



Implication des micro-ARNs dans les dérégulations de l'érythropoïèse consécutives à l'insuffisance rénale chronique

Eya Hamza

► To cite this version:

Eya Hamza. Implication des micro-ARNs dans les dérégulations de l'érythropoïèse consécutives à l'insuffisance rénale chronique. Biologie cellulaire. Université de Picardie Jules Verne, 2022. Français. NNT : 2022AMIE0064 . tel-04104054

HAL Id: tel-04104054

<https://theses.hal.science/tel-04104054>

Submitted on 23 May 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Thèse de Doctorat

Mention : Sciences et Santé
Spécialité : Physiopathologie humaine

présentée à l'Ecole Doctorale en Sciences Technologie et Santé (ED 585)

de l'Université de Picardie Jules Verne

par

Eya HAMZA

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Picardie Jules Verne

***Implication des micro-ARNs dans les dérégulations de
l'érythropoïèse consécutives à l'insuffisance rénale
chronique***

Soutenue le 7 décembre 2022, après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

Mme Angela SUTTON, PU-PH, Université Sorbonne Paris Nord (USPN)	Présidente
Mme Emilie BONCOEUR, Professeure, Université Sorbonne Paris Nord (USPN)	Rapporteur
M. Eric LE FERREC, MCU-HDR, Université de Rennes 1	Rapporteur
M. Gabriel CHOUKROUN, PU-PH, Université Picardie Jules Verne (UPJV)	Examineur
M. Ziad MASSY, PU-PH, Université de Versailles Saint-Quentin (UVSQ)	Examineur
M. Laurent METZINGER, Professeur, UPJV	Directeur de thèse
Mme Valérie METZINGER-LE MEUTH, MCU-HDR, USPN	Directeur de thèse



UR UPJV-4666



Remerciements

Je souhaite remercier tout d'abord les membres de mon jury de thèse – la **Professeure Angela SUTTON**, la **Professeure Emilie BONCOEUR**, le **Docteur Eric LE FERREC**, le **Professeur Gabriel CHOUKROUN**, le **Professeur Ziad MASSY**- d'avoir accepté de juger ce travail et de participer à sa concrétisation. Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude et de mon profond respect.

Je souhaite exprimer ma profonde gratitude au **Professeur Loïc GARÇON**, directeur du laboratoire HEMATIM, pour m'avoir accueilli, permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions et pour m'avoir fait bénéficier de votre expertise lors de l'écriture de mon article.

Je transmets ma sincère reconnaissance à mes directeurs de thèses : le **Docteur Valérie METZINGER LE-MEUTH** pour ses conseils et sa confiance et le **Professeur Laurent METZINGER** pour ses encouragements et la grande patience dont il a su faire preuve. Merci à eux également pour m'avoir encadré et guidé de manière exceptionnelle. Je vous suis extrêmement reconnaissante de m'avoir accepté comme doctorante et d'avoir continué à avoir confiance en moi ces 3 ans. Merci pour les opportunités que vous m'avez offertes, au cours de ces années, les publications, les communications, les collaborations.

Mes pensées reconnaissantes vont également au **Docteur Juan MORENO** pour ses conseils et son implication dans ce travail de thèse chez qui j'ai pu réaliser un stage d'excellence en Espagne. Je tiens à remercier le **Professeur Gabriel CHOUKROUN** et le **Professeur Ziad MASSY** pour vos relectures de mon article, vos conseils précieux et votre expertise.

Je tiens notamment à remercier le **Professeur Gabriel CHOUKROUN**, la bourse **MESRI**, **VIFOR**, **SNFDT** sans lesquels ce travail n'aurait pas été financé.

Je remercie pour son immense gentillesse le **Docteur Hakim OULED HADDOU** pilier du laboratoire - pour tes précieux conseils, ton expertise et ton aide technique.

J'adresse de chaleureux remerciements à l'équipe GE06 de l'IMIBIC dans laquelle j'ai réalisé mon stage : **Mercedes, Mélanie, Morgui, Cristina et Alvaro** pour toute l'aide que vous avez apportée dans ce travail ainsi que pour votre bonne humeur.

Je n'oublie évidemment pas tous les membres du laboratoire : **Cathy, Thomas, Yohann, Laure, Amélie C, Amélie S, Marie, Jessica, Stefan, Alban, Walaa, Magalie, Julien D, Julien L, Etienne, Emilie, Delphine, Louison, Nicolas, Pascal, Alexis, Mr Rochette et Chantal**. Un grand merci à tout le monde pour les pauses bien méritées et l'entraide quotidienne. C'est grâce à vous toutes et tous que dans le laboratoire règne une ambiance familiale et agréable. Je vous souhaite à tous de réussir dans vos investigations.

Un grand merci à mes amis – **Yasmine, Myriam, Louiza, Céline, Samed, Bilel, Naila, les Bavardes, Pietro, Jade, Pauline, Harlyne, Chadly, Justine, Mary, Arnaud, Hiyem, Samy et Salah** - dont nos bonnes expériences m'ont aidé à coup sûr au cours de la thèse. Je vous suis reconnaissante pour chacun d'entre vous d'avoir croisé votre chemin.

Mes pensées vont également à mes parents **Thouraya et Mohamed**, ma sœur **Dorra**, mon frère **Seyf**, ma grand-mère **Safia**, ma grand-mère **Zohra** et à toute ma famille pour m'avoir entouré tout au long de ma scolarité.

Enfin, je souhaite remercier de tout mon cœur **Alejandro et Farouk** pour l'aide précieuse qu'ils m'ont apportée dans ce travail et particulièrement pour les heures passées à la relecture du manuscrit. Depuis longtemps, vous avez toujours été présent. Vous m'avez supporté dans les pires comme les bons moments de ma vie, vous m'avez soutenu et encouragé jusqu'au bout.

Je dédie ce mémoire à mon oncle **Anes** parti trop tôt cette année.

Table des matières

Remerciements	2
Liste des figures	7
Liste des tableaux	8
Abréviations	9
I. Introduction.....	14
1. La maladie rénale chronique (MRC)	15
1.1. Physiopathologie	15
1.2. Epidémiologie	16
1.3. Toxines urémiques	16
1.4. Les complications liées à l'IRC	18
1.5. Effet de l'IS sur l'anémie liée à l'IRC.....	19
1.6. Modèles animaux	22
2. L'érythropoïèse	26
2.1. Définition	26
2.2. La CSH.....	26
2.3. Expression des marqueurs de la différenciation érythroïde	28
2.4. Voies de signalisations de l'érythropoïèse	30
2.5. Régulation transcriptionnelle de l'érythropoïèse par GATA-1	33
3. Physiopathologie de l'anémie liée à l'IRC	35
3.1. Régulation de HIF dans la maladie rénale.....	35
3.2. Altération de l'activation de HIF induite par l'IS	36
3.3. Le rôle de l'EPO et du fer dans la régulation de l'érythropoïèse	37
3.4. Régulation du fer par l'hepcidine.....	37
3.5. Stratégies thérapeutiques pour l'anémie rénale.....	39
Revue 1:.....	42
Uremic Toxins Affect Erythropoiesis during the Course of Chronic Kidney Disease: A Review.....	42
4. Les ARNs non codants (ARNnc).....	61
4.1. Classification des ARNnc	61
4.2. La biogénèse des miARNs	62
4.3. Les ARNnc comme biomarqueurs potentiels dans l'IRC	64
4.4. Modulation des miARNs.....	68
Revue 2:.....	69
Non-Coding RNAs in Kidney Diseases: The Long and Short of Them	69

5. Objectifs de thèse	89
II. Matériels et méthodes	90
1. Produits chimiques et réactifs	91
2. Culture cellulaire.....	92
2.1. Lignées cellulaires.....	92
2.2. Culture primaire	93
2.3. Modèles animaux	94
3. Cytométrie en flux	95
4. Biologie moléculaire.....	98
4.1. Extraction des ARNs (ARNm et miARNs).....	98
4.2. Dosage des ARNs.....	98
4.3. Transcription inverse.....	98
4.4. PCR quantitative (q-PCR).....	99
4.5. Etude transcriptomique	101
5. Western Blot	101
6. Analyses statistiques	103
III. Résultats	104
1. Effet des toxines urémiques sur la viabilité cellulaire	105
2. Effet de l'IS sur la différenciation cellulaire.....	108
3. Effet de l'IS sur la viabilité et la différenciation cellulaire au cours de l'érythropoïèse .	110
4. Effet de l'IS sur les gènes liés à l'érythropoïèse et sur la voie de signalisation EPO-EPO-R.	114
5. Effet de l'IS sur les miARNs	117
6. Effet des toxines urémiques sur les CSH et les CPH dans deux modèles de souris	119
V. Discussion	124
1. Les toxines urémiques induisent l'apoptose dans les lignées cellulaires érythropoïétiques et les cellules humaines CD34 ⁺ pendant l'érythropoïèse <i>in vitro</i>	125
2. L'IS affecte le phénotype dans les lignées cellulaires et induit un retard de différenciation dans les cellules CD34 ⁺ humaines pendant l'érythropoïèse <i>in vitro</i>	126
3. L'IS dérégule les gènes liés à l'érythropoïèse.....	127
4. Identification de nouveaux miRNAs impliqués dans l'érythropoïèse par étude transcriptomique.....	128
5. L'IS dérégule la voie de signalisation EPO-EPO-R.....	130
6. Les toxines urémiques affectent les CSH, les CPH et les progéniteurs érythroïdes dans deux modèles de souris.	131
VI. Conclusion et perspectives	133

VII. Annexe	135
Abstract congrès:	136
INDOXYL SULFATE AFFECTS ERYTHROPOIESIS DURING THE COURSE OF CHRONIC KIDNEY DISEASE: A MOLECULAR STUDY	136
Article original:	138
Indoxyl Sulfate Impairs Erythropoiesis at BFU-E stage in Chronic Kidney Disease.....	138
VIII. Bibliographie	170
Résumé	187
Abstract	187

Liste des figures

Figure 1. Schéma récapitulatif de la synthèse du PCS et de l'IS [27]	17
Figure 2. Les différents stades d'érythropoïèse [83].....	26
Figure 3. Les différents marqueurs de la différenciation érythroïde retrouvés chez l'humain (A) et chez la souris (B).	29
Figure 4. Les principales voies stimulées lorsque l'EPO-R est activé dans les CPH [97]	30
Figure 5. Le rôle de Hsp 70 au cours de l'érythropoïèse [125]	33
Figure 6. Profil d'expression de GATA-1 et GATA-2 au cours de l'érythropoïèse [110]	34
Figure 7. Régulation de HIF dans les cellules productrices d'EPO rénale [83].	35
Figure 8. Vue d'ensemble de la régulation de l'érythropoïèse en condition urémique [83].	38
Figure 9. Classification des ARNnc	62
Figure 10. Biogénèse des miARNs [195].....	63
Figure 11. Les différents modèles de lignées cellulaires utilisés UT7/EPO, HEL et K562 et leurs marqueurs membranaires respectifs	92
Figure 12. Protocole de différenciation érythroïde	93
Figure 13. Modèles de souris utilisés	94
Figure 14. L'effet de l'IS, du PCS et du sérum urémique sur l'apoptose dans les cellules UT7/EPO	105
Figure 15. Confirmation de l'effet apoptotique de l'IS (250 µM) à 48h dans les cellules UT7/EPO	106
Figure 16. L'intensité moyenne de fluorescence (MFI) de Ki-67 dans les cellules UT7/EPO à 48h d'exposition à l'IS (250 µM) (n=3).	107
Figure 17. L'effet de l'IS (250 µM) sur l'apoptose dans les lignées cellulaires érythropoïétiques HEL et K562	108
Figure 18. L'effet de l'IS sur le phénotype des lignées cellulaires érythropoïétiques	109
Figure 19. L'effet de l'IS sur les cellules CD34 ⁺ humaines durant l'érythropoïèse <i>in vitro</i>	111
Figure 20. L'effet de l'IS induit un retard dans la différenciation érythroïde dans les cellules humaines CD34 ⁺	113
Figure 21. L'IS dérégule des gènes liés à l'érythropoïèse.	115
Figure 22. L'IS dérégule la voie de signalisation EPO-EPO-R.	116
Figure 23. L'expression relative de miARNs dans les UT7/EPO après 48h d'incubation avec l'IS (250 µM).	117
Figure 24. L'expression relative de miR-223 dans les cellules de culture primaire CD34 ⁺ à J7 avec l'IS 250 µM (n=3).	118
Figure 25. L'effet des toxines urémiques sur les CSH et les CPH dans deux modèles de souris.	121
Figure 26. Les toxines urémiques affectent les progéniteurs érythroïdes murins durant l'érythropoïèse <i>in vitro</i>	123
Figure 27. Schéma récapitulatif des résultats obtenus	133
Figure 28. L'effet de l'IS sur la nécrose dans les UT7/EPO	135

Liste des tableaux

Tableau 1. Classification des stades d'évolution de la MRC (www.has-sante.fr)	15
Tableau 2. Classification physico-chimique des toxines urémiques par le groupe EuTox.....	17
Tableau 3. Modèles de souris en IRC [61]	22
Tableau 4. Les ARNnc connus comme des biomarqueurs pronostiques dans l'IRC [191].....	65
Tableau 5. Concentration sérique en IS (ng/mL) des différents patients urémiques	91
Tableau 6. Caractéristiques et références des anticorps utilisés pour la CMF.....	97
Tableau 7. Liste des amorces utilisées pour la RT-qPCR.	101
Tableau 8. Caractéristiques et références des anticorps utilisés pour le Western Blot.	102
Tableau 9. Paramètres hématologiques et urinaires chez les souris IS (400 mg/Kg) (n=3/5) et chez les souris 5/6 Nx (n=7/8) comparés aux souris contrôles.	120

Abréviations

ADNc : ADN complémentaires

AhR : récepteur aryl hydrocarbon

ANRIL : les polymorphismes de l'ARN antisens dans le locus INK4

ARNm : ARN messagers

ARNnc : ARNs non codants

ASE : agents stimulant l'érythropoïèse

BFU-E : Burst-forming unit-erythroid

BUN : Blood Urea Nitrogen, Azote uréique

CD117 : c-kit

CD41a : marqueur de mégacaryocyte

CD71 : récepteur de la transferrine

CEAH : cellules endothéliales aortiques humaines

CFU-E: Colony Forming Unit-Erythroid

CFU-GM : CFU-granulocytes-macrophages

CMF : Cytométrie en Flux

CPH : cellules progénitrices hématopoïétiques

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

CTAD : domaine de transactivation C-terminal de HIF-1 α

DFG : Débit de Filtration Glomérulaire

DFGe : Débit de Filtration Glomérulaire estimé

DMSO : DiMéthylSulfOxyde

DXM : dexaméthasone

EB : érythroblastes

EFS : Etablissement Français du Sang

EKLF : Erythroid Krüppel-like factor

EPO : Erythropoïétine

EPO-R : récepteur de l'érythropoïétine

ERFE: Erythroferrone

EuTox: European Uremic Toxins

exo-ARNc : ARNc exosomaux urinaires

FOG-1 : Friend Of GATA-1

GB : globules blancs

GDF15 : facteur de différenciation/croissance 15

GM-CSF: granulocyte/macrophage colony-stimulating factor

GPA : Glycophorine A

GR : globules rouges

HAS : Haute Autorité de Santé

Hb: Hémoglobine

HCT : Hématocrite

HD : hémodialyse

HepG2 : les cellules du carcinome hépatocytaire humain

HIF: Hypoxie

HIS: Hybridation *in situ*

HIVAN : néphropathie associée au virus de l'immunodéficience humaine

HK-2 : cellules tubulaires proximales du rein humain

HRE : Élément de réponse à l'hypoxie

hSCF: Human Stem cell factor

HSP70: Heat shock proteins 70

HUVECs : cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine

HVG : hypertrophie ventriculaire gauche

ICAM-1 : molécule d'adhésion intracellulaire 1

IL3-R : Récepteur à l'interleukine-3

IMDM: Iscove's Modified Dulbecco's Medium

IRC : Insuffisance Rénale Chronique

IRT : Insuffisance rénale terminale

IS : Indoxyl sulfate

ISAT : taux de saturation en fer

KCl : chlorure de potassium

KDOQI : Kidney Disease Outcomes Quality Initiative

KSL⁻ : c-Kit⁺, Sca-1⁺, Lin⁻

Lin⁻ : lignage négatif

LncARNs : longs ARNnc

MCH : hémoglobine corpusculaire moyenne

MCV : maladies cardiovasculaires

MCV : volume corpusculaire moyen

MGG : May-Grünwald-Giemsa

miARNs : microARNs

MO : Moelle osseuse

MRC : La maladie rénale chronique

Néphrectomie subtotale ou partielle : souris 5/6 Nx

OMS : Organisation mondiale de la santé

PBS: phosphate-buffered saline

PCR: Polymerase Chain Reaction

PCS: P-cresyl sulfate

PHD: domaine prolyl hydroxylase

piARNs: piwis ARNs

PLT: plaquettes

Pro-EB: proérythroblastes

PS: phosphatidylsérine

REIN : Réseau épidémiologie et information en néphrologie

Retic : réticulocytes

rHEPO : EPO humaine recombinante

rhIL-3 : IL-3 humaine recombinante

RISC : RNA-induced silencing complex

RmSCF : recombinant murine SCF

RNA-Seq : séquençage de l'ARN

ROS : espèces réactives de l'oxygène

RPMI 1640: Roswell Park Memorial Institute

RT: Reverse Transcription

SCF: Stem cell factor

SEM : erreur standard de la moyenne

SFEM : milieu de prolifération érythroïde sans sérum modifié

siARNs: small interference ARNs

SncARNs: small ARNnc

SOCS: suppressor of cytokine signaling

SRAA : système rénine-angiotensine-aldostérone

SVF : sérum de veau fœtal

TP : tubule proximal

TSP-1 : thrombospondine-1

TWSG1 : Twisted Gastrulation Homolog 1

UUO : Obstruction urétérale unilatérale

VCAM-1 : molécule d'adhésion des cellules vasculaires 1

VHL : Von Hippel-Lindau

α -MEM : α -Milieu Essentiel Minimum

I. Introduction

1. La maladie rénale chronique (MRC)

La MRC se caractérise par une perte progressive et irréversible de la fonction rénale entraînant une accumulation de toxines urémiques. En dessous d'un certain seuil de capacité à filtrer le sang, elle entraîne souvent l'Insuffisance Rénale Chronique (IRC). Cette dernière se définit également par l'incapacité des reins à réguler l'excrétion urinaire et à sécréter des hormones. L'accumulation de toxines urémiques peut entraîner un dysfonctionnement endothélial et une inflammation [1], [2].

1.1. Physiopathologie

L'insuffisance rénale est causée par une diminution du nombre de néphrons fonctionnels entraînant une altération de la fonction glomérulaire. Les toxines urémiques ne sont plus filtrées et excrétées par les reins et s'accumulent dans le sang. Cela induit une déficience en production d'érythropoïétine (EPO) par les fibroblastes interstitiels des reins, ce qui entraîne une diminution de la production d'érythrocytes due à un défaut d'érythropoïèse [3], [4]. Dans cette maladie, le meilleur indicateur disponible de la fonction rénale est le Débit de Filtration Glomérulaire (DFG). Le DFG estime la quantité totale de sang filtré par le rein qui traverse les glomérules par unité de temps. La Haute Autorité de Santé (HAS) classe l'évolution de cette baisse du nombre de néphrons en 5 stades selon les conséquences qu'elle entraîne :

Stades	DFG (mL/min/1,73m ²)	Définitions
1	>90	MRC avec DFG normal ou augmenté
2	60-89	MRC avec DFG légèrement diminué
3	Stade 3A : 45-59 Stade 3B : 30-44	IRC modérée
4	15-29	IRC sévère
5	<15	IRC terminale

Tableau 1. Classification des stades d'évolution de la MRC (www.has-sante.fr)

Selon le consensus international, l'IRC est définie par la persistance pendant plus de 3 mois d'une baisse progressive et irréversible du DFG inférieure à 60 ml/min/1,73 m², et de la persistance de marqueurs d'atteinte rénale structurelle (protéinurie ou maladie polykystique). L'IRC apparaît à partir du stade 3A quand le DFG estimé (DFGe) est inférieur à 59 mL/min/1,73 m². On parle d'Insuffisance Rénale Terminale (IRT) quand la fonction rénale est inférieure à 15 % de sa capacité normale.

1.2. Epidémiologie

Le nombre de patients atteints d'IRC est difficile à évaluer précisément car les symptômes sont généralement détectés à un stade avancé de la maladie. D'après le Réseau épidémiologie et information en néphrologie (REIN), 5 à 10 % de la population Française présente une affection rénale asymptomatique ([Insuffisance rénale · Inserm, La science pour la santé](#)). En 2016, on comptabilise 82 295 personnes traitées pour une IRC terminale en France. Son incidence ne cesse d'augmenter chaque année de 2 % [5].

1.3. Toxines urémiques

Les toxines urémiques sont des « composés qui exercent une action biologique et s'accumulent dans l'organisme des patients atteints d'IRC, alors que des reins sains devraient les éliminer dans les urines ». Il existe une association abondamment décrite entre l'augmentation de la concentration de toxines urémiques et la morbi-mortalité dans les études épidémiologiques chez les patients atteints d'IRC [6]–[10]. Un premier travail réalisé en 2003 par le groupe European Uremic Toxins (EuTox) a répertorié une liste exhaustive de 90 toxines urémiques et les a regroupés en 3 catégories : petites molécules hydrosolubles (<500 kDa), molécules moyennes (≥500 kDa) et toxines liées aux protéines [11]. En 2012, cette liste s'est étendue à 146 toxines urémiques référencées au total [12]. Ce groupe de collaboration s'est focalisé sur la mesure des concentrations normales, des concentrations urémiques, et des concentrations urémiques maximales retrouvées chez les patients en IRC terminale.

Le **tableau 2** classifie quelques-unes des toxines urémiques les plus représentatives pour chaque catégorie physico-chimique avec leur concentration et leur poids moléculaire :

Classification	Principales toxines urémiques	C_n	C_u	C_{max}	PM (kDa)	Référence
Petites molécules	Urée (g/L)	<0,4	$2,3 \pm 1,1$	4,6	60	[12], [13]
	Créatinine (mg/L)	<12	136 ± 46	240	113	
Toxines liées aux protéines	Indoxyl sulfate (mg/L)	$0,6 \pm 5,4$	$53 \pm 91,5$	236	251	[14], [15]
	P-cresyl sulfate (mg/L)	$0,6 \pm 1$	$20,1 \pm 10,5$	40,7	108	
Moyennes molécules	B-2 microglobuline (mg/L)	<2	$55 \pm 7,9$	100	11818	[16], [17]

Tableau 2. Classification physico-chimique des toxines urémiques par le groupe EuTox.

Abréviation : C_n , concentration normale ; C_u , concentration urémique ; C_{max} , concentration urémique maximale ; PM, poids moléculaires.

Par rapport aux petites molécules hydrosolubles dont l'urée, qui sont facilement éliminées au cours d'une dialyse standard, les molécules moyennes sont filtrées par des membranes de dialyseur dont les pores sont plus grands [18], [19]. Néanmoins, les molécules liées aux protéines sont très difficiles à éliminer en raison de leur forte liaison protidique avec l'albumine, freinant ainsi leur élimination [20], [21]. Parmi les toxines liées aux protéines, l'indoxyl sulfate (IS) et le P-cresyl sulfate (PCS) sont les toxines les plus étudiées et les plus représentatives car elles sont mal éliminées par la dialyse conventionnelle [22]–[26].

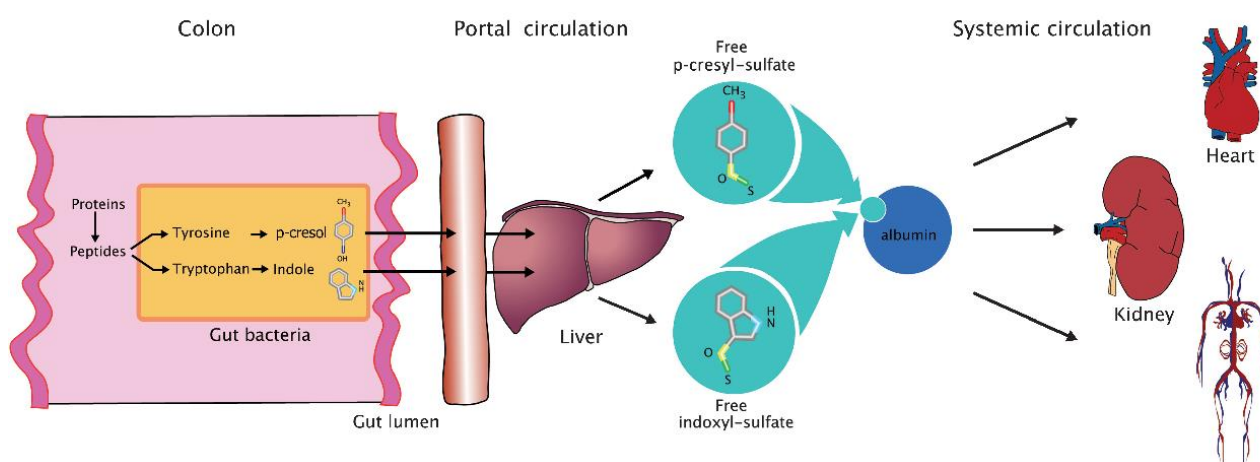


Figure 1. Schéma récapitulatif de la synthèse du PCS et de l'IS [27]

L'IS est un métabolite du microbiote bactérien dérivé du tryptophane (**Figure 1**) [28]. En effet, l'indole est produit par la dégradation bactérienne du tryptophane qui est conjugué par le foie et converti en IS. Le PCS est généré par le métabolisme de la tyrosine et de la phénylalanine par la flore intestinale et sulfaté dans le foie [28], [29]. L'IS et le PCS sont toutes deux de petites molécules, qui se lient aux protéines plasmatiques à hauteur de 90 % (par exemple, l'albumine [30]). Il est important de noter que la plupart des articles scientifiques ont étudié l'IS et le PCS simultanément. En effet, l'IS est étroitement associée au PCS et son augmentation est corrélée au déclin de la fonction rénale chez les patients atteints d'IRC [31].

1.4. Les complications liées à l'IRC

Les complications liées à l'IRC proviennent de la variété des fonctions exercées par les reins. Ces derniers ont trois types de fonctions : (1) filtration du sang pour éliminer les toxines, (2) l'homéostasie et (3) la fonction endocrinienne avec la production d'EPO indispensable à la fabrication des globules rouges (GR).

Les deux principales causes de l'IRC sont l'hypertension artérielle et le diabète. En général, les principaux facteurs de risques de l'IRC sont : l'hypertension, le diabète, l'obésité, les antécédents familiaux d'IRC, les maladies cardiovasculaires (MCV) et l'âge avancé [32]–[34]. Au fur et à mesure que la maladie progresse, diverses fonctions corporelles peuvent être altérées et provoquer des complications plus ou moins importantes de l'IRC. Parmi les plus courantes, on peut citer : l'anémie, les MCV, les troubles du métabolisme minéral et osseux dont l'ostéoporose et la calcification vasculaire, l'hyperkaliémie et l'accumulation de liquide [35]. Dans certains cas, les complications peuvent être la conséquence d'une stratégie de traitement d'un facteur de risque. C'est le cas du développement d'une hyperkaliémie qui est fréquente chez les patients atteints de maladies cardiaques et rénales. En raison de l'utilisation croissante de médicaments qui antagonisent le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA), l'hyperkaliémie est fréquemment rencontrée chez les patients atteints de MCV établies [36].

Dans cette thèse, nous nous concentrons principalement sur l'anémie associée à l'IRC car la majorité des patients atteints d'IRC terminale souffre d'anémie [37]–[39]. Dans un rapport de l'HAS de 2013, la prévalence et la gravité de l'anémie augmentent, surtout dans les stades les plus avancés de l'IRC. L'anémie est définie par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) par une concentration d'hémoglobine (Hb) inférieure à 13 g/dL chez les hommes et inférieure à 12

g/dL chez les femmes. Selon l'OMS, la prévalence de l'anémie ne cesse d'augmenter avec l'âge ; de 8 % entre 65 et 74 ans et de 23 % après 85 ans.

En effet, l'accumulation de toxines urémiques altère la synthèse rénale de l'EPO, compromettant ainsi la croissance et la différenciation des GR dans la moelle osseuse (MO) entraînant ainsi une anémie associée à l'IRC. Ceci expose les patients à un risque élevé de MCV qui sont la principale cause de décès chez ces patients [40], [41]. Parmi ces MCV, on retrouve le développement d'une insuffisance cardiaque et d'une hypertrophie ventriculaire gauche (HVG) qui sont fréquemment associées à l'anémie liée à l'IRC [42].

La forme la plus courante d'anémie observée dans l'IRC est typiquement normocytaire, normochrome et hypoproliférative. En effet, l'anémie dans l'IRC est multifactorielle et peut provenir de la carence en EPO et/ou de la carence en fer qui sont les principales causes de l'anémie [43]. En conséquence, l'anémie chez les patients atteints d'IRC semble contribuer à une progression de la détérioration de la fonction rénale et à une morbidité associée aux MCV [44]. Ainsi, connaître l'érythropoïèse et sa relation avec l'EPO et le fer, permet de comprendre en partie les processus physiopathologiques de l'anémie consécutive à l'IRC.

