzoli A, Turkenkopf IJ, & Mueller VL (1969). Gluconeogenesis in developing rat kidney cortex. *Biochem J* **111**, 181-185.

5. REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement ma directrice de recherche, Dre Michèle Brochu, qui a su tenir son rôle de façon exemplaire. Malgré mon inexpérience à mon arrivée dans le laboratoire, elle n'a pas hésité à me faire confiance, ce qui m'a permis de prendre de l'assurance dans le laboratoire. Son positivisme, sa disponibilité, sa patience, ses encouragements, ses conseils, son écoute et son humanité sont tous des éléments qui ont été des atouts considérables dans l'accomplissement de ces années d'étude.

J'aimerais ensuite remercier Marie-Claude Battista qui a été la première à véritablement me montrer les rouages du laboratoire et avec qui j'ai fait mes débuts dans ce monde qu'est la recherche. Merci également à tous mes collègues de laboratoire, soit Rébecca Gaudet, Karine Bibeau, Véronique Houde et Annie Beauséjour qui n'ont jamais hésité à prendre de leur temps pour me conseiller et qui ont contribué à faire du laboratoire un endroit agréable où travailler. Je m'en voudrais aussi de ne pas souligner l'importance des membres du laboratoire du Dr Jean St-Louis, soit Mylène Provencher, Pascale Guérin, Pierre-André Scott et Benoit Sicotte, eux qui ont fait partie de mon environnement de travail tout au long de ma maîtrise.

Un merci tout spécial à ma famille qui m'a toujours encouragée à poursuivre mes rêves et qui continue si bien de le faire. Grâce à eux, j'ai pu forger une confiance en moi et j'ai réalisé qu'avec du travail, rien n'est impossible. Finalement, merci à Sébastien qui est entré dans ma vie dans un moment des plus opportuns et qui, seulement par sa présence et son écoute, a été d'une aide immense dans l'écriture de ce mémoire.