Dans la section qui suit, nous discuterons des connaissances actuelles des effets de l'IS sur les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'anémie dans l'IRC.

1.5. Effet de l'IS sur l'anémie liée à l'IRC

De nombreux effets de l'IS sur l'anémie rénale sont liés à une altération de la synthèse de l'EPO rénale due à une baisse de la transcription du gène de l'EPO dépendante du facteur induit par l'hypoxie (HIF) [23]. Le facteur HIF est activé afin de stimuler la production d'EPO en réponse à une diminution de l'apport en oxygène et sera décrit plus en détail dans la section « Régulation de HIF dans la maladie rénale ». Bien que l'anémie rénale soit principalement due à une déficience d'EPO, plusieurs autres facteurs, tels que la carence en fer, peuvent aggraver l'érythropoïèse chez les patients rénaux.

De plus, l'IS contribue au « suicide » des érythrocytes, connu sous le nom d'éryptose, caractérisé par un rétrécissement cellulaire des érythrocytes dû à l'entrée de Ca^{2+} extracellulaire [45].

Un autre mécanisme possible pour expliquer l'anémie induite par l'IS est la suppression de la voie du récepteur de l'EPO (EPO-R)-AKT (voie de transduction du signal intracellulaire qui favorise la survie et la croissance en réponse à des signaux extracellulaires) [46]. L'IS semblerait supprimer la phosphorylation de l'EPO-R induite par l'EPO dans les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVECs). La même étude met l'accent sur un autre mécanisme par lequel l'EPO induit la production de thrombospondine-1 (TSP-1), un facteur de stimulation érythroïde. La TSP-1 est connue pour stimuler la prolifération des érythroblastes sous l'effet de l'EPO [47], [48]. Ceci est intéressant car il a été décrit que l'IS diminue l'expression de TSP-1 induite par l'EPO dans les HUVECs en supprimant la phosphorylation de l'AKT [46].

Asai *et al.* ont décrit un mécanisme moléculaire qui pourrait également participer à la progression de l'anémie rénale. Cet article montre que l'IS active le récepteur aryl hydrocarbon (AhR) qui joue un rôle important dans l'activation de HIF dans les cellules du carcinome hépatocytaire humain HepG2. En effet, lorsque l'AhR est inactivé par un antagoniste pharmacologique de l'AhR ou un AhR-siRNA, HIF n'est pas activé par l'IS [49].

L'IS pourrait également augmenter l'exposition à la phosphatidylsérine (PS) et la libération de microparticules des GR en raison de l'augmentation du Ca^{2+} cytosolique [50]. La PS est un composant de la membrane cellulaire qui se trouve préférentiellement dans le feuillet interne et qui externalisée dans la membrane externe en combinaison avec la libération de microparticules pendant l'apoptose. Ce processus permet une détection précoce des cellules apoptotiques [51]. Dans la même étude, les auteurs démontrent que l'activité procoagulante est due à l'exposition à la PS et à la libération de microparticules qui pourraient expliquer les événements cardiovasculaires dans l'IRC [50].

Une autre publication a démontré que la concentration sérique en EPO est négativement corrélée à la concentration sérique de l'IS chez les patients souffrant d'IRC [52]. Dans la même étude, en utilisant des modèles animaux, le rôle inhibiteur de l'IS dans l'expression de l'EPO a été indirectement confirmé. En effet, des rats IRC traités par de l'AST-120, un adsorbant intestinal de l'IS administré par voie orale, ont montré une diminution des concentrations sériques d'IS ainsi qu'une augmentation de l'expression de l'EPO. En revanche, une étude observationnelle multicentrique incluant plus de patients n'a pas montré de lien entre IS et les paramètres d'anémie (par exemple, le taux d'hémoglobine) [53]. On peut conclure qu'une étude portant sur une plus grande cohorte de patients souffrant d'IRC sera nécessaire à l'avenir pour déterminer quel rôle exact les toxines urémiques jouent dans l'anémie rénale.

Une étude de 2018, comparant des témoins sains et des patients hémodialysés (HD), a examiné le mécanisme par lequel l'IS induit un stress oxydatif et une éryptose dans les GR [54]. Dans cet article, Dias *et al.* suggèrent que l'IS augmente la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et induit l'éryptose chez les témoins sains. Ces résultats suggèrent que l'IS joue bien un rôle important dans le développement de l'anémie rénale.

En dehors de l'IS, certaines autres toxines urémiques liées aux protéines ont été décrites comme jouant un rôle dans le processus d'anémie rénale par des mécanismes indépendants de la production d'EPO. Chez les patients atteints d'IRC terminale, les polyamines réduiraient la prolifération et la maturation des Colony Forming Unit-Erythroid (CFU-E) en agissant comme des inhibiteurs de l'érythropoïèse [55]. Certaines études sur les polyamines confirment l'hypothèse selon laquelle les polyamines sont intimement impliquées dans le développement et la progression de la pathogenèse de l'anémie dans l'IRT [55]–[57]. Par exemple, l'acroléine stimule la formation de céramides qui, à leur tour, induisent l'éryptose déclenchée par l'augmentation du Ca^{2+} cytosolique [58].

Toutes ces études suggèrent un rôle important, non seulement de l'IS mais aussi d'autres toxines urémiques, dans le développement de l'anémie rénale. D'autres études devront cependant être entreprises pour comprendre un éventuel mécanisme cumulatif de ces toxines.

Un article publié en 1983 suggère un mécanisme potentiel des sérums urémiques sur l'inhibition de l'érythropoïèse [59]. Cette étude a montré un effet inhibiteur du sérum urémique de patients en IRC sur la prolifération *in vitro* des cellules progénitrices hématopoïétiques (CPH). Cependant, à ce jour, les effets toxiques et inhibiteurs des toxines urémiques sur l'érythropoïèse ne sont pas totalement compris.

Des travaux publiés en 2022 ont montré les effets de l'IS sur l'érythropoïèse *in vitro*. Des Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH) CD34^+ , isolées à partir de sang de cordon ombilical humain, ont été différenciées vers la lignée érythrocytaire et ont été incubées à différentes concentrations d'IS [60]. Cet article a confirmé un des effets de l'IS au cours de l'érythropoïèse que l'on retrouve également dans notre étude à savoir l'effet apoptotique et antiprolifératif. Duangchan *et al.* ont également démontré que l'IS induit une sénescence des cellules au cours de la différenciation érythropoïétique. Les auteurs suggèrent que l'apoptose et la sénescence des cellules érythroïdes pourraient être l'un des mécanismes possibles de l'anémie chez les patients atteints d'IRC.

1.6. Modèles animaux

Afin d'étudier la pathogenèse des maladies rénales, de nombreux modèles animaux ont été développés, notamment des modèles spontanés, génétiques et induits [61]. Le **tableau 3** ci-dessous montre quelques exemples de modèles d'IRC de souris :

Modèle	Etiologie	Translation en maladie chez l'homme	Références
MRL/ <i>lpr</i> NZB/W nephritis	Spontanée	Partielle	[62]
Vieillessement	Spontanée	Bonne	[63]
5/6 Nx	Chirurgicale	Excellente	[64]
HIVAN	Génétique	Bonne	[65]

Tableau 3. Modèles de souris en IRC [61]

Abréviation : 5/6 Nx, 5/6 néphrectomie ; HIVAN, néphropathie associée au virus de l'immunodéficience humaine.

Dans cette section nous allons nous intéresser aux modèles de souris induits. Cependant, ces modèles ne reflètent pas exactement les maladies humaines, et la plupart d'entre eux dépendent de la souche, du sexe ou de l'âge. La souche de souris C57BL/6, par exemple, ne possède qu'un seul gène de la rénine et présente une activité réduite du SRAA par rapport aux souris possédant deux gènes de la rénine [66], [67]. De plus, la sensibilité des reins diffère selon le sexe. Les souris femelles semblent être moins sensibles aux lésions rénales ischémiques et à la néphropathie diabétique et sont moins sujettes à la protéinurie comparées aux souris mâles [68]–[70].

Ces modèles animaux de l'IRC permettent de comprendre les mécanismes moléculaires spécifiques de la maladie, d'étudier la pathogenèse moléculaire et d'évaluer les nouvelles thérapies potentielles. Nous passerons en revue quelques modèles de maladies rénales

chroniques induits chez les souris que l'on va classer en deux catégories : les modèles chirurgicaux et les modèles non chirurgicaux.

1.6.1. Modèles non chirurgicaux :

1.6.1.1. Cisplatine :

Le cisplatine est un médicament anticancéreux à base de platine ayant comme effet secondaire la néphrotoxicité. Ce dernier s'accumule dans les tubules rénaux où il exerce une toxicité directe sur les cellules épithéliales tubulaires, entraînant une inflammation locale, une fibrose interstitielle et altérant le flux sanguin rénal [71].

L'injection intrapéritonéale (i.p.) de deux doses de cisplatine (15 mg/kg) chez des souris C57BL/6J à un intervalle de 2 semaines entraîne une IRC [72]. Le DFG est significativement réduit 2 semaines après la seconde injection et reste diminué pendant 7 semaines d'observation. La créatinine plasmatique est également élevée par rapport aux souris contrôle à 7 semaines et jusqu'à 23 semaines après la deuxième injection de cisplatine. Les reins diminuent de volume et montrent une prolifération des myofibroblastes, une augmentation de l'apoptose et une perte de la masse interglomérulaire [72].

1.6.1.2. Adénine :

Jia *et al.* ont élaboré un protocole pour induire la maladie rénale avec une alimentation supplémentée en adénine chez la souris [73]. Pour contourner le problème des souris qui évitent de manger de l'adénine, le composé a été mélangé à un régime alimentaire contenant de la caséine qui en atténue l'odeur et le goût. L'ajout de 0,2% d'adénine à la nourriture pendant 6 semaines entraîne une IRC chez les souris C57BL/6, avec une augmentation des taux d'urée, de créatinine, de phosphate et de parathormone dans le sérum [74]. L'histologie montre une atteinte tubulo-interstitielle avec infiltration de cellules inflammatoires, fibrose interstitielle et perte de

cellules épithéliales tubulaires. Dans certaines études publiées, mais pas toutes, une protéinurie a également été observée chez les souris C57BL/6 après un traitement à l'adénine [73], [75]. Ali *et al.* ont testé différents dosages d'adénine pour déterminer leur capacité à induire une IRC chez les souris [75]. Une supplémentation de 0,3% d'adénine a été létale pour tous les animaux en 3-4 jours, alors que 0,2% d'adénine dans la nourriture a conduit à une IRC stable sans mortalité au cours des 4 premières semaines. Mori-Kawabe *et al.* ont récemment rapporté qu'il n'y avait pas d'altération de la créatinine sérique ou de l'azote uréique sanguin après l'ajout d'adénine à 0,125% dans la nourriture pendant 4 semaines [76]. Par conséquent, la concentration idéale d'adénine dans l'alimentation pour induire une IRC devrait se situer entre 0,2 et 0,25%.

1.6.2. Modèles chirurgicaux :

1.6.2.1. Néphrectomie subtotale :

La néphrectomie subtotale ou partielle (5/6 Nx) combine une néphrectomie unilatérale et une ligature des branches polaires (les pôles supérieur et inférieur) du rein restant. Cette procédure a été développée à l'origine pour être utilisée chez le rat car l'intervention chirurgicale présente des taux plus élevés de complications et de pertes d'animaux chez la souris. Quatre semaines après la chirurgie, les souris 5/6 Nx ont développé une fibrose cardiaque, une anémie et une insuffisance rénale [64]. Elles présentent également des taux élevés de créatinine et d'azote uréique sanguin [77].

La résistance des souris C57BL/6 au développement de l'hypertension, de la protéinurie et de la glomérulosclérose, due à l'activité réduite du SRAA, peut être surmontée par l'administration chronique d'angiotensine-II [43]. Cela suggère que le degré d'activation du SRAA joue un rôle central dans la progression de l'IRC après une néphrectomie subtotale chez la souris.

1.6.2.2. Obstruction unilatérale de l'uretère :

L'obstruction unilatérale de l'uretère (UUO) est un modèle classique chez la souris permettant d'étudier le processus de fibrose rénale tubulo-interstitielle et qui peut convenir à toutes les souches de souris, y compris les C57BL/6 [78]. Après une incision abdominale, un uretère est généralement ligaturé deux fois. L'UUO doit être réalisée sous anesthésie générale. Elle entraîne une hydronéphrose (accumulation excessive d'urine dans les reins), des lésions tubulaires, une mort cellulaire, une infiltration interstitielle de macrophages et une fibrose interstitielle avec prolifération de fibroblastes et de myofibroblastes. Un inconvénient de ce modèle de souris est le manque de possibilités d'estimer la fonction rénale à partir de la créatinine sérique ou de l'azote uréique sanguin, en raison des changements compensatoires du rein non obstrué.

Cochrane *et al.* ont montré que le rein obstrué est capable de se régénérer après inversion de l'UUO [79]. Chez des souris C57BL/6, un uretère a été obstrué pendant 10 jours, puis l'obstruction a été retirée. La fibrose a régressé après la désobstruction et les zones de tubules réparés ont augmenté. En revanche, Tapmeier *et al.* n'ont trouvé aucune différence en termes de fibrose et d'expansion interstitielle entre les reins 10 jours après UUO et les reins prélevés 10 semaines après réimplantation de l'uretère obstrué initial [80]. Puri *et al.* ont développé un modèle murin d'IRC basé sur une obstruction transitoire du rein droit et une obstruction du rein gauche après récupération partielle du rein droit désobstrué [81].

Les principaux modèles animaux de maladies rénales présentés ci-dessus constituent des outils puissants pour étudier les mécanismes des lésions rénales et les approches thérapeutiques potentielles pour refléter les maladies humaines. Par ailleurs, il est important de bien choisir le modèle de maladie rénale, l'espèce, la souche, le sexe et l'âge, ainsi que les paramètres d'étude appropriés en fonction de l'objectif de l'étude.

2. L'érythropoïèse

Les MRC provoquent un dysfonctionnement des cellules productrices de l'EPO dans les reins, entraînant une diminution de la production des GR [44]. Par ailleurs, il est nécessaire de comprendre les mécanismes de différenciation qui conduisent à la formation des GR à partir de CSH.

2.1. Définition

L'érythropoïèse est un processus en plusieurs étapes au cours duquel des GR matures sont générés à partir de CSH dans la MO. Elle permet la production de 200 milliards de GR matures par jour qui ont une durée de vie moyenne de 120 jours [82]. Le rôle principal des GR est de transporter l'oxygène des poumons vers tous les tissus de l'organisme grâce à la présence de molécules d'Hb. En cas d'anémie, une diminution anormale de la concentration d'Hb dans le sang est observée.

2.2. La CSH

L'érythropoïèse est un processus hautement régulé dans lequel les CSH prolifèrent et se différencient successivement en Burst-forming unit-erythroid (BFU-E), CFU-E, proérythroblastes (Pro-EB), érythroblastes (EB), réticulocytes (Retic) et GR matures (ou érythrocytes) dans la circulation durant la période de 21 jours (**Figure 2**).

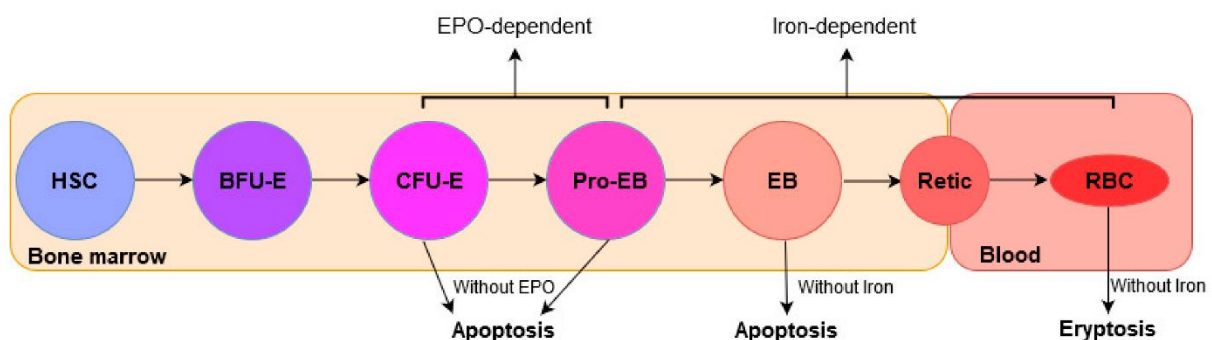


Figure 2. Les différents stades d'érythropoïèse [83].

Abréviation : CSH, cellule souche hématopoïétique ; BFU-E, burst-forming unit-erythroid ; CFU-E, colony-forming unit-erythroid ; Pro-EB, proérythroblastes ; EB, érythroblastes ; Retic, réticulocytes ; RBC, GR mature ; EPO, érythropoïétine.

Deux phases conduisent à la maturation des GR, la première étant l'érythropoïèse précoce suivie de l'érythropoïèse tardive. L'érythropoïèse précoce dure en moyenne 10 jours au cours desquels les CSH multipotentes présentes au sein de la MO sont amplifiées et différenciées pour produire des progéniteurs.

La cellule BFU-E est le premier type de progéniteur érythroïde engagé qui porte son nom du fait des colonies multicentriques qui le caractérise (burst = éclatement) en milieu semi-solide. Ces colonies ainsi formées peuvent regrouper jusqu'à des milliers de cellules hémoglobinisées [84]. Dans la MO, les cellules BFU-E sont produites à une fréquence de 40 à 120 pour 105 cellules [82]. Ainsi, leurs croissances dépendent d'un certain nombre de cytokines, dont les plus importantes ; le stem cell factor (SCF), la thrombopoïétine (TPO), l'interleukine 3 (IL3), l'IL11 et le FLT3-ligand [82].

Les CFU-E forment de petites colonies de 16 à 125 cellules et apparaissent après 5 à 8 jours chez l'homme et 2 à 3 jours chez la souris dans une culture en méthylcellulose. Ces dernières sont 5 à 8 fois plus abondantes que les BFU-E dans la MO et leur croissance est extrêmement sensible à l'EPO [82].

A partir du 10^{ème} jour de culture débute l'érythropoïèse tardive durant laquelle les Pro-EB se différencient successivement en érythroblastes avant d'énuccléer pour atteindre le stade des réticulocytes. Le développement des Pro-EB aux réticulocytes implique quatre à cinq divisions cellulaires rapides, entraînant une réduction progressive de la taille des cellules [82]. En fin de différenciation, les réticulocytes rétrécissent et acquièrent une forme biconcave devenant ainsi des érythrocytes matures aussi appelés GR matures. Leurs petites tailles et leurs formes biconcaves créent une grande surface pour les échanges gazeux et permettent aux cellules de pénétrer dans les microcapillaires des tissus.

2.3. Expression des marqueurs de la différenciation érythroïde

Au cours de cette différenciation, les cellules subissent des changements morphologiques qui s'accompagnent de modifications des taux d'expression de divers marqueurs membranaires observables par Cytométrie en Flux (CMF).

Chez l'homme, on retrouve ces différents marqueurs exprimés à différents stades de différenciation : le CD123 (ou récepteur à l'IL3, IL3-R), CD34, CD36, CD71 et CD235a (**Figure 3A**). Le CD123 est exprimé dans les CSH [85]. Quant au CD34, il est exprimé dans les CSH et le stade BFU-E dans la MO. Des kits MicroBead spécifiques du CD34 existent aujourd'hui pour sélectionner la fraction positive des cellules souches et progénitrices CD34⁺ à partir de sang périphérique, de la MO ou de sang de cordon ombilical. Le CD36, le récepteur à la TSP-1, est exprimé à partir du stade de différenciation CFU-E et disparaît après le stade EB [86]. De même, le récepteur de la transferrine, le CD71, est exprimé de façon transitoire à partir du stade CFU-E jusqu'au stade EB. Ainsi, les progéniteurs BFU-E et CFU-E sont généralement caractérisés par les phénotypes CD45⁺/CD235a⁻/IL3⁻/CD34⁺/CD36⁻/CD71^{low} et CD45⁺/CD235a⁻/IL3⁻/CD34⁻/CD36⁺/CD71^{high}, respectivement [87].

À partir du stade Pro-EB, la Glycophorine A (GPA ou CD235a) commence à être exprimée, et atteint son niveau d'expression maximal au stade terminal de maturation érythrocytaire. La maturation érythroblastique peut également être suivi par un couplage de plusieurs marqueurs. L'association du CD71 et de la GPA permet de visualiser la progression des Pro-EB (CD71⁺/GPA^{low}) en EB (CD71⁺/GPA^{med}) [88]. En plus des marqueurs de différenciation, il est possible de suivre les différents stades de l'érythropoïèse en s'intéressant à l'expression des différents facteurs de transcription (exemple : le facteur de transcription GATA 1 discuté plus tard dans la section « Régulation transcriptionnelle de l'érythropoïèse par GATA-1 »).

Chez la souris, on retrouve ces principaux marqueurs de différenciation ; le CD45, le c-kit (CD117), le CD71 et le TER-119 qui sont exprimés à différents stades de l'érythropoïèse [89] (**Figure 3B**). Le CD45 est exprimé dans les CSH jusqu'au stade BFU-E. Quant au marqueur CD117, il est exprimé à partir des CSH jusqu'au stade Pro-E dans la MO [90]. On peut utiliser des kits MicroBead spécifique du CD117 pour sélectionner la fraction positive à partir de cellules souches de la MO de souris, l'équivalent du CD34 chez l'humain. Le CD71 est exprimé à partir du stade de différenciation CFU-E et disparaît après le stade réticulocyte [91]. Enfin, à

partir du stade Pro-EB, le marqueur TER-119, l'équivalent de la GPA chez l'homme, commence à être exprimé et atteint son niveau d'expression maximal au stade érythrocyte [91].

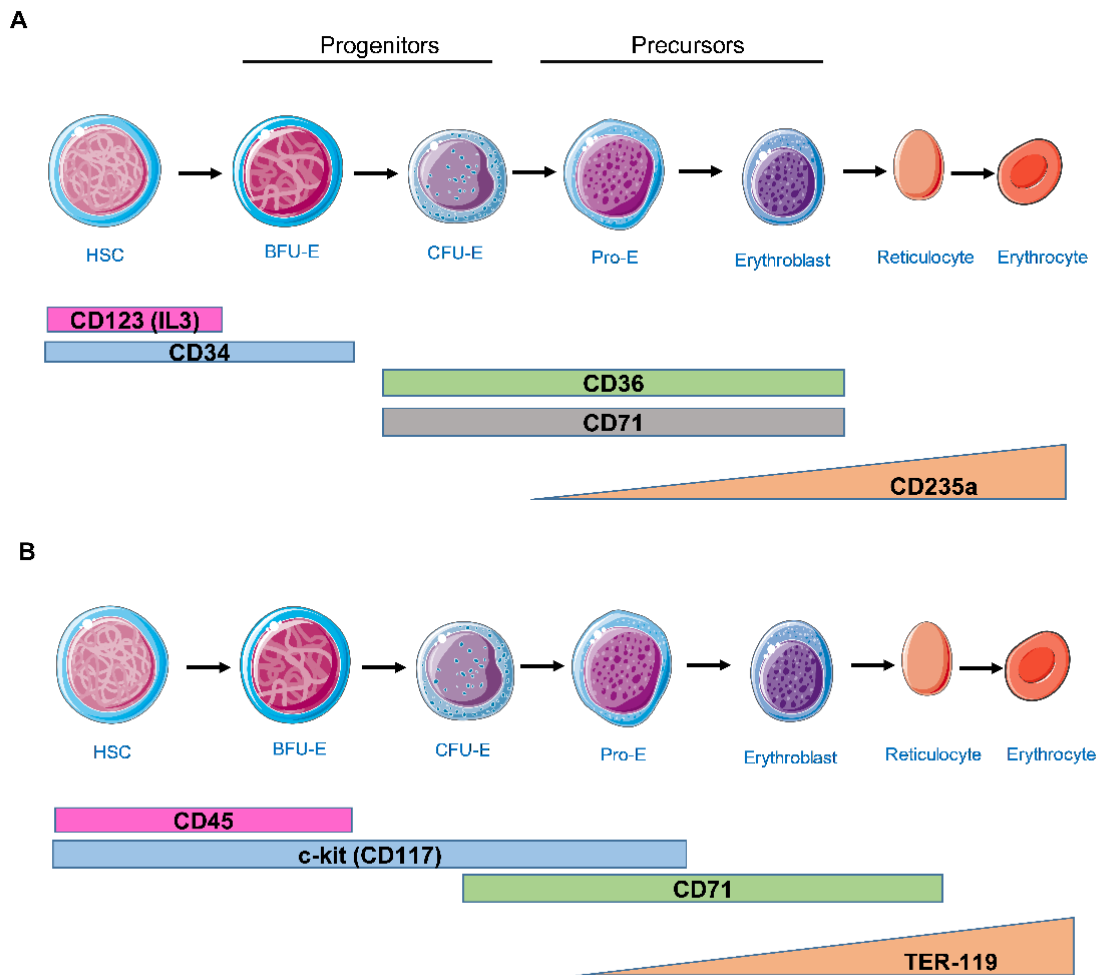


Figure 3. Les différents marqueurs de la différenciation érythroïde retrouvés chez l'humain (A) et chez la souris (B).

2.4. Voies de signalisations de l'érythropoïèse

L'EPO est l'hormone clé qui régule l'érythropoïèse. Elle est majoritairement produite dans les reins (à 80 %) par les cellules fibroblastiques péri-tubulaires mais aussi par le foie (à 20 %).

Dans la MO, les cellules érythroïdes exprimant l'EPO-R se trouvent principalement à des stades précoces exprimés dès le stade BFU-E. De plus, l'EPO agit en synergie avec d'autres cytokines (par exemple, le SCF) dans la MO pour induire la maturation et la prolifération depuis le stade CFU-E, au stade Pro-E (tous deux dépendants de l'EPO) et jusqu'au stade EB de l'érythropoïèse [86], [92]. L'EPO se lie à son récepteur et génère des signaux intracellulaires pour empêcher l'apoptose des cellules CFU-E tardives et favoriser leur survie et leur prolifération [86] [93]. L'interaction entre l'EPO et l'EPO-R est le principal déclencheur de la régulation de l'érythropoïèse. En se liant à l'EPO, l'EPO-R s'homodimérise à la surface de la cellule et la cascade de transduction du signal est initiée (**Figure 4**) [94], [95]. Une signalisation intracellulaire se produit par l'induction de la phosphorylation de la tyrosine de la kinase JAK2, qui va à son tour recruter d'autres protéines impliquées dans des voies de signalisation [96].

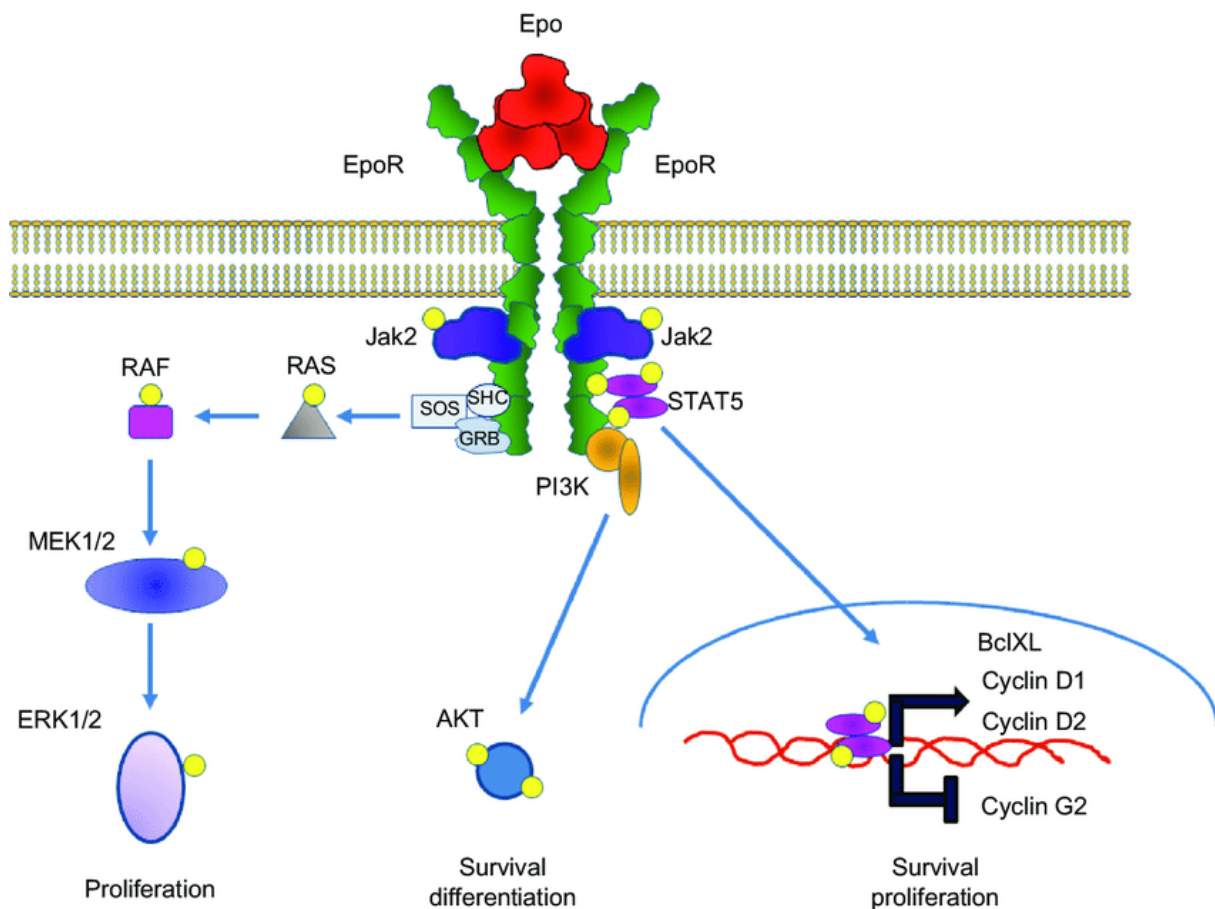


Figure 4. Les principales voies stimulées lorsque l'EPO-R est activé dans les CPH [97]

Trois principales voies de signalisation sont activées par l'EPO lors de l'érythropoïèse : la voie STAT5, la voie PI3-Kinase/AKT et la voie MAPKinase/ERK. Les voies de signalisations impliquées dans l'érythropoïèse peuvent être activées par plusieurs facteurs de croissance, à l'exception de la voie STAT5 qui est spécifique de l'activation de l'EPO-R. L'EPO présente un profil d'activation plutôt STAT5 dépendant, tandis que le SCF présente plutôt une signalisation ERK-dépendante [98].

2.4.1. La voie STAT5 :

Lorsque l'EPO se lie à son récepteur EPO-R situé sur les progéniteurs érythroïdes, le récepteur subit un changement de conformation. Ce processus déclenche la transphosphorylation de JAK2 ainsi que son activation [99]. À son tour, JAK2 phosphoryle des résidus de tyrosine situés sur le domaine cytoplasmique de l'EPO-R qui permettra ensuite la phosphorylation activatrice de STAT5.

STAT5 existe sous deux isoformes STAT5a et STAT5b. Leur activation par phosphorylation induit la formation d'homo ou d'hétérodimères STAT5a/b puis leur translocation nucléaire. La voie de signalisation JAK2/STAT5 est impliquée dans la régulation de l'expression des gènes impliqués dans l'apoptose, qui favorise la survie et la prolifération cellulaire durant l'érythropoïèse. STAT5 joue un rôle de facteur de transcription avec comme cibles transcriptionnelles directes : Bcl-xL, Pim-1, c-myc, l'oncostatin M, les cyclines-D, et la famille des suppressor of cytokine signaling (SOCS). Parmi ces cibles, la protéine anti-apoptotique Bcl-xL joue un rôle primordial dans la survie des progéniteurs érythroïdes [100]. Par exemple, à partir du stade BFU-E, une augmentation importante de l'expression de Bcl-xL est observée dans les cellules de l'érythropoïèse [101]. De plus, Bcl-xL est également impliquée dans la synthèse de l'hème qui est un composant essentiel de l'Hb [102]. Outre la régulation de Bcl-xL par STAT5, le facteur de transcription GATA-1 impliqué dans la survie et la différenciation érythroïde peut également réguler Bcl-xL [103]. Cependant, l'axe STAT5/ Bcl-xL semble être indispensable au bon déroulement de l'érythropoïèse. En effet, chez des embryons de souris Stat5^{-/-}, une anémie microcytaire est observée due à une apoptose massive des précurseurs érythroïdes du fait d'une diminution des taux de protéines anti-apoptotiques Bcl-xL [104].

2.4.2. La voie PI3K/AKT :

La voie PI3K/AKT est activée par l'EPO, le SCF, l'IL-3 et l'IL-6 durant l'érythropoïèse afin de réguler la survie et la prolifération des progéniteurs érythroïdes [105]. La protéine PI3K est formée par deux sous-unités : la sous-unité régulatrice P85 et la sous-unité catalytique P110.

La fixation de l'EPO à l'EPO-R, ou du SCF à son récepteur, entraîne l'activation de la PI3K par phosphorylation. Cette activation induit la production du 3' phospho-inositol (PiP3), qui va se fixer sur AKT et l'activer. La voie PI3K/AKT agit à la fois en protégeant les précurseurs érythroïdes de l'apoptose et en stimulant la prolifération des précurseurs érythroïdes, en réponse à une stimulation par l'EPO [106] [105]. Une étude a démontré chez la souris que la délétion de la sous-unité p85 de la PI3K conduit à une anémie avec une diminution de la prolifération des précurseurs érythroïdes [107].

Une autre étude a montré que l'EPO modifie les niveaux d'expression des gènes régulés par PI3K, tels que la GPA et le récepteur du SCF [108]. Cette voie de signalisation joue un rôle dans la régulation post-traductionnelle de GATA-1, facteur majeur de différenciation érythroïde. En effet, lorsqu'il est activé par l'EPO, AKT phosphoryle GATA-1 au niveau de la sérine 310. Ainsi, GATA-1 phosphorylé est transloqué vers le noyau, où il agit comme facteur de transcription activant l'expression de gènes codants pour la différenciation érythroïde par exemple, les gènes de l'Hb, de l'EPO-R, de la GPA et pour la viabilité cellulaire avec Bcl-xL [109]–[111].

2.4.3. La voie MAPKinase/ERK :

La voie de signalisation MAPKinase/ERK est impliquée dans la prolifération, la différenciation et la survie des cellules. Cette voie peut être activée par plusieurs mécanismes différents et potentiellement liés, impliquant l'activation de Ras. Parmi les isoformes de Ras, seul K-Ras est essentiel pour l'érythropoïèse et son invalidation est létale chez la souris *in utero* [112]. En effet, les embryons présentaient une anémie et une diminution des cellules progénitrices dans le foie fœtal [113]. Une fois activé, Ras induit une cascade de signalisation qui conduit, entre autres, à l'activation de la voie ERK1/2. Les sous-familles ERK1 et ERK2, aussi appelées p44 et p42 MAP kinases, sont des kinases activées par phosphorylation en aval de Ras [114]. Une

fois activées, elles peuvent phosphoryler de nombreuses cibles protéiques non seulement au niveau membranaire et du cytosquelette, mais également au niveau nucléaire. La voie ERK1/2 est activée séparément mais aussi en synergie par l'EPO et par le SCF dans les érythroblastes humains [115]. Cette voie est impliquée dans la prolifération des CPH immatures au détriment de leur différenciation terminale [116].

2.5. Régulation transcriptionnelle de l'érythropoïèse par GATA-1

GATA-1 est un facteur de transcription essentiel dans la survie et la différenciation érythroïde [117]–[119]. Il agit sur l'activation de l'expression de gènes spécifiques de l'érythropoïèse telle que les globines, les enzymes de synthèse de l'hème et les protéines membranaires comme l'EPO-R et la GPA dans les phases tardives de l'érythropoïèse [120]–[124].

GATA-1 est connu pour être une cible des caspases au cours de la différenciation érythroïde (**Figure 5**). En effet, la présence d'EPO protège GATA-1 du clivage par la caspase-3 grâce à son interaction avec la Heat shock protein 70 (HSP70) permettant ainsi la différenciation érythroïde terminale. Cependant, l'absence d'EPO délocalise HSP70 du noyau et GATA-1 n'est plus protégée. Cette dernière va être clivée par les caspases, ce qui va conduire à un arrêt de différenciation et à l'apoptose des EB [118].

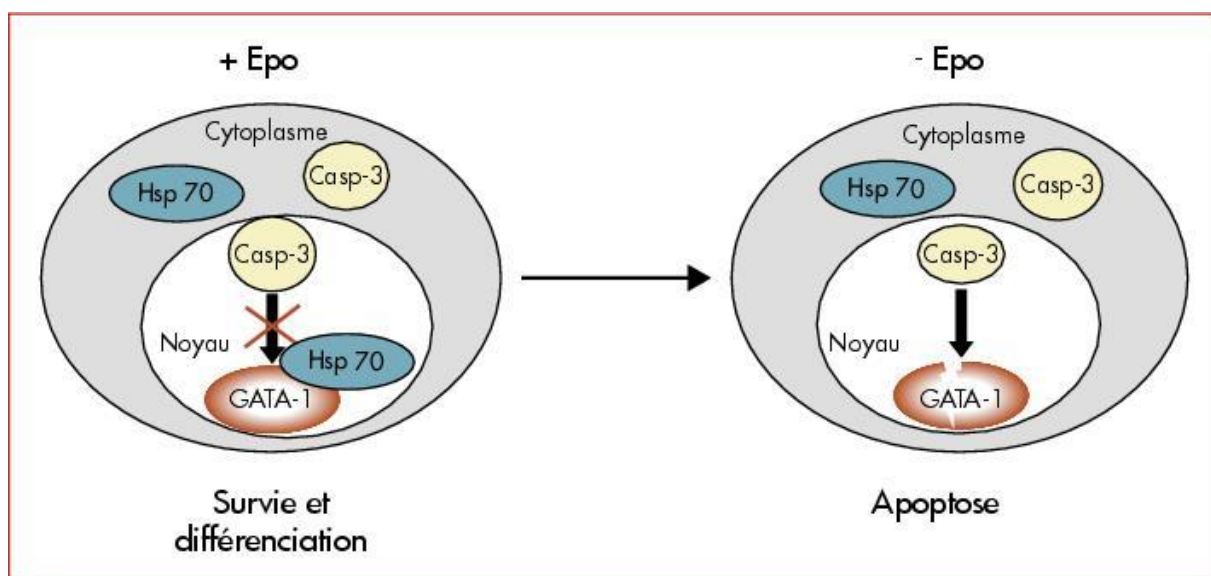


Figure 5. Le rôle de Hsp 70 au cours de l'érythropoïèse [125]

L'importance de GATA-1 dans l'érythropoïèse a été démontrée dans plusieurs études. Par exemple, des cellules souches embryonnaires GATA-1 $-/-$ présentent une érythropoïèse inefficace [126]. D'autre part, des souris mâles invalidées pour le gène de GATA-1 meurent *in utero* d'anémie sévère due à un arrêt de maturation au stade Pro-EB [127]–[129]. Il a également été démontré que GATA-1 inhibe la progression du cycle cellulaire au niveau de la phase G1/S pour permettre la différenciation terminale [130]. Outre GATA-1, GATA-2 est également nécessaire durant l'érythropoïèse précoce [131]. Il a été démontré que la transition de GATA-2 vers GATA-1 contribue à la différenciation érythroïde (**Figure 6**) [111].

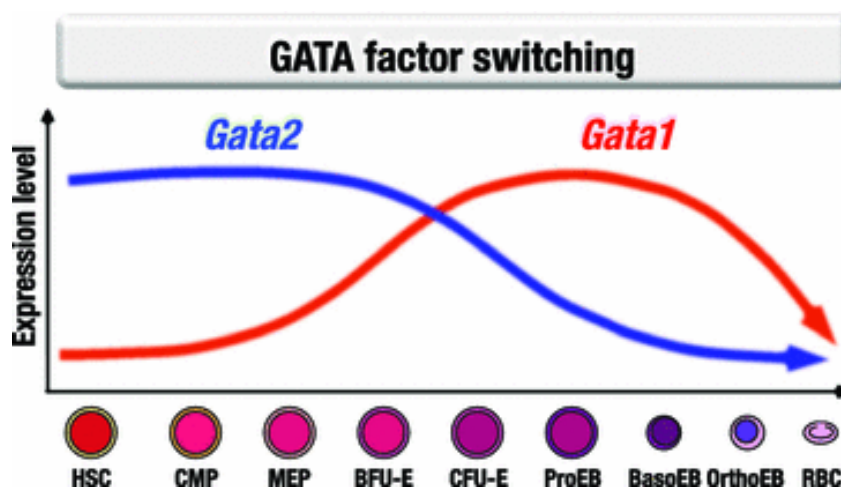


Figure 6. Profil d'expression de GATA-1 et GATA-2 au cours de l'érythropoïèse [110]

GATA-1 est également impliqué dans la régulation de l'érythropoïèse à travers de nombreuses interactions protéiques avec d'autres facteurs de transcription impliqués dans l'érythropoïèse comme le Erythroid Krüppel-like factor (EKLF) ou, plus spécifiquement, le cofacteur Friend Of GATA-1 (FOG-1) [132].

3. Physiopathologie de l'anémie liée à l'IRC

Le facteur HIF est activé afin de stimuler la production d'EPO en réponse à une diminution de l'apport en oxygène [133]. Il est activé dans un contexte pathologique comme au cours d'une anémie. HIF est un hétérodimère avec une sous-unité alpha (HIF- α) et une sous-unité bêta exprimée de manière constitutive (HIF- β). Les deux isoformes de HIF- α (HIF-1 α et HIF-2 α) sont impliqués dans la réponse à l'hypoxie. De plus, il a été démontré que HIF-2 α est l'isoforme le plus important dans la médiation de la réponse de l'anémie en tant que régulateur clé de l'érythropoïèse et du métabolisme du fer [134]–[139].

3.1. Régulation de HIF dans la maladie rénale

L'expression de HIF- α est principalement régulée par la dégradation du protéasome [140], [141] (**Figure 7**).

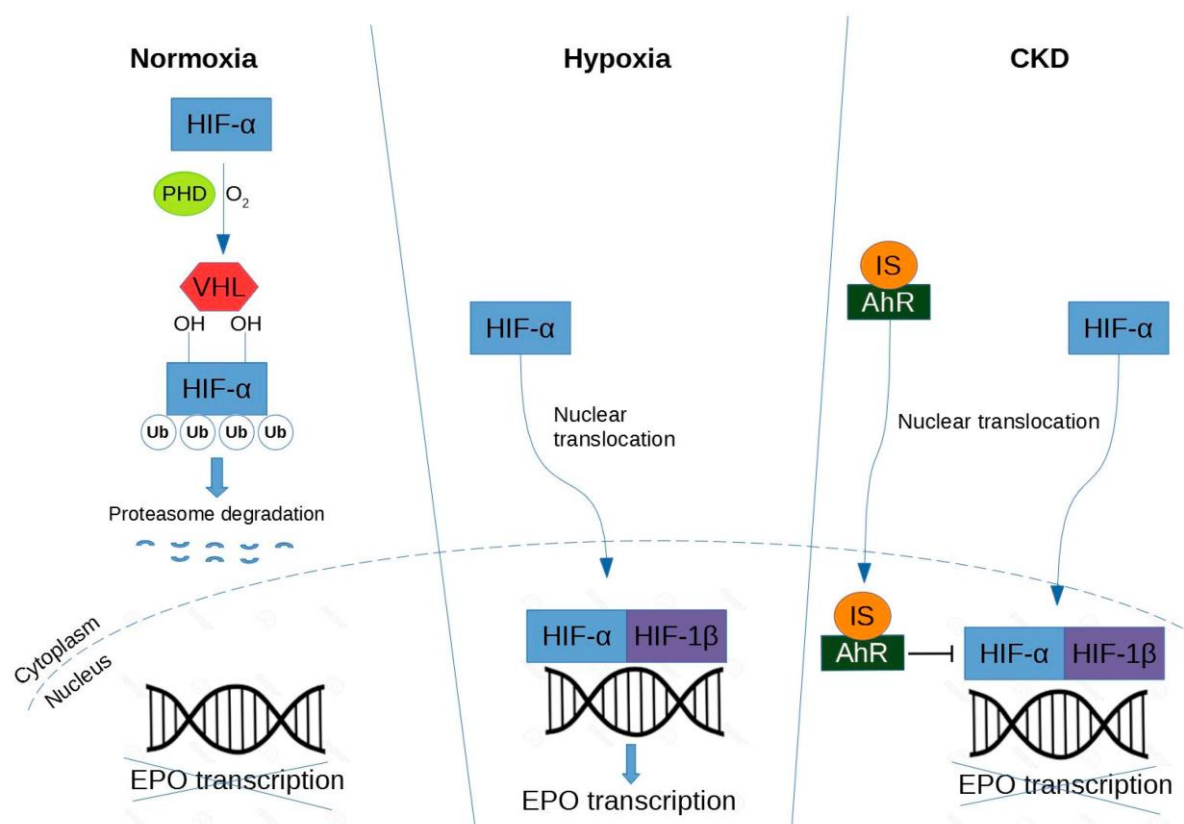


Figure 7. Régulation de HIF dans les cellules productrices d'EPO rénale [83].

Abréviations : HIF, facteur inductible par l'hypoxie ; PHD, domaine prolyl hydroxylase ; VHL, complexe von Hippel-Lindau-E3-ubiquitine ligase ; Ub, ubiquitylation ; EPO, érythropoïétine ; AhR, récepteur d'aryl hydrocarbure ; IS, Indoxyl sulfate.

En condition normoxique, HIF- α est hydroxylée par la protéine à domaine prolyl hydroxylase (PHD) [142]. HIF-1 α hydroxylée est ensuite reconnue par le complexe Von Hippel-Lindau (VHL)-E3-ubiquitine ligase, puis polyubiquitinée et dégradée dans le protéasome.

En revanche, en condition hypoxique, HIF- α échappe à l'hydroxylation médiée par PHD, s'accumule dans le noyau et se dimérise avec HIF- β [142]. Par conséquent, l'hétérodimère HIF se lie à l'élément de réponse à l'hypoxie (HRE) dans la région régulatrice des gènes cibles (par exemple, l'EPO) et favorise la transcription de ces gènes.

Une étude de Bernhardt *et al.* suggère que les inhibiteurs de PHD (FG-2216) peuvent stabiliser les niveaux de HIF en empêchant l'hydroxylation. Cela favorise la dimérisation et stimule la production d'EPO endogène dans les reins des patients en HD [143]. Les inhibiteurs pharmacologiques de la PHD pourraient ainsi offrir une nouvelle approche pour le traitement de l'anémie chez les patients en IRC [144].

3.2. Altération de l'activation de HIF induite par l'IS

Dans l'IRC, HIF-1 α et HIF-2 α sont tous deux activés, il est donc difficile de déterminer leurs effets individuels dans l'anémie [145]. Cependant, HIF-2 α est connu comme un régulateur clé dans l'induction de la transcription de l'EPO et pourrait induire une anémie sévère lorsque son expression est inhibée [146] [147]. Comme l'a révélé l'étude de Chiang *et al.*, la toxine urémique IS supprime l'expression de l'EPO de manière dépendante de HIF à la fois *in vitro* et *in vivo* [23]. Dans des conditions hypoxiques, l'IS est capable de modifier l'érythropoïèse en supprimant la transcription du gène de l'EPO via l'inhibition de l'activation du HIF. Ces relations entre HIF et IS ont été confirmées dans une étude dans laquelle l'IS inhibe l'induction hypoxique des gènes cibles de HIF-1 α provoquant une déficience fonctionnelle du domaine de transactivation C-terminal de HIF-1 α (CTAD) dans les cellules tubulaires proximales du rein humain (HK-2) [148]. En outre, comme nous l'avons vu précédemment, l'IS active le facteur de transcription AhR dans les HUVECs [149]. Dans un contexte d'IRC, l'IS active le récepteur

AhR qui, à son tour inhibe HIF, ce qui entraîne un blocage de la transcription de l'EPO [49]. Par ailleurs, l'activation du facteur AhR par l'IS joue un rôle indispensable dans l'inhibition de HIF et la production d'EPO dans les cellules HepG2 [49]. Cela pourrait être l'un des mécanismes moléculaires à l'origine de l'anémie rénale.

3.3. Le rôle de l'EPO et du fer dans la régulation de l'érythropoïèse

Un défaut dans l'érythropoïèse peut conduire à des maladies hématologiques [150]. L'EPO est l'hormone clé qui régule l'érythropoïèse. Ainsi, l'interaction entre l'EPO et son récepteur est le principal déclencheur de la régulation de l'érythropoïèse. Cette interaction génère des signaux intracellulaires pour empêcher les cellules CFU-E tardives d'entrer en apoptose comme nous l'avons décrit précédemment [86]. Au cours de ce processus, le facteur de transcription HIF-2 α favorise l'érythropoïèse en régulant la synthèse de l'EPO et en augmentant l'absorption du fer [151]. La carence en EPO et en fer sont les principales causes de l'anémie, conséquence bien connue de l'IRC.

Le fer est un minéral essentiel à la synthèse de l'Hb dans les érythroblastes en cours de maturation. Bien que les CFU-E et Pro-EB soient EPO-dépendant, le processus de différenciation des Pro-EB en GR est fortement dépendant du fer (**Figure 2**) [152]. L'érythropoïèse nécessite 25 à 30 mg de fer pour produire chaque jour près de 200 milliards de GR dans la MO. Ce fer est fourni principalement par le recyclage du fer dérivé de l'Hb des GR en sénescence. En effet, moins de <1-2 mg de fer par jour provient de l'absorption intestinale due à l'alimentation [153]. Une carence en fer peut être associée à l'éryptose [154].

3.4. Régulation du fer par l'hepcidine

La principale hormone qui régule les taux de fer est l'hepcidine, une hormone peptidique produite dans le foie [155]. La production d'hepcidine est à son tour modulée de façon homéostatique par les concentrations en fer et donc par la disponibilité du fer pour l'érythropoïèse [156]. Pendant l'érythropoïèse, la production d'hepcidine est supprimée, ce qui augmente la disponibilité du fer pour la synthèse de l'Hb [157]. Dans le sang des patients atteints d'IRC, les taux d'hepcidine sont élevés, en partie à cause d'une clairance rénale inadéquate

[158]. Par conséquent, une production anormalement élevée d'hepcidine peut également contribuer au développement de l'anémie dans l'IRC [159]. Trois modulateurs érythroïdes ont été identifiés dans l'expression de l'hepcidine dans l'érythropoïèse: l'érythroferrone (ERFE), le facteur de différenciation/croissance 15 (GDF15) et la protéine Twisted Gastrulation Homolog 1 (TWSG1) [153]. Dans ce manuscrit, nous avons décidé de nous concentrer spécifiquement sur l'ERFE car elle est étroitement liée à l'EPO [160].

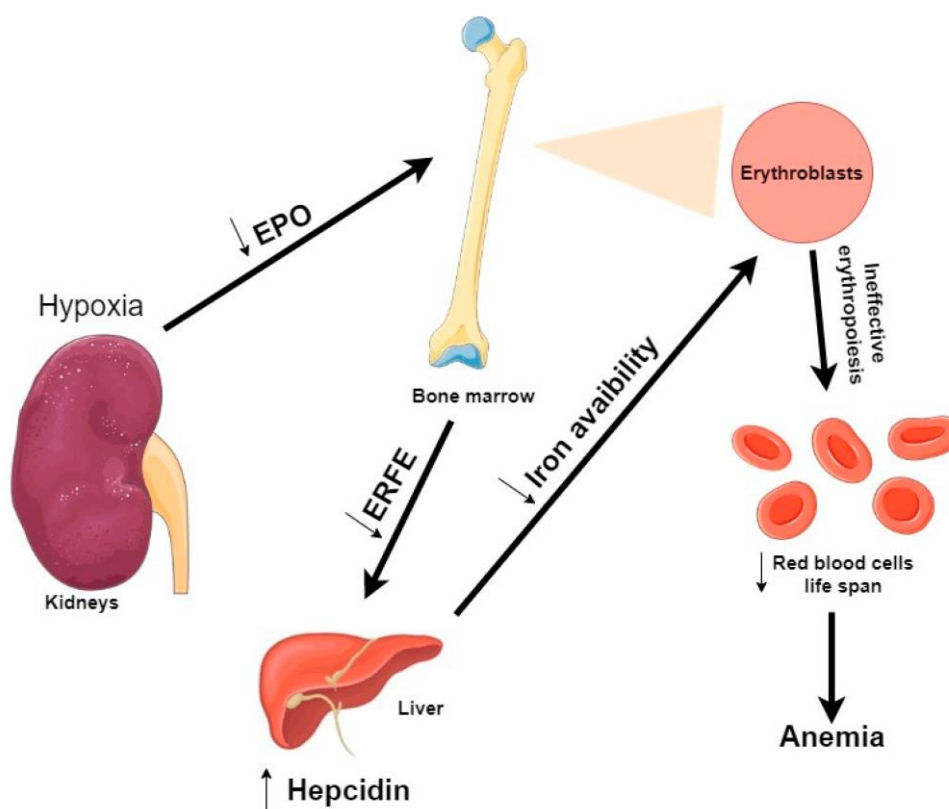


Figure 8. Vue d'ensemble de la régulation de l'érythropoïèse en condition urémique [83].

Abréviations : EPO, érythropoïétine ; ERFE, érythroferrone.

Le régulateur de l'expression de l'hepcidine le plus récemment découvert est l'ERFE, un membre de la famille des protéines C1q liées au facteur de nécrose tumorale [161]. L'ERFE est produit à partir d'un gène sensible à l'EPO par les érythroblastes en réponse à l'EPO. Pendant l'érythropoïèse de stress, définie comme la production rapide de nouveaux érythrocytes, l'ERFE supprime l'expression de l'hepcidine pour répondre à une demande d'EPO accrue [162].

En condition d'hypoxie, on a une augmentation de la production d'EPO par le rein, ce qui entraîne une augmentation de la production d'ERFE par les érythroblastes. À son tour, l'ERFE va diminuer l'hépcidine pour augmenter la biodisponibilité du fer [163].

En condition urémique, l'accumulation des toxines urémiques dans les reins conduit à une diminution de la production d'EPO (**Figure 8**). Par conséquent, les érythroblastes sont moins produits et la production d'ERFE est également diminuée. L'ERFE est le régulateur de l'hépcidine donc une diminution de la production d'ERFE entraîne une augmentation de l'hépcidine. Cela conduit ainsi à une diminution de la disponibilité du fer. En conséquence, de nombreux érythroblastes subissent une apoptose avant d'avoir achevé leur différenciation, ce qui entraîne une érythropoïèse inefficace et une production moindre de GR.

Dans l'étude de Kautz *et al.*, l'injection d'EPO à des souris a entraîné une augmentation de l'expression en l'ARNm de l'ERFE par les précurseurs érythroïdes dans les organes érythropoïétiques (MO et rate) [161].

Comme il a été démontré précédemment, l'accumulation d'IS supprime la production d'EPO en inhibant HIF [23]. Une étude récente a tenté de clarifier comment l'IS est impliqué dans le métabolisme du fer dans l'IRC [164]. Leurs expériences *in vitro* ont montré que l'IS augmente l'expression de l'hépcidine *via* les voies du récepteur AhR et celles médiées par le stress oxydatif. Par conséquent, l'IS semble être impliqué dans le métabolisme du fer en altérant l'utilisation de cet ion ce qui induit ainsi une érythropoïèse inefficace dans un contexte d'IRC.

3.5. Stratégies thérapeutiques pour l'anémie rénale

Les petites molécules hydrosolubles sont facilement éliminées par dialyse alors que d'autres composés nécessitent des stratégies d'élimination plus spécifiques [20]. En effet, les molécules de taille moyenne peuvent être mieux éliminées par des membranes de dialyse dont les pores sont plus larges, mais ce n'est pas le cas pour les composés liés aux protéines [20]. Par conséquent, à l'heure actuelle, le développement de nouvelles stratégies d'élimination et de procédures pharmacologiques innovantes sont nécessaires pour prévenir les complications liées à l'IRC.

L'anémie associée à l'IRC peut être traitée efficacement par des agents stimulant l'érythropoïèse (ASE), à base d'EPO humaine recombinante (rhEPO) comme l'époétine alfa, ou par une

supplémentation en fer par voie intraveineuse [165], [166]. La plupart des patients atteints d'IRC qui répondent à l'administration des ASE voient leur anémie améliorée, ce qui améliore leur qualité de vie et maintient les concentrations d'Hb dans les valeurs recommandées [167], [168]. Paradoxalement, bien que l'anémie soit améliorée, certains patients semblent être résistants à ces traitements [169]. En effet, une augmentation des effets indésirables a été notée chez ces patients, tels que l'aggravation de l'hypertension, l'HVG, la progression de la maladie rénale et un taux de mortalité plus élevé [166], [170], [171]. En fait, environ 10 % des patients souffrant d'anémie due à une IRC ne répondent pas au traitement par les ASE [168]. Pour une meilleure réponse aux ASE chez les patients en HD à long terme, les directives de la Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDOQI) recommandent un taux de saturation en fer (ISAT) supérieur à 20 % et une ferritine sérique supérieure à 200 ng/ml [172]. Lorsque ces deux prédicteurs sont inférieurs aux valeurs recommandées, les ASE deviennent hypersensibles [173].

L'optimisation du traitement par les ASE peut nécessiter une supplémentation en fer pour traiter l'anémie chez les patients atteints d'IRC [174]. Des études menées chez des patients atteints d'IRC sous dialyse montrent que l'utilisation d'une supplémentation en fer peut réduire la dose des ASE nécessaires et les risques qui leur sont associés [175], [176]. En fait, un apport insuffisant en fer est souvent la cause de l'échec d'un traitement par les ASE [174]. On considère aujourd'hui que, pour un traitement efficace de l'anémie chez les patients atteints d'IRC, il est nécessaire de combiner le traitement par les ASE et l'administration de fer [177].

Néanmoins, certains patients atteints d'IRC ne répondent pas de manière adéquate aux doses recommandées des ASE ou de fer. Une nouvelle approche thérapeutique potentielle pour le traitement de l'anémie consiste à stimuler la sécrétion d'EPO endogène par la stabilisation de HIF en utilisant des inhibiteurs du domaine PHD actifs par voie orale [178], [179], [143], [180]. Parmi eux, le Roxadustat (FG-4592) est un inhibiteur de PHD oral qui stimule l'érythropoïèse et régule le métabolisme du fer chez les patients atteints d'IRC. En 2019, Chen *et al.* ont démontré l'effet du traitement par Roxadustat sur l'anémie chez les patients sous dialyse [181]. Dans cette étude, les auteurs ont comparé le traitement par Roxadustat avec le traitement par l'EPO pendant 26 semaines. Ce travail a montré que le Roxadustat a conduit à une plus grande augmentation du taux d'Hb comparé à l'EPO dans le traitement de l'anémie. Une étude complémentaire menée par la même équipe a comparé le Roxadustat à un placebo pour le traitement de l'anémie chez des patients atteints d'IRC qui n'étaient pas sous dialyse pendant une période de 18 semaines [182]. Au cours de la 8^{ème} semaine, les patients ayant reçu le

traitement par Roxadustat ont vu leur taux d'Hb augmenter par rapport à ceux ayant reçu le placebo. Au cours de la période de traitement de 18 semaines qui a suivi, le traitement par Roxadustat a maintenu le taux d'Hb aux valeurs recommandées. Les inhibiteurs de PHD sont actuellement testés chez l'homme et ont montré plusieurs avantages par rapport aux ASE actuellement disponibles [144]. Ils sont plus simples et moins chers à produire, peuvent être administrés par voie orale, induisent une production intrinsèque plus stimulante d'EPO et diminuent les risques cardiovasculaires [183].

Enfin, nous aborderons l'absorbant oral AST-120, qui joue un rôle spécifique dans l'élimination de l'IS chez les patients atteints d'IRC. En effet, l'AST-120 diminue les taux sériques d'IS en absorbant l'indole dans les intestins et en stimulant ainsi son excrétion dans les fèces [184]–[187]. Il a été démontré que l'AST-120 ralentissait la progression de l'IRC mais aussi l'apparition de MCV [26]. Une autre étude a rapporté que l'administration d'AST-120, lorsqu'elle est associée à l'EPO, est associée à une amélioration des taux d'Hb [188]. Cette étude suggère que l'AST-120 peut améliorer la production d'EPO en abaissant les taux sériques d'IS dans un modèle animal [52]. Ces résultats offrent de nouvelles perspectives pour le développement de stratégies thérapeutiques pour une meilleure prise en charge de l'anémie chez les patients atteints d'IRC à un stade avancé.

Une recherche approfondie sur l'effet des toxines urémiques sur l'érythropoïèse durant l'IRC a fait l'objet d'une publication d'une revue dans le journal « *Cells* ».

Revue 1:

**Uremic Toxins Affect Erythropoiesis during the
Course of Chronic Kidney Disease: A Review**

<https://doi.org/10.3390/cells9092039>



Review

Uremic Toxins Affect Erythropoiesis during the Course of Chronic Kidney Disease: A Review

Eya Hamza ^{1,*}, Laurent Metzinger ^{1,*} and Valérie Metzinger-Le Meuth ^{1,2}

¹ HEMATIM UR 4666, C.U.R.S, Université de Picardie Jules Verne, CEDEX 1, 80025 Amiens, France; eya.hamza@etud.u-picardie.fr (E.H.); valerie.metzinger@univ-paris13.fr (V.M.-L.M.)

² INSERM UMRS 1148, Laboratory for Vascular Translational Science (LVTS), UFR SMBH, Université Sorbonne Paris Nord, CEDEX, 93017 Bobigny, France

* Correspondence: laurent.metzinger@u-picardie.fr; Tel.: +33-2282-5356

Received: 17 July 2020; Accepted: 4 September 2020; Published: 6 September 2020



Abstract: Chronic kidney disease (CKD) is a global health problem characterized by progressive kidney failure due to uremic toxicity and the complications that arise from it. Anemia consecutive to CKD is one of its most common complications affecting nearly all patients with end-stage renal disease. Anemia is a potential cause of cardiovascular disease, faster deterioration of renal failure and mortality. Erythropoietin (produced by the kidney) and iron (provided from recycled senescent red cells) deficiencies are the main reasons that contribute to CKD-associated anemia. Indeed, accumulation of uremic toxins in blood impairs erythropoietin synthesis, compromising the growth and differentiation of red blood cells in the bone marrow, leading to a subsequent impairment of erythropoiesis. In this review, we mainly focus on the most representative uremic toxins and their effects on the molecular mechanisms underlying anemia of CKD that have been studied so far. Understanding molecular mechanisms leading to anemia due to uremic toxins could lead to the development of new treatments that will specifically target the pathophysiologic processes of anemia consecutive to CKD, such as the newly marketed erythropoiesis-stimulating agents.

Keywords: chronic kidney disease; uremic toxins; anemia; erythropoietin; indoxyl sulfate; iron; erythropoiesis

1. Introduction

Chronic kidney disease (CKD) is a global public health problem characterized by a progressive loss of kidney function through the accumulation of uremic toxins leading to inflammation and endothelial dysfunction [1,2]. The European Uremic Toxin (EUTox) Work Group has compiled an authoritative list of 146 compounds as known uremic toxins and classified them into 3 groups based on their physicochemical characteristics such as the molecular weight, protein-binding capacity and removal pattern by dialysis [3–7]. Twenty-five solutes (27.8%) extracted from the sum of these uremic compounds are protein bound and are difficult to remove by dialysis, due to their protein binding capacity [8]. Furthermore, uremic toxins interact negatively with biologic functions when they are not eliminated by the kidneys. This interaction will be described more exhaustively in a further part of the manuscript.

Instead of being filtered and excreted by kidney, those uremic toxins accumulate in blood and lead to a deficient erythropoietin (EPO) production by the kidney interstitial fibroblasts (peritubular cells of kidneys), resulting in a defective erythropoiesis due to a decrease in erythrocyte production [9,10]. EPO deficiency and iron deficiency are the main reasons contributing to anemia, a well-known consequence of CKD. In this disease, the best available indicator of kidney function is the glomerular filtration rate (GFR), which estimates the total amount of blood filtered by the kidney that passes

through the glomeruli per unit of time. Patients with CKD are defined with a GFR inferior to 60 mL/min/1.73 m² in the span of at least 3 months while the normal GFR of a healthy person is more than 90 mL/min/1.73 m² [11–13]. End-stage renal disease (ESRD) occurs when the kidney function is below 15% of its normal capacity. Some of the risk factors that lead to common complications for CKD are shown in Figure 1 [14–16].

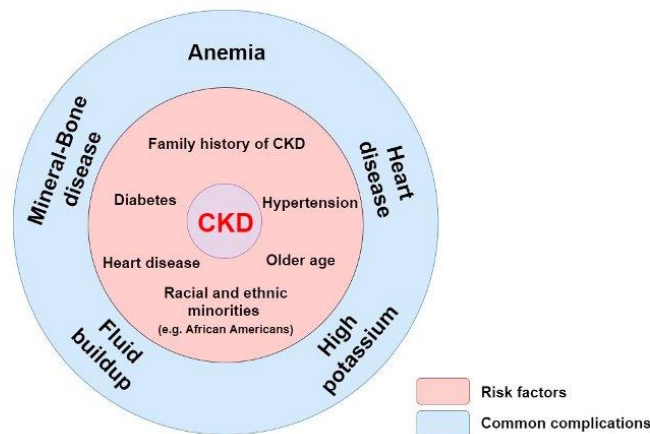


Figure 1. Risk factors and common complications for CKD. In pink are represented the risks factors: family history of CKD, hypertension, diabetes, heart disease, older age, and racial and ethnic minorities. In blue are represented the common complications: anemia, heart disease, mineral and bone disease, fluid buildup, and high potassium.

Among them, anemia, heart disease, mineral and bone disease (e.g., osteoporosis and uremic vascular calcification), high potassium (hyperkalemia) and fluid buildup (when extra fluid from the blood are not removed by the kidneys) constitute common complications of ESRD [17]. In some cases, the complications could be the consequence of a strategy treatment of a risk factor. It is the case of the development of hyperkalemia that is common in patients with heart and kidney disease. Because of the increasing use of drugs that antagonize the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS), hyperkalemia is encountered frequently in patients with established cardiovascular diseases (CVD) [18].

In this review, we mainly focus on CKD-associated anemia as it affects nearly all patients with ESRD [19]. Anemia is defined by the World Health Organization (WHO) as a hemoglobin concentration inferior to 13 g/dL in men and less than 12 g/dL in women [20]. Numerous studies have reported that a high percentage, approximately half of patients with ESRD in the United States, suffer from anemia due to EPO deficiency [11,21,22]. As shown in Figure 2, accumulation of uremic toxins impairs renal EPO synthesis, compromising the growth and differentiation of red blood cells (RBCs) in the bone marrow.

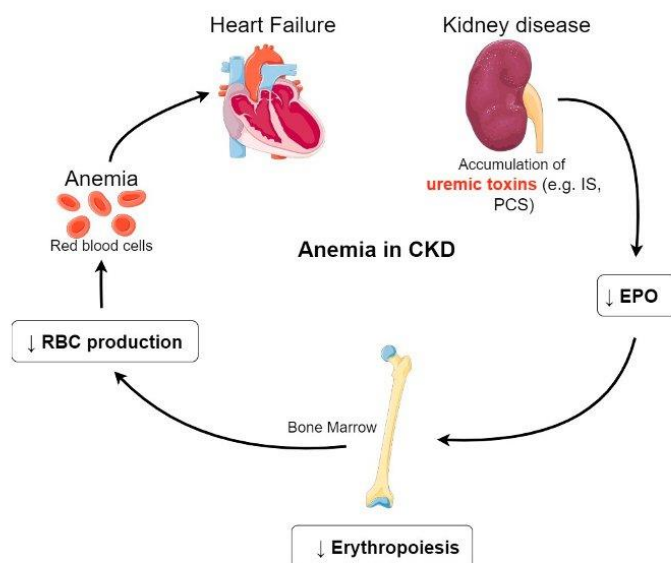


Figure 2. Anemia in CKD. Accumulation of uremic toxins induces a decrease of EPO production in the kidney. The decreased EPO synthesis compromises erythropoiesis in the bone marrow. This in turn results in a decrease of RBCs production leading to CKD-associated anemia. Abbreviations: CKD, chronic kidney disease; EPO, erythropoietin; RBCs, Red Blood Cells; IS, indoxyl sulfate; PCS, P-cresyl sulfate.

This in turn results in a decrease of RBCs production leading to CKD-associated anemia. This exposes patients to a high-risk for CVD (patients with hypertension and heart failure), which are the main cause of death for those patients [23,24]. Among them, we note the development and progression of a heart failure and of a left ventricular hypertrophy (LVH) that is commonly associated with CKD and anemia [25] (Figure 2).

The most common form of anemia classically seen in CKD is typically normocytic, normochromic, and hypoproliferative. Actually, anemia in CKD is a multifactorial condition, and aside from EPO deficiency, iron is also recognized as a major contributor in this disease [26]. Understanding erythropoiesis and its relationship with EPO and iron, leads to understand in part the pathophysiologic processes of anemia consecutive to CKD.

In this review, we discuss current knowledge of the uremic toxin's effects, focusing on the molecular mechanisms underlying anemia of CKD that are not completely understood and evaluating the new treatments designed to control anemia.

2. Uremic Toxins Are Central Players of the CKD Clinical Course

Uremia is attributed to the retention of several solutes, called uremic solutes or uremic toxins. When they are not removed by the kidneys, uremic toxins interact negatively with biologic functions. There is an evident association between increased concentration of uremic solutes and mortality or morbidity in the epidemiologic studies of CKD patients [27–31]. A first work in 2003 by the EuTox Work Group compiled an exhaustive list of uremic retention solutes, containing their mean normal concentration, their mean/median uremic concentration, their highest uremic concentration reported in patients, and their molecular weight (Table 1) [32].

Table 1. Physiochemical classification of Uremic Toxins by the EuTox Work Group.

Classification	Representative Solute	C _n	C _u	C _{max}	MW (kDa)	Ref
Free water-soluble solute	Urea (g/L)	<0.4	2.3 ± 1.1	4.6	60	[32,33]
	Creatinine (mg/L)	<12.0	136.0 ± 46.0	240.0	113	
Protein-bound solute	Indoxyl sulfate (mg/L)	0.6 ± 5.4	53.0 ± 91.5	236.0	251	[34,35]
	P-cresyl sulfate (mg/L)	0.6 ± 1.0	20.1 ± 10.5	40.7	108	
Middle molecule	β-2 microglobulin (mg/L)	<2.0	55.0 ± 7.9	100.0	11818	[36,37]

Abbreviations: C_N, normal concentration; C_U, mean/median uremic concentration; C_{MAX}, maximal uremic concentration; MW, molecular weight; ref, reference.

In 2012, an update of uremic retention solutes by the same group extended the classification to new uremic toxins in continuation of the work published in 2003 [6,32]. Based on their protein binding property and molecular weight, they are classified into three groups: small water-soluble molecules (<500 kDa), middle molecules (≥500 kDa), and protein-bound solutes. This collaborative group focused on measuring the normal and pathologic serum concentrations.

Compared to the small water-soluble molecules, which are easily removed during a standard dialysis, the middle molecules are removed through dialyzer membranes with a larger pore size [38,39]. Protein-bound molecules, on the other hand, are not easily removed with the current dialytic procedure due to the resistance induced by protein binding [40,41]. Even increasing pore size does not improve the removal [41].

2.1. Representative Uremic Toxins: Indoxyl Sulfate and P-Cresyl Sulfate

Of the large group of protein-bound solutes, indoxyl sulfate (IS) and P-cresyl sulfate (PCS), poorly removed by conventional dialysis, are the most studied and representative toxins [42–46].

Indoxyl sulfate is a metabolite derived from tryptophan via indole by colon microbes [47]. Briefly, indole is produced by bacterial degradation of tryptophan that is conjugated by the liver and converted into indoxyl sulfate. PCS is generated from the metabolism of tyrosine and phenylalanine by the intestinal flora and sulfated in the liver [47,48]. Both IS and PCS are small molecules, which are bound to plasma proteins at the extent of 90% (e.g., albumin [49]). Importantly, most of the studies have investigated IS and PCS at the same time. It has been shown that PCS is positively related with IS and its increase is correlated with renal function decline in CKD patients [50].

The following section will thus focus on IS, as it is known to be associated with numerous toxic effects, rather than the whole list of toxins. We summarize in Table 2 the most relevant pathophysiological roles of IS as found in the literature.

Table 2. The pathophysiological roles of Indoxyl sulfate.

The Pathophysiological Role of Indoxyl Sulfate	Reference
Inhibition of endothelial proliferation and wound repair	[2]
Progressive deterioration of renal function	[34,46,50–54]
Induction of oxidative stress	[55]
Increase of circulating EMPs release	[56]
Induces TF production via the AhR pathway	[57,58]
Development of uremic symptoms	[46,59]
Associated with pathogenesis of atherosclerosis	[60]
Increases mortality	[61]
Cardiovascular disease	[54,61–63]
Peripheral arterial disease	[61,64,65]

Abbreviations: EMPs, endothelial microparticles; TF, tissue factor; AhR, aryl hydrocarbon receptor.

It is now well documented that IS contributes to the progression of kidney failure [34,46,50–54]. Experimental work on uremic rats has demonstrated that administration of either indole (precursor of IS) or IS administration stimulates the progression of glomerular sclerosis [34,51]. Also, IS could be a valuable indicator in estimating the progression of renal function deterioration of renal function in advanced CKD patients [53,54]. Another study demonstrated that serum IS level increased gradually as renal function declined in CKD patients [50]. Furthermore, kidney fibrosis could be induced by IS by activating the intrarenal RAAS [52]. In CKD patients, IS-induced renal toxicity mainly occurs following induction of oxidative stress in endothelial cells due to an increase of NADPH oxidase activity and a decrease in antioxidant defense mechanisms [55]. In addition, IS decreases endothelial cell proliferation and wound repair in an in vitro model of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) [2]. Another in vitro study has shown that IS increases endothelial microparticles (EMPs) release and suggests that measuring EMPs levels could be a new marker of endothelial dysfunction in uremic patients [56]. Moreover, IS is also positively correlated with circulating tissue factor (TF) levels induced by the aryl hydrocarbon receptor (AhR) activation in endothelial cells and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) [57]. The increased TF production could participate in the acceleration of atherogenesis in CKD patients, but the authors suggest that this hypothesis has to be confirmed by relevant clinical studies [57]. Also, another study suggests that IS could modify the efflux transporter P-glycoprotein (P-gp) known to be involved in the nonrenal clearance of drugs through the AhR pathway [58]. Identifying the altered transporters may improve the use of drugs associated with CKD for these patients.

To summarize, IS is associated with the progressive deterioration of renal function, the development of uremic symptoms, alongside the pathogenesis of atherosclerosis, CVD, vascular damage, and mortality [34,46,50–54,59–65].

2.2. IS Effects in Renal Anemia

As described above, the toxic effects of IS are numerous. In this review, we will focus on the pathophysiological roles of IS that lead to the induction of renal anemia. Many of the IS effects in renal anemia are related to an impairment of renal EPO synthesis due to a suppression of transcription of the EPO gene in a hypoxia-induced factor (HIF)-dependent manner, aggravating the hypoxia on the kidney [43] (discussed later in this review). Although renal anemia is predominantly caused by an impaired EPO production, several other factors (e.g., iron deficiency) can worsen erythropoiesis in renal patients. Furthermore, IS contributes to the suicide of erythrocyte, known as eryptosis, characterized by erythrocyte shrinkage due to extracellular Ca^{2+} entry [66].

Another possible mechanism, described in a study by Adelibieke et al., to explain IS-induced anemia is the suppression of the EPO receptor (EPOR)-AKT pathway (intracellular signal transduction pathway that promotes survival and growth in response to extracellular signals) [67]. They speculated that IS suppresses EPO-induced phosphorylation of EPOR in HUVECs. The same study focuses on an additional mechanism that EPO induces the production of Thrombospondin-1 (TSP-1), an erythroid-stimulating factor. TSP-1 is known to stimulate erythroblast proliferation under EPO [68,69]. This is interesting as IS has been described to diminish EPO-induced TSP-1 expression in HUVECs by suppressing AKT phosphorylation [67].

Asai et al. provided in a recent study a putative molecular mechanism that could cause the progression of renal anemia. They provide evidence that AhR activation plays an important role on the suppressive effect of IS on HIF activation in HepG2 cells. When AhR is inactivated with a pharmacological AhR antagonist or an AhR-siRNA, they observe an abolishment of the suppressive effect of IS on HIF activation [70]. Moreover, IS might increase phosphatidylserine (PS) exposure and microparticles (MPs) release of RBCs due to the increase of cytosolic Ca^{2+} [71]. PS is a component of the cell membrane found preferentially in the inner leaflet. It is externalized in the outer membrane in combination with MPs release during apoptosis, providing early detection of apoptotic cells [72]. In the same study, the authors demonstrate that the Procoagulant Activity (PCA), promoting the coagulation

of blood, is due to the PS exposure and MPs release that might explain the cardiovascular events in CKD [71].

Another report demonstrated that IS is negatively and significantly associated with the EPO expression in CKD patients [73]. In the same study, using animal models, the inhibitory role of IS in the EPO expression has been indirectly confirmed. In fact, when they treated the CKD rats with AST-120 (oral administered intestinal sorbent that can absorb IS), they observed a decrease in seric IS levels and an increase in EPO expression. In contrast, an observational multicentric study including more patients did not show any link between IS and anemia [74]. A study of a larger cohort of patients suffering from CKD is needed in the future to determine whether or not uremic toxins play an important role in renal anemia.

A recent study, comparing healthy controls (CON-RBC) and hemodialyzed patients (HD-RBC) respectively, investigated the mechanism by which IS induces oxidative stress and eryptosis in RBCs [75]. In this paper, Dias et al. suggests that IS increases reactive oxygen species (ROS) generation and eryptosis in CON-RBC. This happens through the organic anion transporter 2 (OAT2) (present in the RBCs surface) and in both NADPH oxidase activity-dependent and glutathione (GSH)-independent mechanism. These findings lend support to an important role of IS in the development of renal anemia.

To conclude, these findings globally support the role of IS in the regulation and development of renal anemia and are summarized in Table 3.

Table 3. Role of IS in the regulation of renal anemia.

The Pathophysiologic Roles of IS	Molecular Mechanisms	References
Impairment of erythropoiesis in a HIF dependent manner	Suppression of the EPO gene transcription during hypoxia	[43]
Stimulates eryptosis	Extracellular Ca^{2+} entry with subsequent stimulation of cell shrinkage and cell membrane scrambling	[66]
Might contribute to EPO resistance and endothelial dysfunction	IS inhibits EPO-Induced Phosphorylation of EPOR IS inhibits TSP-1 expression through suppression of the AKT phosphorylation	[67]
Suppression of HIF activation	IS-induced AhR activation	[70]
Increased PCA in RBCs	Due to PS exposure and RBCs-derived microparticles release	[71]
EPO decrease	IS negatively regulates the EPO expression	[73]
IS-induced RBCs death	Through OAT2, and NADPH oxidase activity-dependent, and a GSH-independent mechanism	[75]

Abbreviations: HIF, hypoxia-induced factor; EPO, erythropoietin; EPOR, erythropoietin receptor; IS, indoxyl sulfate; TSP-1, Thrombospondin-1; AhR, the aryl hydrocarbon receptor; PCA, Procoagulant Activity; PS, Phosphatidylserine; RBCs, red blood cells; OAT2, Organic Anion Transporter 2; GSH, glutathione.

2.3. Other Uremic Toxins Implicated in Erythropoiesis

Apart from IS, some other protein-bound uremic toxins have been reported to play a role in renal anemia process by mechanisms independent of EPO production.

In patients with ESRD, polyamines have been reported to reduce proliferation and maturation of erythroid precursor cells (CFU-E) by acting as inhibitors of erythropoiesis [76]. Some studies about polyamines confirm the hypothesis that polyamines are intimately involved in the development and progression of anemia pathogenesis in ESRD [76–78]. For example, acrolein stimulates the formation of ceramide that in turn induces eryptosis by triggering cell membrane scrambling and cell shrinkage when exposed to cytosolic Ca^{2+} [79]. All those studies suggest an important role, not only of IS but also of other uremic toxins, in the development of renal anemia. Further studies will however have to be undertaken to understand an eventual cumulative mechanism of these toxins.

In the field, it is also possible to cultivate cell cultures with serum from uremic patients to see the effect of the sum of uremic toxins accumulated in the blood of CKD patients. To our knowledge, only one study published in 1983 suggests a potential mechanism of uremic sera on erythropoiesis

inhibition [80]. This study has shown an inhibitory effect of uremic serum from CKD patients on the proliferation in vitro of erythroid progenitor cells. To date, however, the toxic and inhibitory effects of uremic toxins on erythropoiesis are not totally understood.

3. Physiopathology of Anemia in CKD

HIF is activated in order to stimulate the production of EPO in response to a decreased oxygen delivery [81]. In a pathological context, this is the case during the course of anemia. HIF is a heterodimer with a hypoxia-inducible factor alpha-subunit (HIF- α), and a constitutively expressed beta-subunit (HIF- β). The two isoforms of HIF- α (HIF-1 α and HIF-2 α) are strictly dependent on hypoxia. Moreover, it has been demonstrated that HIF-2 α is the most important isoform in mediating the response of anemia as a key regulator of erythropoiesis and iron metabolism [82–87].

3.1. Regulation of HIF in Kidney Disease

The expression of HIF- α is mainly regulated by proteosomal degradation [88,89] (Figure 3).

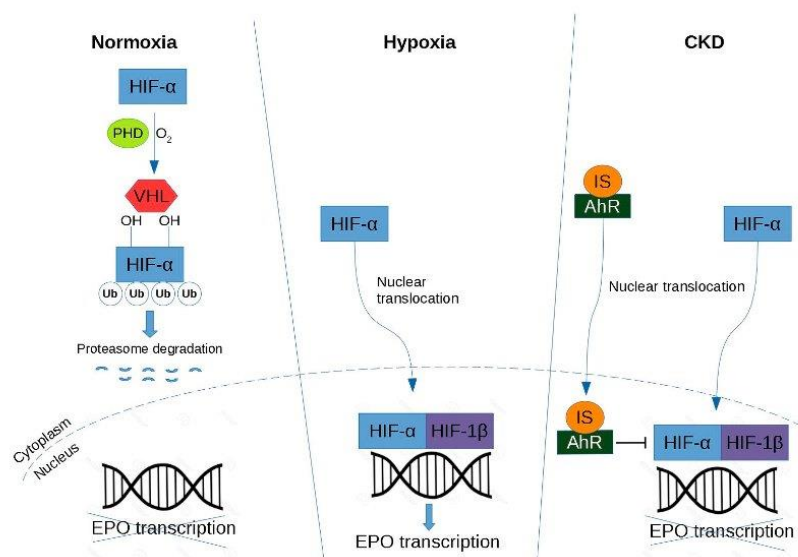


Figure 3. Regulation of hypoxia-inducible factor in renal erythropoietin-producing cells. Abbreviations are: HIF, hypoxia-inducible factor; PHD, prolyl hydroxylase domain; VHL, von Hippel-Lindau-E3-ubiquitin ligase complex; Ub, ubiquitylation; EPO, erythropoietin; AhR, aryl hydrocarbon receptor; IS, indoxyl sulfate.

Under normoxic conditions, HIF- α is hydroxylated by prolyl hydroxylase domain (PHD) protein [90]. The proline-hydroxylated HIF-1 α is then recognized by von Hippel-Lindau (VHL)-E3-ubiquitin ligase complex, polyubiquitinated and degraded in the proteasome. In contrast, under hypoxic conditions, HIF- α escapes from hydroxylation mediated by PHD [90]. HIF- α forms a heterodimer with HIF- β . Therefore, the HIF heterodimer binds to the hypoxia response element (HRE) in the regulatory region of target genes (e.g., EPO) and promotes transcription of these genes.

A study of Bernhardt et al. suggests that PHD inhibitors (FG-2216) can stabilize HIF levels by preventing hydroxylation, promoting dimerization and stimulating endogenous EPO production in the kidneys of hemodialyzed patients, suggesting a new therapeutic approach for CKD [91]. In other words,

pharmacologic PHD inhibitors could offer a new approach for the treatment of anemia (discussed later in the review).

Under normoxia, HIF- α is hydroxylated by PHD protein, then recognized by VHL-E3-ubiquitin ligase complex, and directed to the proteasome for degradation. Under hypoxia, HIF- α accumulates in the nucleus and dimerizes with HIF- β , and together they lead to transcription of EPO. Under CKD, the mechanism is similar to the hypoxic condition except that IS activates the AhR receptor that in turn inhibits HIF leading to a decrease of EPO production.

3.2. Impairment of IS-Induced HIF Activation

In CKD, both HIF-1 and HIF-2 are activated, so it is difficult to determine their individual effects on anemia [92]. However, HIF-2 α is a key regulator of hypoxic EPO induction [93] and could induce a severe anemia when deleted from renal tissue [94]. As revealed in the study of Chiang et al., IS potentially suppresses EPO expression in a HIF-dependent manner both in vitro and in vivo [43]. In hypoxic condition, IS is able to impair erythropoiesis by suppressing the EPO gene transcription via inhibition of HIF activation. These relationships between HIF and IS were confirmed in an independent study in which IS inhibits the hypoxic induction of HIF-1 target genes causing functional impairment of the HIF-1 α C-terminal transactivation domain (CTAD) in human kidney (HK-2) proximal tubular cells [95]. Furthermore, as previously seen, IS activates the transcription factor AhR in HUVECs [57]. In addition, AhR activation plays an indispensable role on the suppressive effect of IS on HIF activation and subsequent EPO production in hepatocellular cells (HepG2) [70]. That could be one of the molecular mechanisms by which renal anemia is caused.

3.3. EPO and Regulation of Erythropoiesis

Erythropoiesis is a multistep process in which mature RBCs are generated from hematopoietic stem cells (HSCs) in bone marrow (BM). It is a highly regulated process in which HSCs proliferate and differentiate consecutively into burst-forming unit-erythroid (BFU-E), colony-forming unit-erythroid (CFU-E), proerythroblasts (Pro-EB), erythroblasts (EB), reticulocytes (Retic), and mature RBCs (or erythrocytes) in the circulation, consecutively (Figure 4).

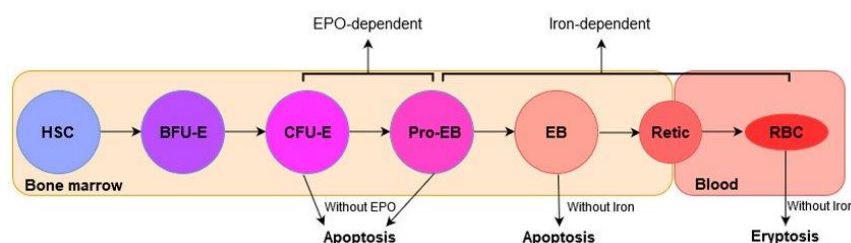


Figure 4. Overview of erythropoiesis. HSC differentiates into RBC, as indicated by the arrows. Stages of erythropoiesis EPO-dependent and Iron-dependent are indicated. Abbreviations are: HSC, hematopoietic stem cell; BFU-E, burst-forming unit-erythroid; CFU-E, colony-forming unit-erythroid; Pro-EB, proerythroblasts; EB, erythroblasts; Retic, reticulocytes; RBC, mature RBCs; EPO, erythropoietin.

It is known that a defect in erythropoiesis could lead to hematological diseases [96].

EPO is the key hormone that regulates erythropoiesis. In the bone marrow, erythroid cells expressing EPOR are found mainly at later stages, erythroid progenitor CFU-E and proerythroblasts [97]. Furthermore, EPO acts synergistically with other cytokines (e.g., SCF) in the bone marrow to cause maturation and proliferation from the stage CFU-E and Pro-EB (both EPO-dependent) to the erythroblast stage of erythropoiesis [98,99].

The interaction between EPO and its receptor is the main trigger involved in erythropoiesis regulation. The binding of EPO to EPOR stimulates erythroid cell division and proliferation and inhibits erythroid progenitor apoptosis [97]. Upon binding to EPO, EPOR homodimerizes at the cell surface and the signal transduction cascade is initiated [100,101]. An intracellular signaling occurs by the induction of tyrosine phosphorylation of JAK2 kinase, that in turn phosphorylates other proteins to transduce a growth signal [102].

EPO binds to the receptor and generates intracellular signals to rescue the late CFU-E cells from apoptosis and increase their survival and proliferation [99]. During this process, the transcription factor HIF-2 α promotes erythropoiesis, by regulating EPO synthesis and enhancing iron uptake [103].

3.4. The Role of Iron in the Regulation of Erythropoiesis

Iron is an essential mineral required for hemoglobin synthesis in maturing erythroblasts. Although the progenitors CFU-E and Pro-EB are EPO-dependent, the differentiation process from proerythroblasts to red blood cells (or erythrocytes) is strongly iron-dependent (Figure 4) [104]. Erythropoiesis requires 25–30 mg of iron to produce almost 200 billion red blood cells in the bone marrow each day. This iron is provided primarily from recycling hemoglobin-derived iron of old and senescent red cells. Indeed, less than <1–2 mg of new iron daily derives daily from intestinal absorption [105]. A study revealed that eryptosis could be associated with iron deficiency [106].

3.5. Hepcidin and Regulation of Serum Iron Levels

The main hormone that regulates iron levels is hepcidin, a peptide hormone produced in the liver [107]. In turn, hepcidin production is homeostatically modulated by iron concentrations and thereby iron availability for erythropoiesis [108]. During erythropoiesis, hepcidin production is suppressed, thus increasing iron availability for hemoglobin synthesis [109]. In CKD patient's blood, hepcidin levels are elevated, in part due to inadequate kidney clearance [110]. Therefore, abnormal elevated hepcidin production may contribute to the development of anemia in CKD [111]. There are three identified erythroid modulators of hepcidin expression in ineffective erythropoiesis: Erythroferrone (ERFE), Growth differentiation factor 15 (GDF15), and Twisted gastrulation protein homolog 1 (TWSG1) [105]. In this review, we decided to focus specifically on erythroferrone because it is closely related to EPO [112].

The most recently discovered regulator of hepcidin expression is ERFE, a member of the C1q-tumor necrosis factor-related family of proteins [113]. ERFE is an EPO-responsive gene produced by erythroblasts in response to EPO (Figure 5). During stress erythropoiesis, defined as the rapid production of new erythrocytes, ERFE suppresses hepcidin expression to respond to an increased erythropoietic demand [114]. In Kautz et al. study, EPO injections into mice (within 4 h) resulted in an increase of ERFE mRNA expression by erythroid precursors in the erythropoietic organs (bone marrow and spleen) [113]. In response to anemia, hypoxia induces an increase of EPO production by the kidney, which stimulates erythroblasts to increase ERFE production and thereby suppress hepcidin [115].

As previously shown, IS accumulation suppresses EPO production by inhibiting HIF [43]. A recent study tried to clarify how IS is involved in iron metabolism in CKD [116]. Their in vitro experiments showed that IS enhances hepcidin expression via both AhR and oxidative stress-mediated pathways. Therefore, IS seems to be involved in iron metabolism by impairing iron utilization and promoting an inadequate erythropoiesis in the CKD context.

Also, it is to be noted that even if uremic toxins such as IS and PCS strongly aggravate anemia in advanced CKD and ESRD, renal anemia in this setting is primarily related to a decreased production of EPO by diseased kidneys (with interstitial fibrosis and reduced renal mass of cells producing EPO with the exception of genetic polycystic disease; cases of enlarged kidneys in diabetic and amyloid nephropathies with deposits of amorphous specific material have also a reduction of EPO-producing cells), together with a lowered set point for EPO production in case of hemorrhage. This decrease in

EPO production is associated with true iron deficiency related to blood loss due to uremic enteropathy and hemodialysis treatment aggravated by iron-restricted anemia (linked to high levels of hepcidin).

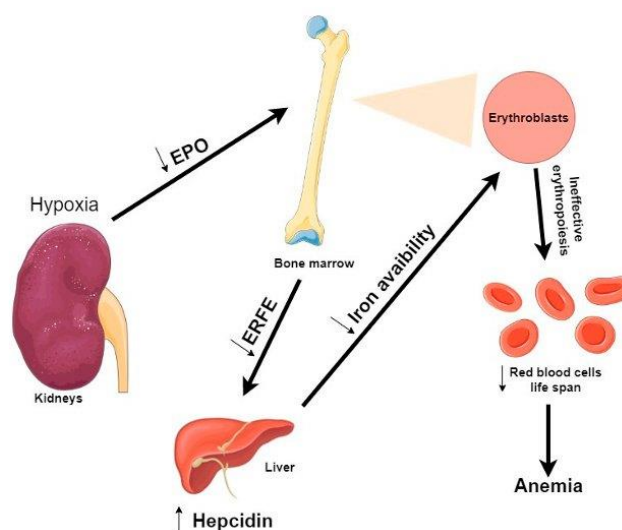


Figure 5. Overview of erythropoiesis regulation in uremic condition. During hypoxia and in a CKD condition, accumulation of uremic toxins by the kidneys leads to a decrease of EPO production. During erythropoiesis, because erythroblasts are less produced, ERFE production is decreased. As ERFE is the regulator of hepcidin, a decrease of ERFE production leads to an increase of hepcidin. Thus, leading to a decrease of iron availability. As a consequence, many erythroblasts incur apoptosis before completing differentiation, causing an ineffective erythropoiesis and fewer red blood cells are produced. Abbreviations: EPO, erythropoietin; ERFE, Erythroferrone.

4. Current Strategies of Renal Anemia Treatment

Small water-soluble compounds are easily withdrawn by dialysis while other compounds need more specific removal strategies [40]. Indeed, middle molecules can be better removed by dialysis membranes with a larger pore to allow their passage, but this is not the case for the protein-bound compounds [40]. Therefore, at present, a development of new elimination strategies and innovative pharmacological procedures is necessary to prevent the related complications of CKD (Table 4).

Table 4. Current strategies used to treat renal anemia.

Current Strategies	Reference
ESA	[117–125]
Iron supplementation	[126–128]
PHD inhibitors	[91,129–132]
AST-120	[73,133–137]

Abbreviations: ESA, erythropoiesis-stimulating agents; PHD, prolyl hydroxylase domain.

The anemia associated with CKD can be managed effectively by the erythropoiesis-stimulating agents (ESA), based on recombinant human erythropoietin (rHU EPO) such as epoetin alfa, or intravenous iron supplementation [117,118]. Most patients with CKD that respond to ESA administration experience correction of anemia, improving quality of life and maintaining hemoglobin

concentrations within the recommended target range [119,120]. However, paradoxically, although correcting anemia, some patients seem to be resistant to such treatments [121]. An increase of adverse effects was noted such as worsening hypertension, left ventricular hypertrophy, progression of kidney disease, and higher mortality rate [118,122,123]. In fact, approximately 10% of patients with anemia due to CKD are hyporesponsive to ESA therapy [120]. For a better ESA response in long-term HD patients, the Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDOQI) guidelines recommend an iron saturation ratio (ISAT) above 20% and a serum ferritin above 200 ng/mL [124]. When those two predictors are less than the recommended values, ESA becomes hyporesponsive [125].

Optimization of ESA therapy may require iron supplementation for treatment of anemia in patients with CKD [126]. Studies in patients with CKD under dialysis demonstrate that the use of iron supplementation can lower ESA dose requirements and might reduce the risks associated with ESA therapy [127,128]. In fact, an inadequate amounts of iron supply commonly causes an unsuccessful ESA treatment [126]. It is now considered that, for an effective anemia treatment in patient with CKD to be effective, requirement of combined ESA therapy and iron administration is needed [138].

Nevertheless, some patients with CKD do not adequately respond to recommended ESA or iron doses. A potential novel therapeutic approach for anemia treatment consists of the stimulation of endogenous erythropoietin secretion through HIF stabilization using orally active HIF prolyl-hydroxylase domain inhibitors (PHIs) [91,129,130,139]. Among them, Roxadustat (FG-4592) is an oral PHI that stimulates erythropoiesis and regulates iron metabolism in ESRD patients. A study has demonstrated the effect of Roxadustat treatment on anemia in patients undergoing dialysis [140]. In the present trial, they compared Roxadustat therapy with epoetin alfa therapy for 26 weeks. This study showed that Roxadustat led to a greater increase of hemoglobin level than epoetin alfa in the treatment of anemia. A complementary study by the same team compared Roxadustat and placebo for the treatment of anemia on patients with CKD who were not undergoing dialysis for an 18-week period [131]. Over week 8, patients administered with Roxadustat treatment had a hemoglobin level increased compared to those with placebo. During the subsequent 18-week open-label treatment period, Roxadustat maintained hemoglobin levels. PHIs are currently being tested in humans and have shown several advantages compared to the ESA currently available: they are simpler and cheaper to produce, can be orally administered, induce more stimulating intrinsic EPO production and decrease cardiovascular risks [132].

Finally, we will discuss the oral absorbent AST-120, which specifically plays a role in the removal of IS from CKD patients. In fact, AST-120 decreases the serum levels of IS by absorbing indole in the intestines and thereby stimulating its excretion into feces [133–136]. It was shown that AST-120 slowed the progression of CKD but also the appearance of CVD [46]. Another study has reported that AST-120 administration, when associated with an EPO stimulating agent, is associated with an improvement of hemoglobin levels [137]. This study suggests that AST-120 may improve the EPO production by lowering serum IS levels in an animal model [73]. These findings offer new insights to the development of novel therapeutic strategies to manage anemia in late-stage CKD patients.

5. Conclusions

In conclusion, anemia associated with CKD is a multifactorial condition that can be induced by EPO and/or iron deficiency. The knowledge of the uremic toxin's effects demonstrated by the *in vivo* and *in vitro* studies allows us to better understand the current molecular mechanisms. This review underlies the physiopathology of anemia in CKD focusing on a potential mechanism of EPO on iron regulation in uremic condition. Therefore, the understanding of the pathophysiological mechanisms gives an overview of the current strategies of treatment to manage renal anemia.

Author Contributions: Conceptualization, E.H., V.M.-L.M. and L.M.; Writing—original draft preparation, E.H.; Writing—review and editing, V.M.-L.M. and L.M.; Funding acquisition, V.M.-L.M. and L.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The authors acknowledge the Société Francophone de Néphrologie, Dialyse et Thérapeutique (SFNDT) for funding and the French Ministry of Research (MESRI) (E.H. PhD grant).

Acknowledgments: We thank Loïc Garçon for critical reviewing of the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Stam, F.; Van Guldener, C.; Schalkwijk, C.G.; Ter Wee, P.M.; Donker, A.J.M.; Stehouwer, C.D.A. Impaired renal function is associated with markers of endothelial dysfunction and increased inflammatory activity. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2003**, *18*, 892–898. [CrossRef] [PubMed]
2. Dou, L.; Bertrand, E.; Cerini, C.; Faure, V.; Sampol, J.; Vanholder, R.; Berland, Y.; Brunet, P. The uremic solutes p-cresol and indoxyl sulfate inhibit endothelial proliferation and wound repair. *Kidney Int.* **2004**, *65*, 442–451. [CrossRef] [PubMed]
3. Vanholder, R.C.; Glorieux, G.; De Smet, R.; Lameire, N. New insights in uremic toxins. *Kidney Int.* **2003**, *63*, S6–S10. [CrossRef] [PubMed]
4. Vanholder, R.; Baurmeister, U.; Brunet, P.; Cohen, G.; Glorieux, G.; Jankowski, J. A Bench to Bedside View of Uremic Toxins. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2008**, *19*, 863–870. [CrossRef]
5. Yavuz, A.; Tetta, C.; Ersoy, F.F.; D’Intini, V.; Ratanarat, R.; De Cal, M.; Bonello, M.; Bordoni, V.; Salvatori, G.; Andrikos, E.; et al. Reviews: Uremic Toxins: A New Focus on an Old Subject. *Semin. Dial.* **2005**, *18*, 203–211. [CrossRef] [PubMed]
6. Duranton, F.; Cohen, G.; De Smet, R.; Rodriguez, M.; Jankowski, J.; Vanholder, R.; Argilés, A. Normal and Pathologic Concentrations of Uremic Toxins. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2012**, *23*, 1258–1270. [CrossRef]
7. Neiryneck, N.; Vanholder, R.; Schepers, E.; Elloot, S.; Pletinck, A.; Glorieux, G. An update on uremic toxins. *Int. Urol. Nephrol.* **2012**, *45*, 139–150. [CrossRef]
8. Lisowska-Myjak, B. Uremic Toxins and Their Effects on Multiple Organ Systems. *Nephron Clin. Pr.* **2014**, *128*, 303–311. [CrossRef]
9. MacDougall, I.C. Role of uremic toxins in exacerbating anemia in renal failure. *Kidney Int.* **2001**, *59*, S67–S72. [CrossRef]
10. Ratcliffe, P.J. Molecular biology of erythropoietin. *Kidney Int.* **1993**, *44*, 887–904. [CrossRef]
11. Hsu, C.-Y.; McCulloch, C.; Curhan, G.C. Epidemiology of anemia associated with chronic renal insufficiency among adults in the United States: Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2002**, *13*, 7.
12. Nangaku, M.; Eckardt, K.-U. Pathogenesis of Renal Anemia. *Semin. Nephrol.* **2006**, *26*, 261–268. [CrossRef] [PubMed]
13. Astor, B.C.; Muntner, P.; Levin, A.; Eustace, J.A.; Coresh, J. Association of Kidney Function With Anemia. *Arch. Intern. Med.* **2002**, *162*, 1401–1408. [CrossRef] [PubMed]
14. Bello, A.K.; Alruhaimi, M.; Ashuntantang, G.E.; Basnet, S.; Rotter, R.C.; Douthat, W.G.; Kazancioglu, R.; Köttgen, A.; Nangaku, M.; Powe, N.R.; et al. Complications of chronic kidney disease: Current state, knowledge gaps, and strategy for action. *Kidney Int. Suppl.* **2017**, *7*, 122–129. [CrossRef] [PubMed]
15. Chauhan, V. The 3 Most Common Causes of Chronic Kidney Disease, Verywell Health, Posted July 24, 2019. Available online: <https://www.verywellhealth.com/common-causes-of-chronic-kidney-disease-2085786> (accessed on 22 February 2020).
16. Kazancioglu, R. Risk factors for chronic kidney disease: An update. *Kidney Int. Suppl.* **2013**, *3*, 368–371. [CrossRef] [PubMed]
17. Thomas, R.; Kanso, A.; Sedor, J.R. Chronic Kidney Disease and Its Complications. *Prim. Care: Clin. Off. Pr.* **2008**, *35*, 329–344. [CrossRef]
18. Khanna, A.; White, W.B. The Management of Hyperkalemia in Patients with Cardiovascular Disease. *Am. J. Med.* **2009**, *122*, 215–221. [CrossRef] [PubMed]
19. NKF-K, I.V. Clinical Practice Guidelines for Anemia of Chronic Kidney Disease: Update. *Am. J. Kidney Dis.* **2001**, *37*, S182–S238. [CrossRef]
20. WHO Scientific Group. *Nutritional Anemias*; Technical Report Series No. 405; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 1968; Available online: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/40707/WHO_TRS_405.pdf (accessed on 27 March 2020).

21. McClellan, W.M.; Aronoff, S.L.; Bolton, W.K.; Hood, S.; Lorber, D.L.; Tang, K.L.; Tse, T.F.; Wasserman, B.; Leiserowitz, M. The prevalence of anemia in patients with chronic kidney disease. *Curr. Med Res. Opin.* **2004**, *20*, 1501–1510. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Patel, K.V. Epidemiology of Anemia in Older Adults. *Semin. Hematol.* **2008**, *45*, 210–217. [\[CrossRef\]](#)
23. Weiner, D.E.; Tighiouart, H.; Vlagopoulos, P.T.; Griffith, J.L.; Salem, D.N.; Levey, A.S.; Sarnak, M.J. Effects of Anemia and Left Ventricular Hypertrophy on Cardiovascular Disease in Patients with Chronic Kidney Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2005**, *16*, 1803–1810. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Sarnak, M.J.; Levey, A.S.; Schoolwerth, A.C.; Coresh, J.; Culleton, B.; Hamm, L.L.; McCullough, P.A.; Kasiske, B.L.; Kelepouris, E.; Klag, M.J.; et al. Kidney Disease as a Risk Factor for Development of Cardiovascular Disease. *Hypertens.* **2003**, *42*, 1050–1065. [\[CrossRef\]](#)
25. Cases, A.; Coll, E.; Collado, S. Anemia en la insuficiencia renal crónica y sus implicaciones cardiovasculares. *Med. Clínica* **2009**, *132*, 38–42. [\[CrossRef\]](#)
26. Agarwal, A.K. Practical Approach to the Diagnosis and Treatment of Anemia Associated With CKD in Elderly. *J. Am. Med. Dir. Assoc.* **2006**, *7*, S7–S12. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Wagner, Z.; Molnár, M.; Molnár, G.A.; Tamaskó, M.; Laczy, B.; Wagner, L.; Csiky, B.; Heidland, A.; Nagy, J.; Wittmann, I. Serum Carboxymethyllysine Predicts Mortality in Hemodialysis Patients. *Am. J. Kidney Dis.* **2006**, *47*, 294–300. [\[CrossRef\]](#)
28. Liabeuf, S.; Barreto, D.V.; Barreto, F.C.; Meert, N.; Glorieux, G.; Schepers, E.; Temmar, M.; Choukroun, G.; Vanholder, R.; Massy, Z.A.; et al. Free p-cresylsulphate is a predictor of mortality in patients at different stages of chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2009**, *25*, 1183–1191. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Block, G.A.; Klassen, P.S.; Lazarus, J.M.; Ofsthun, N.; Lowrie, E.G.; Chertow, G.M. Mineral Metabolism, Mortality, and Morbidity in Maintenance Hemodialysis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2004**, *15*, 2208–2218. [\[CrossRef\]](#)
30. Bammens, B.; Evenepoel, P.; Keuleers, H.; Verbeke, K.; Vanrenterghem, Y. Free serum concentrations of the protein-bound retention solute p-cresol predict mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int.* **2006**, *69*, 1081–1087. [\[CrossRef\]](#)
31. Cheung, A.K.; Rocco, M.V.; Yan, G.; Leypoldt, J.K.; Levin, N.W.; Greene, T.; Agodoa, L.; Bailey, J.; Beck, G.J.; Clark, W.; et al. Serum β -2 Microglobulin Levels Predict Mortality in Dialysis Patients: Results of the HEMO Study. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2005**, *17*, 546–555. [\[CrossRef\]](#)
32. Vanholder, R.C.; De Smet, R.; Glorieux, G.; Argilés, A.; Baurmeister, U.; Brunet, P.; Clark, W.; Cohen, G.; De Deyn, P.P.; Deppisch, R.; et al. Review on uremic toxins: Classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int.* **2003**, *63*, 1934–1943. [\[CrossRef\]](#)
33. Wengle, B.; Hellström, K. Volatile Phenols in Serum of Uraemic Patients. *Clin. Sci.* **1972**, *43*, 493–498. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Niwa, T.; Ise, M. Indoxyl sulfate, a circulating uremic toxin, stimulates the progression of glomerular sclerosis. *J. Lab. Clin. Med.* **1994**, *124*, 96–104. [\[CrossRef\]](#)
35. Hida, M.; Aiba, Y.; Sawamura, S.; Suzuki, N.; Satoh, T.; Koga, Y. Inhibition of the Accumulation of Uremic Toxins in the Blood and Their Precursors in the Feces after Oral Administration of Lebenin®, a Lactic Acid Bacteria Preparation, to Uremic Patients Undergoing Hemodialysis. *Nephron* **1996**, *74*, 349–355. [\[CrossRef\]](#)
36. Kabanda, A.; Jadoul, M.; Pochet, J.M.; Lauwerys, R.; Strihou, C.V.Y.D.; Bernard, A. Determinants of the serum concentrations of low molecular weight proteins in patients on maintenance hemodialysis. *Kidney Int.* **1994**, *45*, 1689–1696. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Stein, G.; Franke, S.; Mahiout, A.; Schneider, S.; Sperschneider, H.; Borst, S.; Vienken, J. Influence of dialysis modalities on serum AGE levels in end-stage renal disease patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2001**, *16*, 999–1008. [\[CrossRef\]](#)
38. Vanholder, R.C.; Ringoir, S.M. Adequacy of dialysis: A critical analysis. *Kidney Int.* **1992**, *42*, 540–558. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Owen, W.F.; Lew, N.L.; Liu, Y.; Lowrie, E.G.; Lazarus, J.M. The Urea Reduction Ratio and Serum Albumin Concentration as Predictors of Mortality in Patients Undergoing Hemodialysis. *N. Engl. J. Med.* **1993**, *329*, 1001–1006. [\[CrossRef\]](#)
40. Dhondt, A.; Vanholder, R.; Van Biesen, W.; Lameire, N. The removal of uremic toxins. *Kidney Int.* **2000**, *58*, S47–S59. [\[CrossRef\]](#)

41. Lesaffer, G.; De Smet, R.; Lameire, N.; Dhondt, A.; Duym, P.; Vanholder, R.C. Intradialytic removal of protein-bound uraemic toxins: Role of solute characteristics and of dialyser membrane. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2000**, *15*, 50–57. [\[CrossRef\]](#)
42. Liabeuf, S.; Drüeke, T.B.; Massy, Z.A. Protein-Bound Uremic Toxins: New Insight from Clinical Studies. *Toxins* **2011**, *3*, 911–919. [\[CrossRef\]](#)
43. Chiang, C.-K.; Tanaka, T.; Inagi, R.; Fujita, T.; Nangaku, M. Indoxyl sulfate, a representative uremic toxin, suppresses erythropoietin production in a HIF-dependent manner. *Lab. Investig.* **2011**, *91*, 1564–1571. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Chiang, C.-K.; Tanaka, T.; Nangaku, M. Dysregulated Oxygen Metabolism of the Kidney by Uremic Toxins: Review. *J. Ren. Nutr.* **2012**, *22*, 77–80. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Vanholder, R.; Van Laecke, S.; Glorieux, G. What is new in uremic toxicity? *Pediatr. Nephrol.* **2008**, *23*, 1211–1221. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Niwa, T. Uremic toxicity of indoxyl sulfate. *Nagoya J. Med. Sci.* **2010**, *72*, 1–11.
47. Vanholder, R.; Smet, R.D. Pathophysiologic Effects of Uremic Retention Solutes. *JASN* **1999**, *10*, 1815–1823.
48. Vanholder, R.; Bammens, B.; De Loo, H.; Glorieux, G.; Meijers, B.; Schepers, E.; Massy, Z.; Evenepoel, P. Warning: The unfortunate end of p-cresol as a uraemic toxin. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2011**, *26*, 1464–1467. [\[CrossRef\]](#)
49. Viaene, L.; Annaert, P.; Loo, H.D.; Poesen, R.; Evenepoel, P.; Meijers, B. Albumin is the main plasma binding protein for indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate: Albumin is main carrier of indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate. *Biopharm. Drug Dispos.* **2013**, *34*, 165–175. [\[CrossRef\]](#)
50. Lin, C.-J.; Chen, H.-H.; Pan, C.-F.; Chuang, C.-K.; Wang, T.-J.; Sun, F.-J.; Wu, C.-J. p-cresylsulfate and indoxyl sulfate level at different stages of chronic kidney disease. *J. Clin. Lab. Anal.* **2011**, *25*, 191–197. [\[CrossRef\]](#)
51. Niwa, T.; Ise, M.; Miyazaki, T. Progression of Glomerular Sclerosis in Experimental Uremic Rats by Administration of Indole, a Precursor of Indoxyl Sulfate. *Am. J. Nephrol.* **1994**, *14*, 207–212. [\[CrossRef\]](#)
52. Sun, C.-Y.; Chang, S.-C.; Wu, M.-S. Uremic Toxins Induce Kidney Fibrosis by Activating Intrarenal Renin–Angiotensin–Aldosterone System Associated Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e34026. [\[CrossRef\]](#)
53. Wu, I.-W.; Hsu, K.-H.; Lee, C.-C.; Sun, C.-Y.; Hsu, H.-J.; Tsai, C.-J.; Tzen, C.-Y.; Wang, Y.-C.; Lin, C.-Y.; Wu, M.-S. p-Cresyl sulphate and indoxyl sulphate predict progression of chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2010**, *26*, 938–947. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Lin, C.-J.; Liu, H.-L.; Pan, C.-F.; Chuang, C.-K.; Jayakumar, T.; Wang, T.-J.; Chen, H.-H.; Wu, C.-J. Indoxyl Sulfate Predicts Cardiovascular Disease and Renal Function Deterioration in Advanced Chronic Kidney Disease. *Arch. Med. Res.* **2012**, *43*, 451–456. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Dou, L.; Jourde-Chiche, N.; Faure, V.; Cerini, C.; Berland, Y.; Dignat-George, F.; Brunet, P. The uremic solute indoxyl sulfate induces oxidative stress in endothelial cells. *J. Thromb. Haemost.* **2007**, *5*, 1302–1308. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. Faure, V.; Dou, L.; Sabatier, F.; Cerini, C.; Sampol, J.; Berland, Y.; Brunet, P.; Dignat-George, F. Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure. *J. Thromb. Haemost.* **2006**, *4*, 566–573. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Gondouin, B.; Cerini, C.; Dou, L.; Sallée, M.; Duval-Sabatier, A.; Pletinck, A.; Calaf, R.; Lacroix, R.; Jourde-Chiche, N.; Poitevin, S.; et al. Indolic uremic solutes increase tissue factor production in endothelial cells by the aryl hydrocarbon receptor pathway. *Kidney Int.* **2013**, *84*, 733–744. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
58. Machado, T.S.; Poitevin, S.; Paul, P.; McKay, N.; Jourde-Chiche, N.; Legris, T.; Mouly-Bandini, A.; Dignat-George, F.; Brunet, P.; Masereeuw, R.; et al. Indoxyl Sulfate Upregulates Liver P-Glycoprotein Expression and Activity through Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2018**, *29*, 906–918.
59. Vanholder, R.; Schepers, E.; Pletinck, A.; Nagler, E.V.; Glorieux, G. The Uremic Toxicity of Indoxyl Sulfate and p-Cresyl Sulfate: A Systematic Review. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2014**, *25*, 1897–1907. [\[CrossRef\]](#)
60. Taki, K.; Tsuruta, Y.; Niwa, T. Indoxyl Sulfate and Atherosclerotic Risk Factors in Hemodialysis Patients. *Am. J. Nephrol.* **2007**, *27*, 30–35. [\[CrossRef\]](#)

61. Barreto, F.C.; Barreto, D.V.; Liabeuf, S.; Meert, N.; Glorieux, G.; Temmar, M.; Choukroun, G.; Vanholder, R.; Massy, Z.A.; on behalf of the European Uremic Toxin Work Group (EUTox). Serum Indoxyl Sulfate Is Associated with Vascular Disease and Mortality in Chronic Kidney Disease Patients. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2009**, *4*, 1551–1558. [\[CrossRef\]](#)
62. Motojima, M.; Hosokawa, A.; Yamato, H.; Muraki, T.; Yoshioka, T. Uremic toxins of organic anions up-regulate PAI-1 expression by induction of NF- κ B and free radical in proximal tubular cells. *Kidney Int.* **2003**, *63*, 1671–1680. [\[CrossRef\]](#)
63. Lekawanvijit, S.; Adrahtas, A.; Kelly, D.J.; Kompa, A.R.; Wang, B.H.; Krum, H. Does indoxyl sulfate, a uraemic toxin, have direct effects on cardiac fibroblasts and myocytes? *Eur. Hear. J.* **2010**, *31*, 1771–1779. [\[CrossRef\]](#)
64. Lin, C.-J.; Pan, C.-F.; Liu, H.-L.; Chuang, C.-K.; Jayakumar, T.; Wang, T.-J.; Chen, H.-H.; Wu, C.-J. The role of protein-bound uremic toxins on peripheral artery disease and vascular access failure in patients on hemodialysis. *Atheroscler.* **2012**, *225*, 173–179. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
65. Chiu, C.-A.; Lu, L.-F.; Yu, T.-H.; Hung, W.-C.; Chung, F.-M.; Tsai, I.-T.; Yang, C.-Y.; Hsu, C.-C.; Lu, Y.-C.; Wang, C.-P.; et al. Increased Levels of Total P-Cresylsulphate and Indoxyl Sulphate are Associated with Coronary Artery Disease in Patients with Diabetic Nephropathy. *Rev. Diabet. Stud.* **2011**, *7*, 275–284. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
66. Ahmed, M.S.E.; Abed, M.; Voelkl, J.; Lang, F. Triggering of suicidal erythrocyte death by uremic toxin indoxyl sulfate. *Bmc Nephrol.* **2013**, *14*, 244. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
67. Adelibieke, Y.; Shimizu, H.; Saito, S.; Mironova, R.; Niwa, T. Indoxyl sulfate counteracts endothelial effects of erythropoietin through suppression of Akt phosphorylation. *Circ. J.* **2013**, *77*, 1326–1336. [\[CrossRef\]](#)
68. Congote, L.F.; Sadvakassova, G.; Dobocan, M.C.; Difalco, M.R.; Li, Q. Erythropoietin-dependent endothelial proteins: Potential use against erythropoietin resistance. *Cytokine* **2010**, *51*, 113–118. [\[CrossRef\]](#)
69. Congote, L.F.; Difalco, M.R.; Gibbs, B.F. Thrombospondin 1, produced by endothelial cells under the action of erythropoietin, stimulates thymidine incorporation into erythroid cells and counteracts the inhibitory action of insulin-like growth factor binding protein. *Cytokine* **2005**, *30*, 248–253. [\[CrossRef\]](#)
70. Asai, H.; Hirata, J.; Hirano, A.; Hirai, K.; Seki, S.; Watanabe-Akanuma, M. Activation of aryl hydrocarbon receptor mediates suppression of hypoxia-inducible factor-dependent erythropoietin expression by indoxyl sulfate. *Am. J. Physiol. Physiol.* **2016**, *310*, C142–C150. [\[CrossRef\]](#)
71. Gao, C.; Ji, S.; Dong, W.; Qi, Y.; Song, W.; Cui, D.; Shi, J. Indolic Uremic Solutes Enhance Procoagulant Activity of Red Blood Cells through Phosphatidylserine Exposure and Microparticle Release. *Toxins* **2015**, *7*, 4390–4403. [\[CrossRef\]](#)
72. Lee, S.-H.; Meng, X.W.; Flatten, K.S.; Loegering, D.K.S.; Kaufmann, S.H. Phosphatidylserine exposure during apoptosis reflects bidirectional trafficking between plasma membrane and cytoplasm. *Cell Death Differ.* **2012**, *20*, 64–76. [\[CrossRef\]](#)
73. Wu, C.-J.; Chen, C.-Y.; Lai, T.-S.; Wu, P.-C.; Chuang, C.-K.; Sun, F.-J.; Liu, H.-L.; Chen, H.-H.; Yeh, H.-I.; Lin, C.-S.; et al. Correction: The role of indoxyl sulfate in renal anemia in patients with chronic kidney disease. *Oncotarget* **2019**, *10*, 2006. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
74. Bataille, S.; Pelletier, M.; Sallée, M.; Berland, Y.; McKay, N.; Duval, A.; Gentile, S.; Mouelhi, Y.; Brunet, P.; Burtey, S. Indole 3-acetic acid, indoxyl sulfate and paracresyl-sulfate do not influence anemia parameters in hemodialysis patients. *Bmc Nephrol.* **2017**, *18*, 251. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
75. Dias, G.F.; Bonan, N.B.; Steiner, T.M.; Tozoni, S.S.; Rodrigues, S.D.; Nakao, L.S.; Kuntsevich, V.; Pecoits-Filho, R.; Kotanko, P.; Moreno-Amaral, A.N. Indoxyl Sulfate, a Uremic Toxin, Stimulates Reactive Oxygen Species Production and Erythrocyte Cell Death Supposedly by an Organic Anion Transporter 2 (OAT2) and NADPH Oxidase Activity-Dependent Pathways. *Toxins* **2018**, *10*, 280. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
76. Yoshida, K.; Yoneda, T.; Kimura, S.; Fujimoto, K.; Okajima, E.; Hirao, Y. Polyamines as an Inhibitor on Erythropoiesis of Hemodialysis Patients by In Vitro Bioassay Using the Fetal Mouse Liver Assay. *Ther. Apher. Dial.* **2006**, *10*, 267–272. [\[CrossRef\]](#)
77. Kushner, D.; Beckman, B.; Nguyen, L.; Chen, S.; Della Santina, C.; Husserl, F.; Rice, J.; Fisher, J.W. Polyamines in the anemia of end-stage renal disease. *Kidney Int.* **1991**, *39*, 725–732. [\[CrossRef\]](#)
78. Radtke, H.W.; Rege, A.B.; Lamarche, M.B.; Bartos, D.; Bartos, F.; Campbell, R.A.; Fisher, J.W. Identification of Spermine as an Inhibitor of Erythropoiesis in Patients with Chronic Renal Failure. *J. Clin. Investig.* **1981**, *67*, 1623–1629. [\[CrossRef\]](#)

61. Barreto, F.C.; Barreto, D.V.; Liabeuf, S.; Meert, N.; Glorieux, G.; Temmar, M.; Choukroun, G.; Vanholder, R.; Massy, Z.A.; on behalf of the European Uremic Toxin Work Group (EUTox). Serum Indoxyl Sulfate Is Associated with Vascular Disease and Mortality in Chronic Kidney Disease Patients. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2009**, *4*, 1551–1558. [\[CrossRef\]](#)
62. Motojima, M.; Hosokawa, A.; Yamato, H.; Muraki, T.; Yoshioka, T. Uremic toxins of organic anions up-regulate PAI-1 expression by induction of NF- κ B and free radical in proximal tubular cells. *Kidney Int.* **2003**, *63*, 1671–1680. [\[CrossRef\]](#)
63. Lekawanvijit, S.; Adrahtas, A.; Kelly, D.J.; Kompa, A.R.; Wang, B.H.; Krum, H. Does indoxyl sulfate, a uraemic toxin, have direct effects on cardiac fibroblasts and myocytes? *Eur. Hear. J.* **2010**, *31*, 1771–1779. [\[CrossRef\]](#)
64. Lin, C.-J.; Pan, C.-F.; Liu, H.-L.; Chuang, C.-K.; Jayakumar, T.; Wang, T.-J.; Chen, H.-H.; Wu, C.-J. The role of protein-bound uremic toxins on peripheral artery disease and vascular access failure in patients on hemodialysis. *Atheroscler.* **2012**, *225*, 173–179. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
65. Chiu, C.-A.; Lu, L.-F.; Yu, T.-H.; Hung, W.-C.; Chung, F.-M.; Tsai, I.-T.; Yang, C.-Y.; Hsu, C.-C.; Lu, Y.-C.; Wang, C.-P.; et al. Increased Levels of Total P-Cresylsulphate and Indoxyl Sulphate are Associated with Coronary Artery Disease in Patients with Diabetic Nephropathy. *Rev. Diabet. Stud.* **2011**, *7*, 275–284. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
66. Ahmed, M.S.E.; Abed, M.; Voelkl, J.; Lang, F. Triggering of suicidal erythrocyte death by uremic toxin indoxyl sulfate. *Bmc Nephrol.* **2013**, *14*, 244. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
67. Adelibieke, Y.; Shimizu, H.; Saito, S.; Mironova, R.; Niwa, T. Indoxyl sulfate counteracts endothelial effects of erythropoietin through suppression of Akt phosphorylation. *Circ. J.* **2013**, *77*, 1326–1336. [\[CrossRef\]](#)
68. Congote, L.F.; Sadvakassova, G.; Dobocan, M.C.; Difalco, M.R.; Li, Q. Erythropoietin-dependent endothelial proteins: Potential use against erythropoietin resistance. *Cytokine* **2010**, *51*, 113–118. [\[CrossRef\]](#)
69. Congote, L.F.; Difalco, M.R.; Gibbs, B.F. Thrombospondin 1, produced by endothelial cells under the action of erythropoietin, stimulates thymidine incorporation into erythroid cells and counteracts the inhibitory action of insulin-like growth factor binding protein. *Cytokine* **2005**, *30*, 248–253. [\[CrossRef\]](#)
70. Asai, H.; Hirata, J.; Hirano, A.; Hirai, K.; Seki, S.; Watanabe-Akanuma, M. Activation of aryl hydrocarbon receptor mediates suppression of hypoxia-inducible factor-dependent erythropoietin expression by indoxyl sulfate. *Am. J. Physiol. Physiol.* **2016**, *310*, C142–C150. [\[CrossRef\]](#)
71. Gao, C.; Ji, S.; Dong, W.; Qi, Y.; Song, W.; Cui, D.; Shi, J. Indolic Uremic Solutes Enhance Procoagulant Activity of Red Blood Cells through Phosphatidylserine Exposure and Microparticle Release. *Toxins* **2015**, *7*, 4390–4403. [\[CrossRef\]](#)
72. Lee, S.-H.; Meng, X.W.; Flatten, K.S.; Loegering, D.K.S.; Kaufmann, S.H. Phosphatidylserine exposure during apoptosis reflects bidirectional trafficking between plasma membrane and cytoplasm. *Cell Death Differ.* **2012**, *20*, 64–76. [\[CrossRef\]](#)
73. Wu, C.-J.; Chen, C.-Y.; Lai, T.-S.; Wu, P.-C.; Chuang, C.-K.; Sun, F.-J.; Liu, H.-L.; Chen, H.-H.; Yeh, H.-I.; Lin, C.-S.; et al. Correction: The role of indoxyl sulfate in renal anemia in patients with chronic kidney disease. *Oncotarget* **2019**, *10*, 2006. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
74. Bataille, S.; Pelletier, M.; Sallée, M.; Berland, Y.; McKay, N.; Duval, A.; Gentile, S.; Mouelhi, Y.; Brunet, P.; Burtey, S. Indole 3-acetic acid, indoxyl sulfate and paracresyl-sulfate do not influence anemia parameters in hemodialysis patients. *Bmc Nephrol.* **2017**, *18*, 251. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
75. Dias, G.F.; Bonan, N.B.; Steiner, T.M.; Tozoni, S.S.; Rodrigues, S.D.; Nakao, L.S.; Kuntsevich, V.; Pecoits-Filho, R.; Kotanko, P.; Moreno-Amaral, A.N. Indoxyl Sulfate, a Uremic Toxin, Stimulates Reactive Oxygen Species Production and Erythrocyte Cell Death Supposedly by an Organic Anion Transporter 2 (OAT2) and NADPH Oxidase Activity-Dependent Pathways. *Toxins* **2018**, *10*, 280. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
76. Yoshida, K.; Yoneda, T.; Kimura, S.; Fujimoto, K.; Okajima, E.; Hirao, Y. Polyamines as an Inhibitor on Erythropoiesis of Hemodialysis Patients by In Vitro Bioassay Using the Fetal Mouse Liver Assay. *Ther. Apher. Dial.* **2006**, *10*, 267–272. [\[CrossRef\]](#)
77. Kushner, D.; Beckman, B.; Nguyen, L.; Chen, S.; Della Santina, C.; Husserl, F.; Rice, J.; Fisher, J.W. Polyamines in the anemia of end-stage renal disease. *Kidney Int.* **1991**, *39*, 725–732. [\[CrossRef\]](#)
78. Radtke, H.W.; Rege, A.B.; Lamarche, M.B.; Bartos, D.; Bartos, F.; Campbell, R.A.; Fisher, J.W. Identification of Spermine as an Inhibitor of Erythropoiesis in Patients with Chronic Renal Failure. *J. Clin. Investig.* **1981**, *67*, 1623–1629. [\[CrossRef\]](#)

101. Richmond, T.D.; Chohan, M.; Barber, D.L. Turning cells red: Signal transduction mediated by erythropoietin. *Trends Cell Biol.* **2005**, *15*, 146–155. [\[CrossRef\]](#)
102. Wojchowski, D.M.; Gregory, R.C.; Miller, C.P.; Pandit, A.K.; Pircher, T.J. Signal Transduction in the Erythropoietin Receptor System. *Exp. Cell Res.* **1999**, *253*, 143–156. [\[CrossRef\]](#)
103. Jelkmann, W. Erythropoietin after a century of research: Younger than ever. *Eur. J. Haematol.* **2007**, *78*, 183–205. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
104. Rishi, G.; Subramaniam, V.N. The relationship between systemic iron homeostasis and erythropoiesis. *Biosci. Rep.* **2017**, *37*. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
105. Kim, A.; Nemeth, E. New insights into iron regulation and erythropoiesis. *Curr. Opin. Hematol.* **2015**, *22*, 199–205. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
106. Lang, F.; Gulbins, E.; Lang, P.A.; Zappulla, D.; Föller, M. Ceramide in Suicidal Death of Erythrocytes. *Cell. Physiol. Biochem.* **2010**, *26*, 21–28. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
107. Park, C.H.; Valore, E.V.; Waring, A.J.; Ganz, T. Hepcidin, a Urinary Antimicrobial Peptide Synthesized in the Liver. *J. Biol. Chem.* **2000**, *276*, 7806–7810. [\[CrossRef\]](#)
108. Ganz, T. Molecular Control of Iron Transport. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2007**, *18*, 394–400. [\[CrossRef\]](#)
109. Ganz, T.; Nemeth, E. Hepcidin and Disorders of Iron Metabolism. *Annu. Rev. Med.* **2011**, *62*, 347–360. [\[CrossRef\]](#)
110. Tomosugi, N.; Kawabata, H.; Wakatabe, R.; Higuchi, M.; Yamaya, H.; Umehara, H.; Ishikawa, I. Detection of serum hepcidin in renal failure and inflammation by using ProteinChip System. *Blood* **2006**, *108*, 1381–1387. [\[CrossRef\]](#)
111. Troutt, J.S.; Butterfield, A.M.; Konrad, R.J. Hepcidin-25 Concentrations Are Markedly Increased in Patients With Chronic Kidney Disease and Are Inversely Correlated With Estimated Glomerular Filtration Rates. *J. Clin. Lab. Anal.* **2013**, *27*, 504–510. [\[CrossRef\]](#)
112. Singh, A.K. Erythropoiesis. In *Textbook of Nephro-Endocrinology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2018; pp. 207–215.
113. Kautz, L.; Jung, G.; Valore, E.V.; Rivella, S.; Nemeth, E.; Ganz, T. Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nat. Genet.* **2014**, *46*, 678–684. [\[CrossRef\]](#)
114. Paulson, R.F.; Shi, L.; Wu, D.-C. Stress erythropoiesis: New signals and new stress progenitor cells. *Curr. Opin. Hematol.* **2011**, *18*, 139–145. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
115. Coffey, R.; Ganz, T. Erythroferrone: An Erythroid Regulator of Hepcidin and Iron Metabolism. *HemaSphere* **2018**, *2*, e35. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
116. Hamano, H.; Ikeda, Y.; Watanabe, H.; Horinouchi, Y.; Izawa-Ishizawa, Y.; Imanishi, M.; Zamami, Y.; Takechi, K.; Miyamoto, L.; Ishizawa, K.; et al. The uremic toxin indoxyl sulfate interferes with iron metabolism by regulating hepcidin in chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2017**, *33*, 586–597. [\[CrossRef\]](#)
117. Coyne, D.W. Use of Epoetin in Chronic Renal Failure. *JAMA* **2007**, *297*, 1713–1716. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
118. Eschbach, J.W.; Egrie, J.C.; Downing, M.R.; Browne, J.K.; Adamson, J.W. Correction of the Anemia of End-Stage Renal Disease with Recombinant Human Erythropoietin. *N. Engl. J. Med.* **1987**, *316*, 73–78. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
119. Eschbach, J.W.; Abdulhadi, M.H.; Browne, J.K.; Delano, B.G.; Downing, M.R.; Egrie, J.C.; Evans, R.W.; Friedman, E.A.; Graber, S.E.; Haley, N.R.; et al. Recombinant Human Erythropoietin in Anemic Patients with End-Stage Renal Disease: Results of a Phase III Multicenter Clinical Trial. *Ann. Intern. Med.* **1989**, *111*, 992–1000. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
120. Levin, A.; Rocco, M. KDOQI Clinical Practice Guideline and Clinical Practice Recommendations for Anemia in Chronic Kidney Disease: 2007 Update of Hemoglobin Target. *Am. J. Kidney Dis.* **2007**, *50*, 471–530. [\[CrossRef\]](#)
121. McMurray, J.J.; Parfrey, P.S.; Adamson, J.W.; Aljama, P.; Berns, J.S.; Bohlius, J.; Drüeke, T.B.; Finkelstein, F.O.; Fishbane, S.; Ganz, T.; et al. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Anemia Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Anemia in Chronic Kidney Disease. *Kidney Int. Supp.* **2012**, *64*.
122. Drüeke, T.B.; Locatelli, F.; Clyne, N.; Eckardt, K.-U.; MacDougall, I.C.; Tsakiris, D.; Burger, H.-U.; Scherhag, A. Normalization of Hemoglobin Level in Patients with Chronic Kidney Disease and Anemia. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *355*, 2071–2084. [\[CrossRef\]](#)
123. Singh, A.K.; Szczech, L.; Tang, K.L.; Barnhart, H.; Sapp, S.; Wolfson, M.; Reddan, N. Correction of Anemia with Epoetin Alfa in Chronic Kidney Disease. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *355*, 2085–2098. [\[CrossRef\]](#)

124. Fishbane, S. Upper Limit of Serum Ferritin: Misinterpretation of the 2006 KDOQI Anemia Guidelines: Upper limit of serum ferritin: Misinterpretation of guidelines. *Semin. Dial.* **2008**, *21*, 217–220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Kalantar-Zadeh, K.; Lee, G.H.; Miller, J.E.; Streja, E.; Jing, J.; Robertson, J.A.; Kovesdy, C.P. Predictors of Hyporesponsiveness to Erythropoiesis-Stimulating Agents in Hemodialysis Patients. *Am. J. Kidney Dis.* **2009**, *53*, 823–834. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Besarab, A.; Coyne, D.W. Iron supplementation to treat anemia in patients with chronic kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol.* **2010**, *6*, 699–710. [[CrossRef](#)]
127. Besarab, A.; Kaiser, J.W.; Frinak, S. A study of parenteral iron regimens in hemodialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.* **1999**, *34*, 21–28. [[CrossRef](#)]
128. Besarab, A.; Amin, N.; Ahsan, M.; Vogel, S.E.; Zazuwa, G.; Frinak, S.; Zazra, J.J.; Anandan, J.V.; Gupta, A.P. Optimization of Epoetin Therapy with Intravenous Iron Therapy in Hemodialysis Patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2000**, *11*, 530–538.
129. Hsieh, M.M.; Linde, N.S.; Wynter, A.; Metzger, M.; Wong, C.; Langsetmo, I.; Lin, A.; Smith, R.; Rodgers, G.P.; Donahue, R.E.; et al. HIF-prolyl hydroxylase inhibition results in endogenous erythropoietin induction, erythrocytosis, and modest fetal hemoglobin expression in rhesus macaques. *Blood* **2007**, *110*, 2140–2147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
130. MacDougall, I.C.; Eckardt, K.-U. Novel strategies for stimulating erythropoiesis and potential new treatments for anaemia. *Lancet* **2006**, *368*, 947–953. [[CrossRef](#)]
131. Chen, N.; Hao, C.; Peng, X.; Lin, H.; Yin, A.; Hao, L.; Tao, Y.; Liang, X.; Liu, Z.; Xing, C.; et al. Roxadustat for Anemia in Patients with Kidney Disease Not Receiving Dialysis. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *381*, 1001–1010. [[CrossRef](#)]
132. Sugahara, M.; Tanaka, T.; Nangaku, M. Prolyl hydroxylase domain inhibitors as a novel therapeutic approach against anemia in chronic kidney disease. *Kidney Int.* **2017**, *92*, 306–312. [[CrossRef](#)]
133. Niwa, T.; Yazawa, T.; Ise, M.; Sugano, M.; Kodama, T.; Uehara, Y.; Maeda, K. Inhibitory Effect of Oral Sorbent on Accumulation of Albumin-Bound Indoxyl Sulfate in Serum of Experimental Uremic Rats. *Nephron* **1991**, *57*, 84–88. [[CrossRef](#)]
134. Niwa, T.; Emoto, Y.; Maeda, K.; Uehara, Y.; Yamada, N.; Shibata, M.; Nobuo, Y. Oral Sorbent Suppresses Accumulation of Albumin-Bound Indoxyl Sulphate in Serum of Haemodialysis Patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* **1991**, *6*, 105–109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Niwa, T.; Miyazaki, T.; Hashimoto, N.; Hayashi, H.; Ise, M.; Uehara, Y.; Maeda, K. Suppressed Serum and Urine Levels of Indoxyl Sulfate by Oral Sorbent in Experimental Uremic Rats. *Am. J. Nephrol.* **1992**, *12*, 201–206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Miyazaki, T.; Aoyama, I.; Ise, M.; Seo, H.; Niwa, T. An oral sorbent reduces overload of indoxyl sulphate and gene expression of TGF- β 1 in uraemic rat kidneys. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2000**, *15*, 1773–1781. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
137. Wu, I.-W.; Hsu, K.-H.; Sun, C.-Y.; Tsai, C.-J.; Wu, M.-S.; Lee, C.-C. Oral adsorbent AST-120 potentiates the effect of erythropoietin-stimulating agents on Stage 5 chronic kidney disease patients: A randomized crossover study. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2014**, *29*, 1719–1727. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
138. Roger, S.D. Practical considerations for iron therapy in the management of anaemia in patients with chronic kidney disease. *Clin. Kidney J.* **2017**, *10*, i9–i15. [[CrossRef](#)]
139. Gupta, N.; Wish, J.B. Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylase Inhibitors: A Potential New Treatment for Anemia in Patients With CKD. *Am. J. Kidney Dis.* **2017**, *69*, 815–826. [[CrossRef](#)]
140. Chen, N.; Hao, C.; Liu, B.-C.; Lin, H.; Wang, C.; Xing, C.; Liang, X.; Jiang, G.; Liu, Z.; Li, X.; et al. Roxadustat Treatment for Anemia in Patients Undergoing Long-Term Dialysis. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *381*, 1011–1022. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

4. Les ARNs non codants (ARNnc)

Les ARN messagers (ARNm) proviennent de la transcription de gènes codants. À l'inverse, les ARNnc sont issus de la transcription de gènes ARN qui ne sont pas destinés à coder pour des protéines. Les ARNnc assurent différentes fonctions propres, dont la plupart sont déterminées par la structure spatiale que la molécule d'ARN adopte en se repliant sur elle-même.

4.1. Classification des ARNnc

Les ARNnc sont les principaux régulateurs du génome, contrôlant les processus cellulaires les plus importants. Ils jouent un rôle crucial dans la régulation des gènes et sont impliqués dans de nombreux mécanismes biologiques agissant comme des régulateurs épigénétiques pour moduler l'expression des gènes. Les ARNnc sont impliqués dans un large éventail de pathologies humaines, comme dans le cancer, les MCV, neurologiques et métaboliques.

Ces derniers sont classés en deux catégories en fonction de leur longueur : les small ARNnc (sncARNs) (< 200 nucléotides) et les longs ARNnc (lncARNs) (> 200 nucléotides) en fonction de leur longueur (**Figure 9**). Les sncARNs sont ensuite classés en sncARNs fonctionnels ou en sncARNs régulateurs, tandis que les lncARNs sont répartis en 3 catégories en fonction de leur action, de leur structure et de leur localisation.

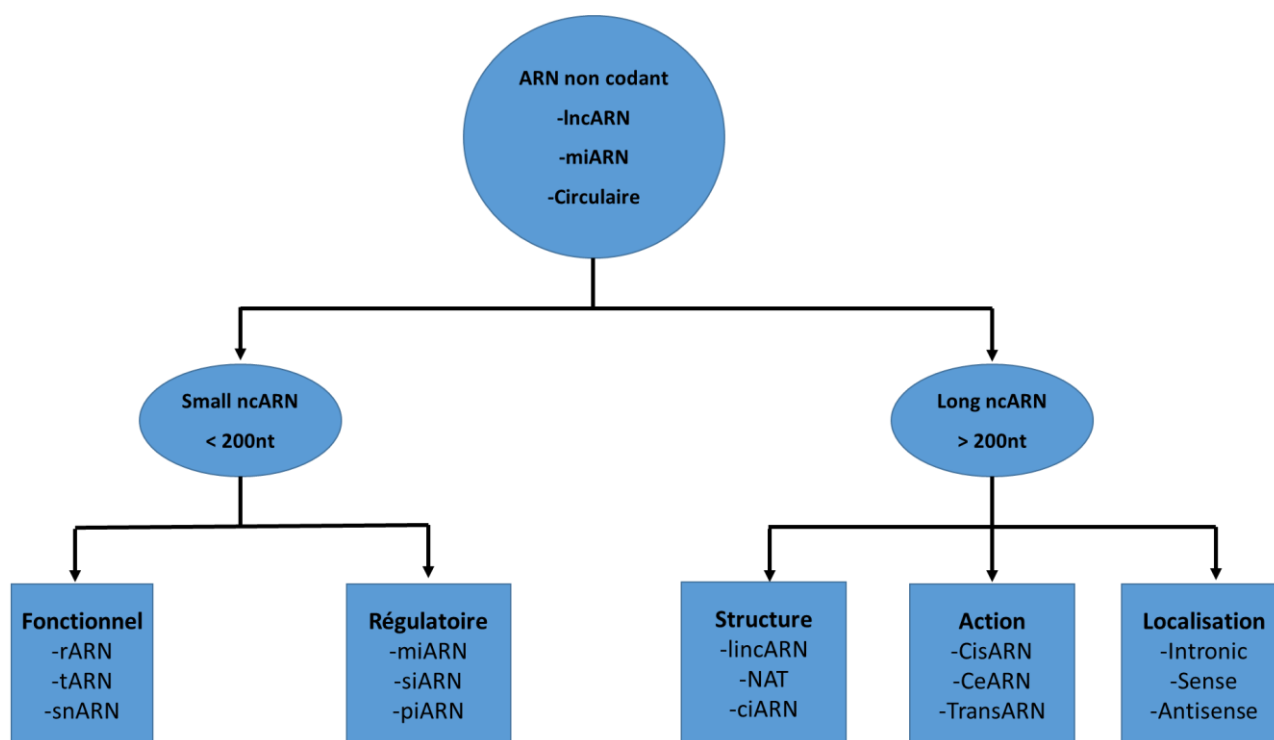


Figure 9. Classification des ARNnc

Plusieurs classes de sncARNs régulateurs ont été découverts chez les mammifères telles que : les piwis ARNs (piARNs), les small interference ARNs (siARNs) et les microARNs (miARNs) [189]. Ces derniers agissent comme des régulateurs majeurs de l'expression des gènes dans diverses voies et systèmes cellulaires [189].

Les lncARNs font l'objet de nombreuses recherches car ils semblent être impliqués dans divers processus biologiques comme l'épissage, le stockage des miARNs, dans les processus transcriptionnels et post-transcriptionnels et par voie de conséquence de nombreuses pathologies associées [190]. Une recherche approfondie sur les lncARNs a été publiée dans notre revue dans le journal « *International Journal of Molecular Sciences* » qui référence les lncARNs impliqués dans les maladies rénales [191].

4.2. La biogénèse des miARNs

Les miARNs sont de petits ARNnc de 21 à 25 nucléotides qui contrôlent la régulation post-transcriptionnelle de l'expression de gènes dans divers processus biologiques. C'est en 1993

que le premier miARN a été découvert chez le ver *Caenorhabditis elegans* [192]. À ce jour, la dernière version v. 22 de la base de données de miRBase (<http://www.mirbase.org/>) répertorie environ 48 860 miARNs matures appartenant à diverses espèces [193].

Les gènes des miARNs sont transcrits en un « pri-miARN » simple brin qui sera clivé par action d'une ribonucléase Droscha pour libérer un “pré-miARN” qui a une structure en épingle à cheveux (**Figure 10**) [194]. Par la suite, *via* le transporteur exportine 5, ce pré-miARN est exporté du noyau vers le cytoplasme et, est pris en charge par Dicer, une ribonucléase qui va le couper et générer un miARN mature.

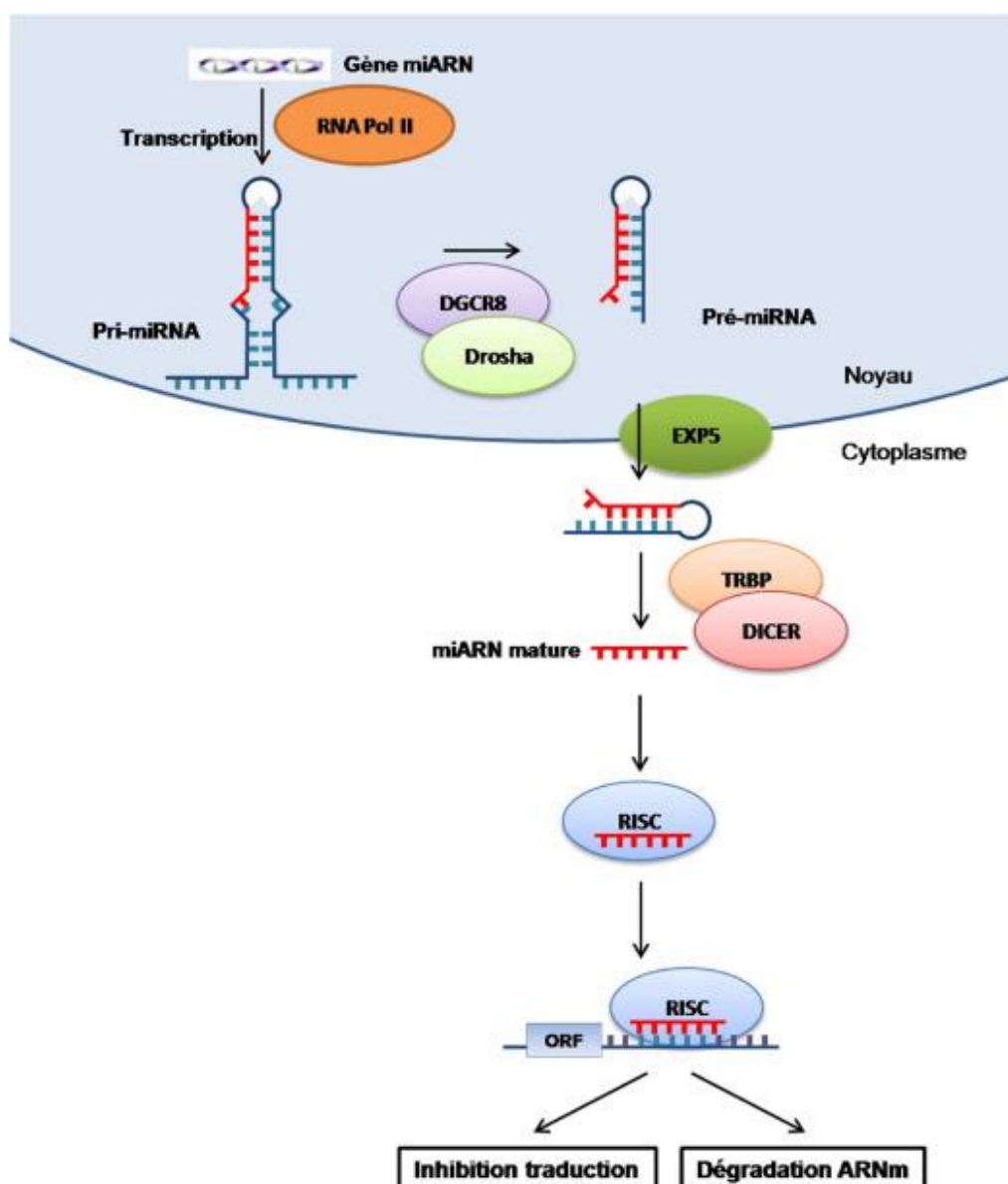


Figure 10. Biogénèse des miARNs [195]

Le miARN mature simple brin s'associe alors dans le complexe RISC (RNA-induced silencing complex) et va se fixer de façon complémentaire à la région 3' non codante (3'UTR) de l'ARNm cible. Les miARNs contrôlent l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel soit en dégradant l'ARNm cible soit en inhibant leur traduction [196].

Dans les sections qui suivent, nous allons nous intéresser aux ARNnc, décrivons leurs implications dans l'IRC et leurs modulations.

4.3. Les ARNnc comme biomarqueurs potentiels dans l'IRC

Les miARNs se sont révélées être dérégulés lors de la progression de la MRC [197]. Ces dernières années, les recherches ont porté sur l'identification de nouveaux biomarqueurs plus sensibles pour le diagnostic précoce en néphrologie afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques [198]. Plusieurs miRNAs ont ainsi été associés à l'IRC et aux MCV. Dans l'étude de Fourdinier *et al.*, notre équipe a évalué le rôle de deux miARNs circulants, le miR-223 et le miR-126, dans le sérum des patients atteint d'IRC [197]. Cette publication a montré qu'une diminution des niveaux sériques de miR-126 et miR-223 était associée aux MCV, à une baisse du DFG et à une mortalité à différents stades de l'IRC. Les ARNnc pourraient donc être utilisés comme biomarqueurs diagnostiques ou pronostiques chez les patients atteints d'IRC [191]. Néanmoins, de nombreux problèmes limitent l'utilisation des miARNs comme cibles thérapeutiques. Avant de pouvoir être mis en pratique en clinique, les miARNs présentent quelques limites liées à la spécificité et aux méthodes d'administration tels que l'expression tissulaire ubiquitaire, la toxicité ou les effets hors cible « *off-target* » [199].

À ce jour, la plupart des recherches sur les ARNnc et l'IRC se sont concentrées sur les miARNs, et peu de travaux ont été consacrés au rôle des lncARNs dans cette pathologie (**Tableau 4**).

ARNnc	Prédiction/Biomarqueur	Références
<u>ARNnc exosomaux urinaires</u> -miARN-181a -9 ARNs antisense (EAF1-AS1, PCBP1-AS1, RP11-178F10.1, RP11-315I20.1, RP11-378E13.4, RP11-68I3.2, RP11-700F16.3, RP11-98D18.1 et RP11-1382.1) -trf ^{Val} , trf ^{Leu}	Biomarqueur diagnostique pour la détection précoce de l'IRC	[200]
LncARN NOP14-AS1 et LncARN HCP5	Prédiction de la progression de l'IRC	[201]
LncARN DKFZP434I0714	Prédiction des effets indésirables sur les MCV chez les patients en IRT	[202]

Tableau 4. Les ARNnc connus comme des biomarqueurs pronostiques dans l'IRC [191]

En 2016, l'étude de Khurana *et al.* avait pour but d'identifier des ARNnc exosomaux urinaires (exo-ARNnc) qui pourraient devenir de potentiels nouveaux biomarqueurs pour le diagnostic précoce de l'IRC [203]. En utilisant des techniques de séquençage haut-débit de l'ARN (RNA-Seq) et une analyse par un algorithme bio-informatique, les auteurs ont identifié 30 ARNnc dérégulés (dont 16 miARNs, 2 tRFs, 3 mt-tARNs et 9 lincARNs) aux stades précoces de patients atteints d'IRC par rapport aux contrôles sains. Parmi ceux-ci, 16 miARNs ont montré des altérations significatives de leur abondance. L'expression de 9 miARNs était significativement augmentée alors que celle de 7 miARNs étaient significativement diminuée dans les stades précoces de l'IRC par rapport aux contrôles sains. De façon notable, l'expression exosomale du miARN-181a était significativement diminuée d'environ 200 fois chez les patients en IRC par rapport aux contrôles sains. Ainsi, à l'avenir, le miR-181a serait un biomarqueur potentiel pour la détection précoce de l'IRC. Outre les miARNs, l'étude a également identifié chez les patients atteints d'IRC, 9 ARNs antisens dont l'expression est dérégulée dans les exosomes par rapport aux contrôles sains. Les auteurs ont aussi observé que l'expression des deux ARNs antisens étaient significativement diminués dans les exosomes des patients en IRC par rapport aux contrôles sains. Trois ARNmt exosomaux étaient également significativement diminués chez les patients en IRC par rapport aux contrôles sains. Ainsi, cette

étude a permis d'identifier un nombre important de biomarqueurs diagnostiques potentiels qui pourraient être utilisés dans le cadre de recherches futures sur l'IRC, à condition d'être validés dans des cohortes conséquentes.

Une article publié en 2019 a révélé que les lncARNs NOP14-AS1 et HCP5 étaient des biomarqueurs pronostiques potentiels de l'IRC [204]. Les auteurs ont d'abord comparé les profils d'expression de plusieurs lncARNs chez des individus sains et chez des patients atteints d'IRC. 821 ARNm et lncARNs dérégulés ont été recensés chez les patients atteints d'IRC comparés aux contrôles sains. Cette étude suggère que le lncARN NOP14-AS1 et le lncARN HCP5 pourraient être de potentiels biomarqueurs pronostiques qui peuvent prédire la progression de l'IRC.

Chun-Fu Lai *et al.* ont signalé qu'un niveau plasmatique élevé du lncARN DKFZP434I0714 était un biomarqueur de prédiction des conséquences de survenues des MCV et de mortalité chez les patients atteints d'IRT [205]. D'autres analyses ont révélé que l'expression de ce lncARN était également augmenté dans les cellules endothéliales aortiques humaines (CEAH) soumises à une hypoxie, était impliqué dans le dysfonctionnement endothélial et l'inflammation. Ainsi, la sous expression de DKFZP434I0714 a diminué l'expression de la molécule d'adhésion intracellulaire 1 (ICAM-1) et de la molécule d'adhésion des cellules vasculaires 1 (VCAM-1) et a réduit l'apoptose des CEAH médiée par l'hypoxie et l'adhésion des monocytes. Dans l'ensemble, ces données suggèrent que le lncARN DKFZP434I0714 est impliqué dans la pathogenèse du dysfonctionnement endothélial, de l'inflammation vasculaire, de l'athérosclérose, et pourrait être un bon biomarqueur potentiel de prédiction des MCV dans l'IRT.

Arbiol-Roca *et al.* ont été les premiers à étudier l'association entre les polymorphismes de l'ARN antisens dans le locus INK4 (ANRIL) et les principaux effets indésirables de type MCV chez les patients atteints d'IRC sous HD [206]. L'HD est une procédure thérapeutique visant à éliminer les liquides, les déchets du sang du patient et, est utilisée dans la gestion des maladies rénales aiguës et chroniques. Le polymorphisme ANRIL rs10757278 est le seul à présenter une association statistiquement significative avec les effets indésirables de type MCV. Ces résultats concernant les polymorphismes d'ANRIL pourraient contribuer à l'avenir à la gestion des effets indésirables des MCV dans un contexte d'IRC sous HD.

Wu *et al.* ont visé à comprendre le profil transcriptionnel du tubule proximal (TP) au cours de la fibrose rénale pour expliquer pourquoi l'IRC progresse plus rapidement chez les hommes que

chez les femmes [207]. Les auteurs ont utilisé le modèle de souris UUO de fibrose rénale dans lequel ils ont effectué une purification par affinité des ribosomes traducteurs. L'étude a permis d'identifier un total de 439 lncARNs exprimés dans le TP, dont 143 ayant subi une dérégulation au cours de la fibrose. L'hybridation *in situ* de l'ARN (HIS) de Snhg18 (forte expression) et de Gm20513 (faible expression) a confirmé les schémas d'expression induits par la fibrose. Par la suite, les chercheurs se sont concentrés sur les ARNm cibles potentiels dont l'expression pourrait être régulée par Snhg18 et Gm20513. De manière intéressante, les gènes cibles potentiels étaient liés à des gènes pro-inflammatoires tels que Fcgr2b, Cx3cr1, Lpl et Alox5ap. Enfin, la mise en œuvre d'une approche basée sur les données transcriptomiques de l'étude a permis d'identifier les facteurs de transcription clés qui conduisent à la progression de la maladie dans la fibrose rénale. Ces travaux ont identifié des facteurs de transcription pro-inflammatoires et profibrotiques tels que Irf1, Nf-kb1 et Stat3 qui seraient des moteurs potentiels de la régulation de la fibrose.

Une autre étude a montré que le TGF- β 1 joue un rôle dominant dans la promotion de la fibrose rénale et ses protéines effectrices Smad (Smad2, Smad3 et Smad4) possèdent des fonctions distinctes, voire opposées, dans la régulation de la fibrose [208]. Smad3 exerce une fonction profibrotique et peut induire la transcription de miARN et lncARN profibrotiques [209]. Les lncARNs ont également été associés à la fibrose rénale *via* des lncARNs impliqués dans l'isoforme TGF- β 1, qui favorise la fibrose rénale. Une approche par RNA-Seq et l'analyse des données ont permis d'identifier environ 21 lncARNs induits par la signalisation TGF- β /Smad3 dans le rein dont les lncARNs np_5318 et np_17856. Ces derniers sont impliqués dans la fibrose rénale médiée par le TGF- β [210]. Les résultats de Wu *et al.* démontrent que l'identification et la caractérisation des lncARNs fonctionnels associés aux maladies rénales peuvent représenter une nouvelle perspective de recherche prometteuse et peuvent conduire au développement de nouvelles thérapies.

Une étude a identifié le lncARN np_4334 (également appelé Ptprd-IR) comme une nouvelle cible moléculaire pour la médiation du TGF- β 1 [211]. Les auteurs ont constaté que la sous expression de Ptprd-IR atténuait l'activation de NF- κ B et ses effets inflammatoires dans les cellules épithéliales tubulaires en culture et dans les souris UUO.

Ces quelques exemples cités de miARNs et lncARNs impliqués dans l'IRC pourraient aider dans la prise en charge des patients, être utilisés comme des biomarqueurs prédictifs et/ou de pronostiques et être envisagés comme des cibles thérapeutiques.

4.4. Modulation des miARNs

Les miARNs matures peuvent être utilisés comme des biomarqueurs potentiels de pronostique ou de diagnostique, mais peuvent également servir comme des cibles thérapeutiques. La modulation des miARNs spécifiques d'un organe ou tissu peut être réalisée par l'administration d'inhibiteur (anti-miR) ou par la surexpression d'un miARN pour mimer l'activité du miARN endogène (mimic). L'avantage thérapeutique pour les traitements ciblant les miARNs, c'est que, pour la majorité, ils sont activés à la suite d'une lésion (par exemple lésion rénale aigue). L'avantage est également sur le plan de distribution des oligonucléotides d'ARN dans le corps entier et dans les compartiments intracellulaires.

A la suite d'une administration systémique, les oligonucléotides anti-miARN s'accumulent dans les reins et dans le foie. Cela suggère que le traitement anti-miARN peut être une stratégie pour les maladies rénales [212]. Pour limiter les effets indésirables, le miARN cible devrait idéalement être spécifique des reins et n'affecter qu'une seule cible cellulaire, ce qui n'est pas encore envisageable techniquement. Les mimics des miARNs génèrent des copies de miARNs matures qui se lient spécifiquement aux miARNs cibles. Ils ont été largement utilisés en culture cellulaire *in vitro*, mais leur usage en tant que cible thérapeutique n'a pas abouti. Les miARNs peuvent être instables *in vivo* en raison de leur dégradation rapide par les endonucléases ainsi que de leur élimination rapide par le métabolisme et l'excrétion hépatiques et rénaux [199].

Revue 2:

Non-Coding RNAs in Kidney Diseases: The Long and Short of Them

<https://doi.org/10.3390/ijms22116077>



Review

Non-Coding RNAs in Kidney Diseases: The Long and Short of Them

Juan Antonio Moreno ^{1,2,3,*}, Eya Hamza ⁴, Melania Guerrero-Hue ¹, Sandra Rayego-Mateos ⁵, Cristina García-Caballero ¹, Mercedes Vallejo-Mudarra ¹, Laurent Metzinger ^{4,*} and Valérie Metzinger-Le Meuth ^{4,6}

- ¹ Maimonides Biomedical Research Institute of Cordoba (IMIBIC), UGC Nephrology, Hospital Universitario Reina Sofía, 14004 Córdoba, Spain; Melania.guerrero@imibic.org (M.G.-H.); Cristina.garcia@imibic.org (C.G.-C.); b52vamum@uco.es (M.V.-M.)
 - ² Biomedical Research Networking Center on Cardiovascular Diseases (CIBERCV), 28029 Madrid, Spain
 - ³ Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, University of Cordoba, 140471 Cordoba, Spain
 - ⁴ HEMATIM UR 4666, C.U.R.S, Université de Picardie Jules Verne (UPJV), CEDEX 1, 80025 Amiens, France; eya.hamza@etud.u-picardie.fr (E.H.); valerie.metzinger@univ-paris13.fr (V.M.-L.M.)
 - ⁵ Renal, Vascular and Diabetes Research Laboratory, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma de Madrid, 28040 Madrid, Spain; srayego@quironsalud.es
 - ⁶ INSERM UMRS 1148, Laboratory for Vascular Translational Science (LVTS), UFR SMBH, Université Sorbonne Paris Nord, CEDEX, 93017 Bobigny, France
- * Correspondence: juan.moreno@uco.es (J.A.M.); laurent.metzinger@u-picardie.fr (L.M.); Tel.: +34-957-213849 (J.A.M.); +33-322-82-5356 (L.M.)



Citation: Moreno, J.A.; Hamza, E.; Guerrero-Hue, M.; Rayego-Mateos, S.; García-Caballero, C.; Vallejo-Mudarra, M.; Metzinger, L.; Metzinger-Le Meuth, V. Non-Coding RNAs in Kidney Diseases: The Long and Short of Them. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6077. <https://doi.org/10.3390/ijms22116077>

Academic Editor: Constantinos Stathopoulos

Received: 25 April 2021

Accepted: 2 June 2021

Published: 4 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Recent progress in genomic research has highlighted the genome to be much more transcribed than expected. The formerly so-called junk DNA encodes a miscellaneous group of largely unknown RNA transcripts, which contain the long non-coding RNAs (lncRNAs) family. lncRNAs are instrumental in gene regulation. Moreover, understanding their biological roles in the pathophysiology of many diseases, including renal, is a new challenge. lncRNAs regulate the effects of microRNAs (miRNA) on mRNA expression. Understanding the complex crosstalk between lncRNA–miRNA–mRNA is one of the main challenges of modern molecular biology. This review aims to summarize the role of lncRNA on kidney diseases, the molecular mechanisms involved, and their function as emerging prognostic biomarkers for both acute and chronic kidney diseases. Finally, we will also outline new therapeutic opportunities to diminish renal injury by targeting lncRNA with antisense oligonucleotides.

Keywords: non-coding RNA; microRNA; long non-coding RNA; chronic kidney disease; acute kidney disease; IgA nephropathy; gene regulation

1. Introduction

In 1986, Walter Gilbert suggested that self-replicating RNA molecules were at the very origin of life, even before the appearance of DNA and proteins, and introduced the concept of the RNA world [1,2]. From that time onwards, many RNA species have been described. Deep sequencing technologies have revealed that most of the eukaryotic genome is transcribed and the existence of numerous non-coding RNAs (ncRNAs). ncRNAs are numerous and highly adapted in their roles in modern organisms, as RNA molecules are well designed to specifically recognize other RNAs and DNA by complementary base pairing. This complex network of transcripts include thousands of ncRNAs with little or no protein-coding capacity. They function as post-transcriptional regulatory molecules, interacting with specific mRNAs and determining protein expression. In the non-coding transcriptome, secondary and tertiary structures are crucial for their interaction with proteins or other nucleic acids. These recent findings extend beyond the DNA–RNA–protein central dogma coined by Francis Crick in 1957 [3].

In the last two decades, the small microRNAs (miRNAs) have arisen as important regulators of most pathophysiological mechanisms [4–6]. miRNAs are around 20–25 nucleotides long, single stranded RNAs. More than 2000 miRNAs are encoded by the human genome. During miRNA biogenesis the double stranded miRNA-3p/miRNA-5p duplex is unwound to single strands by the *RNA-induced silencing complex (RISC)* that presents the mature miRNA to its target mRNAs, triggering gene silencing in a post-transcriptional manner. The analysis of miRNAs in biofluids, including serum and plasma, has been proposed as a minimally invasive diagnostic approach to detect changes of the physiological status of patients.

Alongside the short miRNAs, a long list of bigger transcripts called long non-coding RNAs (lncRNAs) has been recently described. Interestingly, the majority of lncRNAs are associated with human diseases, much like miRNAs, but unlike their smaller counterparts, they display cell type-specific expression and localization to subcellular compartments and are much less conserved. Physiologically, lncRNAs have been shown to modulate gene regulation at all levels (including but not limited to promoter activity, epigenetics, translation and transcription efficiency, intracellular trafficking) [7]. As in the case with other tissues, the kidney expresses tens of thousands of lncRNAs sequences that are often conserved with coding genes. lncRNAs are divided into four categories: long intervening/intergenic non-coding RNAs, intronic lncRNAs, sense lncRNAs (including pseudogenes) and antisense lncRNAs [8]. Competitive binding between lncRNAs, target mRNAs and miRNAs are considered to regulate gene expression, forming a wide RNA-based transcriptional regulatory network [9]. The majority of lncRNAs are expressed in the nucleus, whereas a minority is cytoplasmic [10]. A promising feature of lncRNAs is that they are more tissue- or cell type-specific than mRNAs or miRNAs, suggesting a better biomarker potential.

As lncRNAs are implicated in all levels of the gene regulation process, we can find them deregulated in a variety of pathophysiological processes, particularly in diseases involving genomic imprinting and cancer [11].

Over recent years, lncRNAs have been increasingly recognized as being implicated in the pathophysiology of various kidney diseases. The aim of the present review is to examine the current literature regarding this field, the molecular mechanisms involved, and the value of lncRNAs as emerging prognostic biomarkers in renal diseases. Finally, we will also outline new therapeutic approaches targeting lncRNA to decrease renal damage.

2. Role of lncRNAs in Renal Diseases

2.1. Acute Kidney Injury

Acute kidney injury (AKI) is characterized by an acute loss of renal function that reduces urinary excretion of toxic substances. The accumulation of these waste products in blood can be lethal depending on the duration and severity of AKI, triggering the use of dialysis to ensure patient survival. The pathophysiology of AKI is complex, including a number of processes that promote direct tubular cell death, obstruction and activation of renal vessels and tubular lumen, exacerbated inflammatory response and oxidative stress. lncRNAs regulate numerous genes and mechanisms involved in the pathophysiology of AKI, serving both as biomarkers and therapeutic targets against renal damage. In the next section of the review, we will update recent findings about the role of lncRNAs in different AKI subtypes, including sepsis, ischemia reperfusion, drug-induced and obstructive subtypes (Table 1).

2.1.1. Sepsis-Induced AKI

AKI may be induced in the context of severe sepsis [12]. In recent years, several studies have demonstrated the key role of lncRNAs in septic-induced AKI (SI-AKI). In a microarray study, 11,289 lncRNAs were differentially expressed in patients with SI-AKI, 5,361 were up-regulated and 5,928 were downregulated. In this study, the lncRNA TCONS_00021712 was the most upregulated and TCONS_00016406 (lncRNA 6406) the most downregulated [13].

In line with these data, reduced renal lncRNA 6406 expression was observed in an experimental model of SI-AKI induced by administration of lipopolysaccharide (LPS) [14]. LncRNA 6406 decreased LPS-mediated inflammation, oxidative stress and cell death via regulation of miR-687/PTEN axis [14]. Furthermore, the lncRNA TCONS_00016233 plasma concentration was mainly elevated in sepsis-associated AKI patients, serving as an early diagnosis biomarker for this subtype of AKI [15]. In this study, lncRNA TCONS_00016233 expression was regulated by the TLR4 signaling pathway, and this lncRNA aggravated SI-AKI by targeting the miR-22-3p/AIFM1 pathway.

The lncRNA Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1 (MALAT1) has been studied in SI-AKI. MALAT1 plasma levels have been shown to be elevated in the serum of patients with sepsis [16]. The expression of MALAT1 was increased in experimental LPS-induced AKI and LPS-treated renal cells, increasing renal injury and NF- κ B activation throughout downregulation of miR-146a [17]. There are some compounds that reduce MALAT1 expression, such as dexmedetomidine and paclitaxel, resulting in the reduction of LPS injury in HK-2 cells [16,18]. Another lncRNA upregulated in septic patients with AKI is NEAT1 (Nuclear Paraspeckle Assembly Transcript 1) [19]. Suppression of NEAT1 in LPS-treated mesangial cells reduced NF- κ B activation via miR-204 increase. Similar results were obtained in LPS-treated HK-2 cells, demonstrating that NEAT1 deficiency protected against LPS injury by targeting miR-22-3p/NF- κ B axis [20] and let-7b-5p/TRAF6 axis [21]. Furthermore, NEAT1 downregulation promoted M2-macrophage polarization via miR-125a-5p/TRAF6/TAK1 axis and ameliorated LPS-harmful effects in RAW264.7 cells [22]. The implication of NEAT1 in SI-AKI has also been observed *in vivo*. NEAT1 silencing reduced kidney injury, ameliorated renal function, inflammation (TNF- α , IL-1 β , IL-6), lipid peroxidation and cell death via miR-27a-3p/TAB3 axis in a cecal ligation puncture induced SI-AKI model in rats [23].

The lncRNA taurine upregulated gene 1 (TUG1) has also been studied in SI-AKI. Overexpression of TUG1 was protective in HK-2 cells treated with LPS by inhibiting miR-223 expression and modulating NF- κ B [24], whereas TUG1 suppression increased LPS-mediated injury [25]. Interestingly, TUG1 protective effects against LPS-injury depends on the interaction with the transcription factor Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) [26]. HOXA cluster antisense RNA 2 (HOXA-AS2) is another lncRNA involved in SI-AKI. HOXA-AS2 expression is decreased in septic patients, SI-AKI experimental models and LPS-treated HK-2 cells [27]. In this study, overexpression of HOXA-AS2 played a protective role in this syndrome via miR-106b-5p and inhibiting the Wnt/ β -catenin and NF- κ B pathways. The lncRNA, CASC2 plasma levels were reduced and negatively correlated with AKI severity in septic patients [24]. In vitro experiments in HK-2 cells reported the protective role of CASC2 against LPS-mediated apoptosis, oxidative stress and inflammation by suppressing the miR-155 and NF- κ B signaling pathway [28].

The lncRNA TapSAKI levels have been found to be elevated in urine from SI-AKI rats [29]. TapSAKI induced cell death and inflammatory response via miR-22/PTEN/TLR4/NF- κ B in LPS-treated HK-2 tubular cells. In another study, overexpression of lncRNA PVT1 in HK-2 treated with LPS and PVT1 downregulation increased the cell growth and reduced inflammation by inhibiting JNK/NF- κ B and TNF α signaling pathways [30]. Upregulation of the lncRNA HOX transcript antisense RNA (HOTAIR) was observed in LPS-cultured HK-2 cells and in an SI-AKI experimental model induced by injection of *Escherichia coli* suspension into the distal ureter of rats [31]. HOTAIR inhibited miR-22 and promoted cell death and HMGB1 expression, whereas its suppression ameliorated renal function. In contrast with this data, a later study in SI-AKI induced by cecal ligation puncture demonstrated that HOTAIR overexpression reduced renal damage, inflammation and cell death in the kidney by downregulating the miR-34a/Bcl-2 signaling pathway [32]. Recently, inhibition of the lncRNA MEG3 (maternally expressed gene 3) reduced LPS-mediated cell death via miR-21/PDCD4 in vitro in kidney proximal tubular epithelial-like cells [33].

A recent study identified DANCER as a lncRNA decreased in blood serum samples of patients with SI-AKI and in HK-2 cells treated with LPS [34]. DANCER promoted

cell viability and inhibited cell death by sequestering miR-214 and regulating Krüppel-like factor 6 expression. lncRNA CRNDE was also downregulated in an experimental model of urine-derived SI-AKI and in HK-2 and HEK293 cells treated with LPS [35]. CRNDE deficiency decreased renal function and increased cell death by inhibiting miR-181a-5p/PPAR α pathway, while CRNDE overexpression proved beneficial against LPS-mediated effects. Opposite results were reported in another experimental model of SI-AKI by LPS injection. CRNDE was upregulated in LPS injected mice and its inhibition improved renal function by regulating the TLR3/NF- κ B pathway [36]. Similarly, another study demonstrated that CRNDE overexpression activated TLR4/NF- κ B pathway via miR-146a, increasing inflammation and cell death in HK-2 cells treated with LPS [37].

The lncRNA SIKIAT1 (sepsis-induced kidney injury associated transcript 1) plays a key role in SI-AKI by increasing cell death in HK-2 cells treated with LPS via miR-96/FOXA1 axis [38]. Another lncRNA involved in SI-AKI is MIAT (myocardial infarction associated transcript). MIAT was upregulated in kidneys from LPS-injected rats and in NRK-52E cells treated with LPS, while miR-29a was decreased, suggesting an interaction between MIAT and miR-29a [39]. Moreover, in the lncRNA Whey acidic protein/Four-Disulfide Core domain 21 (Wfdc21), renal expression was increased in a cecal ligation and puncture SI-AKI model in mice and in LPS-stimulated RAW264.7 cells [40]. Wfdc21 downregulation modulated inflammatory Stat3 and TLR4 signaling pathways.

The expression of the lncRNA LINC00261 was significantly decreased in the serum of patients with sepsis and in a murine model of LPS injection [41]. In HK-2 cells treated with LPS, LINC00261 overexpression inhibited cell death and inflammation via the miR-654-5p/SOCS3/NF- κ B pathway. A recent study described the lncRNA DLX6 antisense RNA 1 (DLX6-AS1) to be increased in serum of septic AKI patients and in HK-2 cells treated with LPS [42]. This study concluded that DLX6-AS1 was involved in LPS-mediated pyroptosis via miR-223-3p/NLRP3 axis in vitro. The lncRNA small nuclear RNA host gene 5 (SNHG5) was also increased in the serum of patients with SI-AKI [43]. SNHG5 suppression inhibited cell death and inflammation response via miR-374a-3p/TLR4/NF- κ B pathway. As in the case of SNHG5, the lncRNA small nucleolus RNA host gene 14 (SNHG14) was increased in LPS-treated HK-2 cells due to the activation of the TLR4/NF- κ B pathway. This study demonstrated that SNHG14 plays a key role in cellular injury due to LPS by increasing oxidative stress, inflammation and cell death through activation of IRAK4/NF- κ B and IL-6R/STAT3 signaling via miR-93 [44]. Finally, the role of lncRNAs has also been studied in LPS-induced podocyte damage. The lncRNA GAS5 expression decreased in a time-dependent manner in LPS-stimulated podocytes. Following GAS5 knockdown by siRNA, nephrin expression and function of podocyte barrier was decreased by reducing PTEN expression via PI3K/AKT [45].

2.1.2. Ischemia-Reperfusion

One of the most common processes inducing AKI is ischemia reperfusion (I/R). I/R injury is caused by the blockade of blood flow, leading to hypoxia and accumulation of metabolic products in the kidney, followed by a period of reperfusion that enhances renal injury by activating an inflammatory response [9,11,46].

A recent RNAseq study determined the lncRNA expression profile in a murine model of I/R, showing 5868 lncRNAs differentially expressed in the kidney [47]. In this study, the lncRNA NONHSAT183385.1 was increased in human tubular epithelial cells after hypoxia and reoxygenation, suggesting a key role in this pathological setting. 2267 differentially expressed lncRNAs were also observed in experimental I/R [48]. Microarray data were further confirmed by gene expression analysis, showing upregulation of several lncRNAs (ENSMUST00000124572, ENSMUST00000097928, ENSMUST00000180989, ENSMUST00000147219, uc007mos1 and ENSMUST00000169128) and downregulation of NR_040589, ENSMUST00000145410, ENSMUST00000139773, and AK078749. Gene ontology analysis showed that these lncRNAs participated in multiple biological processes in I/R, including glycine, serine, threonine metabolism and inflammatory pathways.

The lncRNA X-inactive specific transcript (*Xist*) has been shown to increase in I/R damaged kidneys and in renal cells after hypoxia/reoxygenation treatment, inducing apoptosis and inflammation through the modulation of miR-124-3p and its target gene ITGB1 [49]. Other authors have confirmed upregulation of *Xist* in I/R and identified the role of this lncRNA in the modulation of miR142-5p and PDCD4 [50]. The lncRNAs H19, MALAT1 and NEAT1 were also upregulated in human biopsies of AKI, experimental models of I/R and in cultured hypoxic endothelial and tubular cells [51–54]. Overexpression of the lncRNA H19 in an experimental I/R model, improved renal function and angiogenesis, and diminished inflammation and apoptosis throughout regulation of miR-30a-5p [51]. However, gene deletion of MALAT1 in mice did not improve renal function, tubular injury, inflammation or fibrosis [52]. In another study, downregulation of MALAT1 in cultured hypoxic cells significantly increased expression of HIF-1 α , IL-6, TNF- α and NF- κ B [53]. In vitro gene blockade of NEAT1 reduced hypoxia-mediated apoptosis (Bax/Bcl-2 ratio) and increased miR27a-3p expression, identifying this miRNA as a target of NEAT1 [54].

In cultured tubular cells, upregulation of the lncRNA EGOT diminished hypoxia/reoxygenation mediated autophagy via interaction with the RNA-binding protein Hu antigen R (HuR) and further regulation of the ATG7/16L1 expressions [55]. LncRNA GAS5 was induced by I/R injury, promoting renal apoptosis by regulation of the miR-21/TSP-1 axis [55]. The lncRNA LINC00520 was upregulated in I/R injured rats and in hypoxic tubular epithelial cells, being associated with a reduction of miR-27b and increased levels of the Oncostatin M receptor (OSMR) [56]. The gene blockade of LINC00520 reduced renal damage through the attenuation of OSMR levels and PI3K/AKT signaling pathway [56]. In addition, the gene blockade of lncRNA SNHG14 in I/R reduced inflammation and oxidative stress by modulating miR-124-3p, which regulates MMP2 levels [57]. In two recent studies, HK2 cells under hypoxia increased HIF-1 α levels through the lncRNA PRINS and its interaction with CCL5 [58]. The lncRNA MEG3 was also found to be elevated in human tubulointerstitial cells, aggravating hypoxia/reoxygenation induced apoptosis throughout regulation of the miR-129-5p/HMGB1 axis [59]. All these results confirm the emerging role of lncRNAs in the pathophysiology of I/R renal injury and their possible use as biomarkers in this pathological setting.

Table 1. Effects of lncRNAs in experimental AKI.

AKI Model	lncRNA	Targeted miRNA	miRNA Beneficial Effects	References
Sepsis	lncRNA 6406	miR-687	Reduces inflammation, oxidative stress and cell death.	[13]
	TCONS_00016233	miR-22-3p	Inhibits apoptosis and TLR4-mediated inflammatory response.	[15]
	MALAT1	miR-146a	Reduces cell death and NF- κ B mediated inflammation.	[16–18]
	NEAT1	miR-204	Decreases oxidative stress, apoptosis and NF- κ B associated inflammation.	[19]
		miR-22-3p	Reduces oxidative stress, cell death, autophagy and inflammation	[20]
		miR-125a-5p	Decreases inflammation by promoting macrophage M2 polarization.	[22]
		miR-27a-3p	Alleviates oxidative stress, apoptosis and reduces kidney injury.	[23]
	TUG1	miR-223	Reduces oxidative stress and cell death by activating Nrf2 pathway.	[24–26]
	HOXA-AS2	miR-106b-5p	Inhibits NF- κ B/Wnt/ β -catenin pathways and reduces renal damage.	[27]
	CASC2	miR-155	Suppresses NF- κ B mediated inflammatory cytokines expression.	[28]

Table 1. Cont.

AKI Model	LncRNA	Targeted miRNA	miRNA Beneficial Effects	References
Sepsis	TapSAKI	miR-22	Inhibits cell apoptosis and inflammation.	[29,30]
	HOTAIR	miR-22	Decreases cell death and improves renal function.	[31]
		miR-34a	Improves renal function, reduces cell death and inflammation.	[32]
	MEG3	miR-21	Reduces cell apoptosis.	[33]
	DANCR	miR-214	Suppresses cell death and inflammatory cytokines production.	[34]
	CRNDE	miR-181a-5p	Induces cell proliferation and decreases cell death and inflammation.	[35]
		miR-146a	Reduces cell death and inflammatory TLR4/NF-κB signaling pathway.	[37]
	SIK1AT1	miR-96	Decreases cell apoptosis.	[38]
	MIAT	miR-29a	Reduces cell death by inhibiting caspase 8.	[39]
	LINC00261	miR-654-5p	Suppresses cell apoptosis and inflammation via. NF-κB inhibition.	[41]
	DLX6-AS1	miR-223-3p	Decreases NLRP3 expression and pyroptosis.	[42]
	SNHG5	miR-374a-3p	Reduces NF-κB/TLR4 mediated inflammation and cell death.	[43]
	SNHG14	miR-93	Ameliorates oxidative stress, cell death and inflammation by activating IRAK4/NF-κB signaling.	[44]
I/R	XIST	miR-124-3p	Improves renal function and decreases inflammation.	[49]
		miR142-5p	Reduces renal injury and inflammation.	[50]
	H19	miR-30a-5p	Decreases cell death and inflammation.	[51]
	MALAT1	miR-146a	Improves renal injury, inflammation, and fibrosis.	[52,53]
	NEAT1	miR27a-3p	Ameliorates hypoxia-mediated cell death.	[54]
	GAS5	miR-21	Reduces renal injury and cell death.	[60]
	LINC00520	miR-27b-3p	Improves renal injury and cell death.	[56]
	SNHG14	miR-124-3p	Decreases inflammation and oxidative stress.	[57]
Cisplatin	MEG3	miR-129-5p	Reduces tubuloe epithelial cell death.	[59]
	XLOC-032768		Decreases apoptosis and inflammation.	[61]
	LRNA9884		Reduces tubular cell death and inflammation.	[62]

Table 1. Cont.

AKI Model	lncRNA	Targeted miRNA	miRNA Beneficial Effects	References
UUO	TCONS_00088786		Reduces TGF- β /Smad mediated fibrosis.	[63]
	TCONS_01496394			[63]
	Gm10251			[64]
	Fam120aos		Decreases fibrosis in tubular cells.	[64]
	Gm16076			[64]
	lncRNA 74.1		Reduces fibrosis by inhibiting Nrf2-Keap1 pathway.	[65,66]
	MIAT		Targets α -SMAD and reduces fibrosis.	[67,68]
	H19			[69]
	HOTAIR	miR-124	Reduces fibrosis by inhibiting Notch1.	[70,71]

2.1.3. Nephrotoxic Agents

One of the most remarkable nephrotoxic agents is cisplatin, which induces inflammation, cell death and tubular cell injury [72,73]. Zhou et al. explored the role of lncRNA XLOC-032768 in cisplatin-induced AKI in vivo and in vitro. Their results show that overexpression of this lncRNA decreased apoptosis and TNF-mediated inflammation in mice and cells exposed to cisplatin [61]. The lncRNA LRNA9884 was also increased in the nucleus of renal epithelial tubular cells in a cisplatin-induced AKI model [62].

2.1.4. Obstructive AKI

Obstructive nephropathy is a recurrent cause of AKI [74]. If not treated in time, AKI associated to obstructive nephropathy can eventually lead to chronic kidney disease (CKD). The best experimental approach to study the AKI-CKD transition is the murine model of unilateral ureteral obstruction (UUO) [75]. The UUO model is characterized by a reduced GFR and blood flow, oxidative stress, renal cell death and tubulointerstitial fibrosis. All these phenomena contribute to a progressive loss of renal function [76,77].

Sun et al. examined the differential expression of lncRNAs in kidneys from UUO mice. They observed that 24 lncRNAs were upregulated and 79 lncRNAs downregulated [63]. Specifically, TGF- β regulated the expression of lncRNAs TCONS_00088786 and TCONS_01496394, which are involved in the modulation of the profibrotic TGF- β /Smad pathway. Additional urine analysis reported upregulation of 625 lncRNAs and downregulation of 177 lncRNAs, some of which (NONRATT044682, 361619 and 689064) could be possible biomarkers of renal fibrosis. In another study, lncRNAs Gm10251, Fam120aos and Gm16076 regulated the Jak/STAT pathway, whereas lncRNAs Fam12aos and Gm16076 interacted with fibroblast integrin beta1 (ITGB1) [64]. The lncRNA 74.1 was downregulated in HK-2 cells exposed to TGF- β . Moreover, lncRNA 74.1 overexpression reduced fibrosis by activating autophagy and the Nrf2-keap1 pathway in cultured HK-2 cells and the UUO model [65,66].

TGF- β upregulated lncRNAs MIAT and H19 in renal cells, suggesting an important role of these lncRNA in renal interstitial fibrosis [67–69]. Supporting this hypothesis, deletion of H19 reduced production of α -SMA and collagen IV in UUO mice and HK-2 cells [69].

lncRNA HOTAIR expression was upregulated in UUO, inhibiting miR-124 expression in UUO mice [71]. Since miR-124 blocked the Notch1 signaling pathway and prevented fibrosis and epithelial to mesenchymal transition, HOTAIR suppression promoted the development of fibrosis and chronic renal failure [70]. Finally, deficiency of the lncRNAGas5 aggravated renal fibrosis in the UUO mice [78].

2.2. Chronic Kidney Disease

CKD is defined by an estimated glomerular filtration rate (eGFR) of less than 60 mL/min/1.73 m². Hypertension and heart disease constitute the majority of cardio-

vascular (CV) risk factors found in CKD patients [79] and are the primary cause of death due to complications, such as anemia [80]. Several miRNAs have been associated with CKD and CV diseases. In a study by Fournidier et al., the authors evaluated the role of two circulating miRNAs (miR-223 and miR-126) in this pathology [81]. They reported that decreased miR-126 and miR-223 serum levels were associated with mortality, CV events and lower eGFR at different CKD stages. They observed that the link between these two miRNAs serum levels, the mortality, the CV diseases and the renal events appears to depend on the eGFR in CKD. Non-coding RNAs could be, thus, useful as diagnostic or prognostic biomarkers in CKD patients. Unfortunately, multiple issues limit the use of miRNAs as therapeutic targets for CKD, such as ubiquitous tissular expression, toxicity or off-target effects [82]. To date, most of the research on ncRNAs and CKD has been focused on miRNAs but not much is known about the role of lncRNAs. In 2016, the study of Khurana et al. identified urinary exosomal ncRNAs (exo-ncRNAs) as new biomarkers for early CKD diagnosis [83]. By RNASeq and novel computational algorithm analysis, the authors identified 30 differentially expressed ncRNA (including 16 miRNAs, 2 tRFs, 3 mt-tRNAs and 9 lincRNAs) in the early stages of CKD compared to healthy controls. Among these, 16 miRNAs showed significant alterations in their abundance. Nine were significantly increased and seven were significantly decreased in early CKD stages compared to healthy controls. Interestingly, miRNA-181a is the one whose exosomal abundance was significantly decreased by about 200-fold in all four stages of CKD in patients compared to healthy controls. Thus, in the future, miR-181a could be employed as a potential biomarker for early detection of CKD. In addition to miRNAs, the study has identified in CKD patients, nine antisense RNAs differentially present in exosomes compared to healthy controls. They also observed that two tRFs were significantly decreased in exosomes of CKD patients vs. healthy controls. Three exosomal mt-tRNAs were also significantly decreased in CKD patients as compared to healthy controls. Furthermore, this study investigated whether urinary extracellular RNAs (exRNAs) are derived from kidney related cells. For this matter, they employed a cell culture system reflecting CKD by exposing renal proximal tubular epithelial cells (RPTECs) to oncostatin M (OSM), TGF- β 1 and IL-1 β . They found some evidence that urinary exRNAs might originate from kidney-related cell types. Finally, this study identified a significant number of potential diagnostic biomarkers that might be employed in CKD in future research.

Another study published in 2019 found that lncRNAs NOP14-AS1 and HCP5 were potential prognostic biomarkers in CKD [84]. They first compared the expression profiles of several lncRNAs in healthy individuals and CKD patients with normal controls. They screened 821 significantly differentially expressed mRNAs and lncRNAs using Limma (www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/limma.html) (accessed on 22 January 2021) between CKD and control samples. A lncRNA-miRNA-mRNA-pathway network using these overlapping pathways, revealed that lncRNAs of HCP5 and NOP14-AS1 and genes of CCND2, COL3A1, COL4A1 and RAC2 were significantly correlated with CKD. In summary, this study suggested that several lncRNAs (i.e., NOP14-AS1 and HCP5) were potential prognostic biomarkers for CKD progression.

Furthermore, Chun-Fu Lai et al. reported that elevated plasma level of lncRNA DKFZP434I0714 was a reliable biomarker in uremic patients to predict adverse CV outcomes [85]. The authors validated that elevated plasma level of lncRNA DKFZP434I0714 predicts adverse CV outcomes and death in patients with end stage renal disease (ESRD). Further analyses revealed that lncRNA DKFZP434I0714 was increased in human aortic endothelial cells (HAEC) stressed with hypoxia and is involved in endothelial dysfunction and inflammation. Thus, knocking down DKFZP434I0714 inhibited the expression of ICAM-1 (intracellular adhesion molecule 1) and VCAM-1 (vascular cells adhesion molecule 1), increased the expression of eNOS (endothelial nitric oxide synthase) and reduced hypoxia-mediated endothelial cell apoptosis and monocyte adhesion.

Taken together, these data collectively suggest a potential role of lncRNA DKFZP434I0714 as a new class of prognostic biomarker of adverse CV outcomes in ESRD patients, showing

its involvement in the pathogenesis of endothelial dysfunction, vascular inflammation and atherosclerosis. Indeed, the present study revealed that lncRNA DKFZP434I0714 is involved in the pathogenesis of endothelial dysfunction, vascular inflammation and atherosclerosis.

Santer et al. studied whether the presence of CKD modified the association of plasma LIPCAR (long intergenic non-coding RNA predicting cardiac remodeling) with left ventricular (LV) remodeling and CV outcomes in patients with heart failure (HF) [86]. In this study, plasma LIPCAR levels were independently associated with higher risk of hospitalization in elderly HF patients without CKD. Plasma LIPCAR could be a predictor of HF outcomes in elderly patients without CKD. Table 2 summarizes some of the ncRN prognostic biomarkers for CKD.

Table 2. Representative ncRNAs as prognostic biomarkers.

ncRNAs	Prediction/Biomarker	Reference
Urinary exosomal ncRNAs -miRNA-181a -9 antisense RNAs (EAF1-AS1, PCBP1-AS1, RP11-178F10.1, RP11-315I20.1, RP11-378E13.4, RP11-68I3.2, RP11-700F16.3, RP11-98D18.1 and RP11-1382.1) -trf ^{Val} , trf ^{Leu}	Diagnostic biomarker for early detection of CKD	[83]
LncRNA NOP14-AS1 and LncRNA HCP5	Predicting CKD progression	[84]
LncRNA DKFZP434I0714	Predicting adverse CV outcomes in ESRD patients	[85]
LncRNA LIPCAR	Predicting HF outcomes in patients without CKD	[86]

Abbreviations: ncRNAs, non-coding RNAs; miRNA, microRNA; trf^{Val}, trf^{Leu}; CKD; LncRNA, long non-coding RNA; CV, Cardiovascular; ESRD, end-stage renal disease; LIPCAR, long intergenic non-coding RNA predicting cardiac remodeling; HF, Heart Failure.

Arbiol-Roca et al. were the first to study the association of antisense RNA in the INK4 locus (ANRIL) polymorphisms with Major Adverse CV Events (MACE) in CKD patients in Hemodialysis (HD) [87]. HD is a therapeutic procedure to remove fluid and waste products from the patient's blood used in the management of acute and chronic renal disease. Using a multivariate model, ANRIL polymorphism rs10757278 was the only one that showed a statistically significant relationship with MACE and diabetes mellitus. Those findings of ANRIL polymorphisms may contribute in the future to the management of MACE in the HD population.

A recent study in human aortic smooth muscle cells (HA-VSMCs) by Bao et al. found that osteogenic differentiation induced by high phosphorus may be regulated by eight lncRNAs (NONHSAT058810.2, NONHSAT197162.1, NONHSAT 033640.2, NONHSAT036152.2, NONHSAT179247.1, NONHSAT162315.1, NONHSAT061050.2 and NONHSAT006046.2) [88]. All these lncRNAs may regulate the expression of transcription factors (TFs), such as STAT1, KAT2A, GATA2, TAF7 and REST. Altogether, this working list of lncRNAs may be associated with osteogenic differentiation induced by high phosphorus.

Another recent study aimed to understand the transcriptional profile of the proximal tubule (PT) during kidney fibrosis to explain why CKD progresses faster in males versus females [89]. They used the UUO mouse model of kidney fibrosis in which they performed translating ribosome affinity purification (TRAP). The study identified a total of 439 lncRNAs expressed in PT, of which, 143 underwent differential regulation during fibrosis. RNA in situ hybridization (ISH) of Snhg18 (high expression) and Gm20513 (low expression), two representative lncRNAs, confirmed the fibrotic-induced expression patterns. Subsequently, they focused on the potential target mRNAs that could be regulated by Snhg18 and Gm20513. Interestingly, the putative target genes were related to proinflammatory genes such as Fcgr2b, Cx3cr1, Lpl and Alox5ap. Finally, they implemented a data-driven approach to identify key transcription factors that lead to disease progression in kidney

fibrosis. They identified proinflammatory and profibrotic transcription factors such as Irf1, Nf-kb1 and Stat3 as potential drivers of fibrosis regulation.

LncRNAs have also been associated with renal fibrosis via TGF- β , a master regulator of fibrosis that promotes renal fibrosis, via lncRNAs implicated in TGF- β 1 isoform [90]. Although TGF- β 1 has a dominant role to promote renal fibrosis, its effector Smad proteins (Smad2, Smad3 and Smad4) exert distinct and even opposing functions in the regulation of fibrosis. Smad3 exerts a profibrotic function and can induce transcription of profibrotic miRNAs and lncRNAs [91]. RNA sequencing and array analysis have identified approximately 21 lncRNAs induced by TGF- β /Smad3 signaling in the kidney. Among them, the lncRNAs np_5318 and np_17856 were involved in TGF- β -mediated renal fibrosis [92]. Other studies identified lncRNA np_4334 (also named Ptpd-IR) as a novel molecular target for TGF- β 1-mediated nephritis [93]. They found that Ptpd-IR knockdown attenuated NF- κ B activation and its inflammatory targets in cultured tubular epithelial cells and UUO mice. They also discovered a highly conserved site for Smad3 binding within the Ptpd-IR promoter. These findings open novel therapies against inflammation and fibrosis in CKD by targeting lncRNAs, although data are currently limited.

2.3. Diabetic Nephropathy

In the publication of Long et al., lncRNA taurine-upregulated 1 (Tug1) has been reported to play a role in diabetic nephropathy (DN) [25,94]. In these studies, authors performed RNA-seq to identify changes in lncRNA levels. They found that glomerular Tug1 levels were decreased in diabetic mice as well as in renal biopsies from diabetic patients. The authors demonstrated that Tug1 regulates mitochondrial function in podocytes via PGC-1 α (Peroxisome proliferator activated receptor- γ Coactivator-1 α). Moreover, transgenic mice that overexpressed Tug1 specifically in podocytes were protected from diabetes-induced CKD, suggesting that this lncRNA may be a possible therapeutic target to treat kidney disease and/or diabetes.

RNA deep-sequencing techniques in glomeruli from streptozotocin-induced diabetes identified a cluster of nearly 40 miRNAs regulated by the lncRNA lnc-Megacluster (lnc-MGC) [95]. This lncRNA was under the control of CHOP (endoplasmic reticulum stress-related transcription factor). Inhibition of lnc-MGC decreased the expression of key cluster kidney miRNAs, triggering early diabetic nephropathy (DN).

Xist has already shown to be active in several roles, including X-chromosome silencing and tumoral progression. Xist was recently shown to be deregulated in DN [96]. Xist was overexpressed in experimental DN and renal biopsies from DN patients. Moreover, Xist downregulation triggered miR-93-5p overexpression, which in turn diminished Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A (CDKN1A) expression, alleviating renal interstitial fibrosis in DN. This work demonstrated that silencing Xist may provide a future strategy to stop the progression of DN [96]. A close relationship between lncRNA KCNQ1 opposite strand/antisense transcript 1 (KCNQ1OT1)/miR-18b-5p/Sorbin and SH3 Domain Containing 2 (SORBS2) was also described in DN [97]. The authors showed that either silencing of SORBS2 or knockdown of KCNQ1OT1 diminished NF- κ B-mediated proliferation, fibrosis and apoptosis in renal cells exposed to high glucose concentrations.

Several miRNAs have been identified as possible biomarkers for diabetes and DN, but few researchers have addressed the involvement of lncRNAs in this pathological context. Yang et al. studied the lncRNA profiles of patients with diabetes mellitus and DN [47]. In this article, 245 lncRNAs were upregulated and 680 downregulated in the serum of diabetic patients as compared with healthy individuals, while 45 and 813 lncRNAs were up- and downregulated, respectively, in the serum of DN patients compared with diabetic patients [47]. Another interesting diabetes-related mechanism was found concerning angiotensin II type 1 receptor-associated protein (ARAP). ARAP is involved in the trafficking of other receptors, including EGFR and TRAIL-R that may also contribute to deleterious effects of diabetes in the kidney. lncRNA-ARAP1-AS1 and ARAP1-AS2 enhance ARAP1 mRNA expression and may be involved in the pathogenesis of diabetes and DN. Indeed,

circulating lncRNA-ARAP1-AS1, ARAP1-AS2 and ARAP1 may serve as new biomarkers for diabetes and DN. ARAP1 regulates blood pressure and renal physiology by activating the intrarenal renin–angiotensin system [98]. Inhibiting proteins of the ARAP1/AT1R signaling pathway decreases kidney damage by alleviating renal inflammation, extracellular matrix accumulation and fibrosis [99]. It is, thus, probable that lncRNAs regulating the ARAP1 transcript are implicated in the course of DN. Conversely, Li et al. published the role of ARAP1 and its antisense RNA, ARAP1-AS2, in the pathogenesis of diabetes in cytoskeleton rearrangement under high glucose conditions and epithelial–mesenchymal transition indicating an important role in diabetic renal fibrosis [100].

2.4. Glomerular Diseases

2.4.1. Lupus Nephritis

Increased expression of the pro-apoptotic lncRNA-p21 was found in monocytes and urinary cells from patients with lupus nephritis (LN), correlating with the activity of disease (33,396,699). In this article, the authors found that LN mice showed a progressive increase in lncRNA-p21. The lncRNAs RP11-2B6.2 and CircHLA-C were increased in renal biopsies from patients with LN [101,102]. RP11-2B6.2 was positively correlated with the inflammatory status of the disease [101], whereas CircHLA-C correlated with proteinuria, creatinine and crescentic glomeruli [102]. Experimental studies in renal cells demonstrated that the lncRNA RP11-2B6.2 inhibited the suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1), thus reducing type 1 interferon [101]. LncRNA found in dendritic cells (lnc-DC) was also found to be elevated in patients with LN, mainly in those with active LN [103]. As well, circRNA_002453 plasma level was found to be elevated in patients with LN, being positively correlated with proteinuria and kidney disease activity [104].

2.4.2. Focal Segmental Glomerulosclerosis

Patients with focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) showed higher expression of lncRNA LOC105375913 [105]. Further experiments in tubular cells and experimental mice demonstrated that LOC105375913 inhibited miR-27b, thus promoting overexpression of Snail and tubulointerstitial fibrosis. This lncRNA was activated by the C3a/p38/XBP-1s pathway [105]. In other study, it was demonstrated that lncRNA LOC105374325 caused podocyte injury in individuals with FSGS [106]. The authors showed that LOC105374325 reduced miR-34c and miR-196a/b levels, resulting in an increased expression of the pro-apoptotic proteins Bax and Bak. LOC105374325 upregulation in this pathological setting may be related to activation of the P38/C/EBP β pathway in the podocytes of these individuals.

2.4.3. IgA Nephropathy

Many lncRNAs are differently expressed in patients with IgA-negative Mesangial proliferative glomerulonephritis and may contribute to disease development [107]. More recently, a microarray analysis in monocytes from IgA nephropathy patients and healthy individuals identified more than 250 differentially expressed lncRNAs and mRNAs, mainly involved in the regulation of innate immune response [108]. Similar results were found in other studies applying a system biology approach, where 217 lncRNA differentially expressed in PBMCs were suggested as potential factors involved in IgA nephropathy pathophysiology [109]. In this article, HOTAIR was the topmost lncRNA in regulating differentially expressed genes/miRNAs in IgA nephropathy. A recent study determined serum levels of exosomal lncRNA in patients with IgAN and found that the lncRNA-G21551 was down-regulated and may be a potential surrogate biomarker of the disease [110].

2.4.4. Membranous Nephropathy

The role of lncRNA has also been explored in membranous nephropathy (MN), where increased levels of the lncRNA Xist were found in urinary samples of MN patients and kidneys from mice with MN [111]. In cultured podocytes, down-regulation of lncRNA Xist inhibited angiotensin II-mediated apoptosis by suppressing the miR-217-TLR4 pathway [112].

2.5. Renal Cancers

As with proteins and miRNAs, lncRNAs can be divided into two categories cancer-wise: the pro-tumoral (increased in the tumour) and the tumour suppressors (decreased in the tumour). Unsurprisingly when dealing with gene regulators, many lncRNA transcripts are associated with tumoral progression such as *Xist*, one of the best characterized lncRNAs [2]. *Xist* is located on the long (q) arm of the X chromosome in placental mammals and is instrumental in the X-inactivation process enabling equal expression of the X and autosomal chromosomes. *Xist* maintains dosage compensation for approximately 1000 genes on the X chromosome, some of which are possible oncogenes. *Xist* expression has been shown to be decreased in renal cell carcinoma [113]. Additionally, the authors showed that *Xist* over-expression decreases proliferation and is a stop signal at stage G0/G1 by targeting the miR-106b/P21 axis. The lncRNA ANRIL is overexpressed in several cancers, including malignant breast cells, and its subcellular location is an indicator of cancer progression [114]. In general, ANRIL overexpression in tumour cells favours proliferation and cell survival, while its inhibition decreases tumour mass and increases apoptosis. The same is true in kidneys, as ANRIL overexpression favours the invasive potential of renal carcinoma cells by impacting the β -catenin pathway [115]. The role of MALAT1 RNA, a highly expressed and conserved transcript, in carcinogenesis, has been abundantly documented [116]. In renal cell carcinoma, MALAT1 is highly expressed and interacts with miR-203 and BIRC5 to increase cell proliferation [117]. These are some of the most striking examples of lncRNAs involved in renal cancer, for which there is a comprehensive review [118].

3. Perspectives in Therapy

lncRNAs are prime candidates as biomarkers in the nephrological field (Figure 1). Several studies, summarized in this review, have shown that screening pre-clinical or cellular models can help to identify new lncRNAs that will be later developed as diagnostic and/or prognostic biomarkers. Compared to miRNAs, they have the advantage of being more tissue-specific. At this time, the main biofluid studied is the blood (as summarized in this review) but urinary expression of lncRNAs also has a strong biomarker potential. However, to the best of our knowledge, few studies have been published in the nephrology field. The study of Khurana et al., that identified urinary exosomal ncRNAs in CKD patients, was already discussed in the CKD sub-chapter [83]. A recent study in the related urological field shows that a urinary lncRNA panel has potential clinical value to diagnose bladder cancer [119]. Their smaller counterparts, miRNA, were also recently shown to have the same potential in the same organ, but the authors noted the importance of the controls being age- and sex-related [120]; this also proves true when measuring lncRNAs.

lncRNAs are closely related to progression of renal damage and therapeutic strategies targeting these molecules may be useful to ameliorate this pathology [121]. The development of new therapies using RNA interference is a present challenge, and miRNAs have an important role in the regulation of several kidney pathologies. Several carriers such as exosomes, microvesicles and high-density lipoproteins have been shown to carry functional miRNAs in association with other compounds (lipids, proteins and mRNAs). (Figure 2) These naturally occurring nanomaterials can be used to deliver functional lncRNAs to specific renal cells [122]. Extrinsic nanotechnology vehicles can also be used, such as 13 nm wide gold nanoparticles functionalized with monolayers of alkythiol-modified RNA molecules. CRISPR/cas9 system is another system useful in the non-coding RNA field, as specific CRISPR/cas9 scissors can be used to target selected sites to abolish the long-term expression of RNAs [6]. Thus, lncRNAs, miRNAs or antisense sequences can be delivered to the kidney (depending on the context).

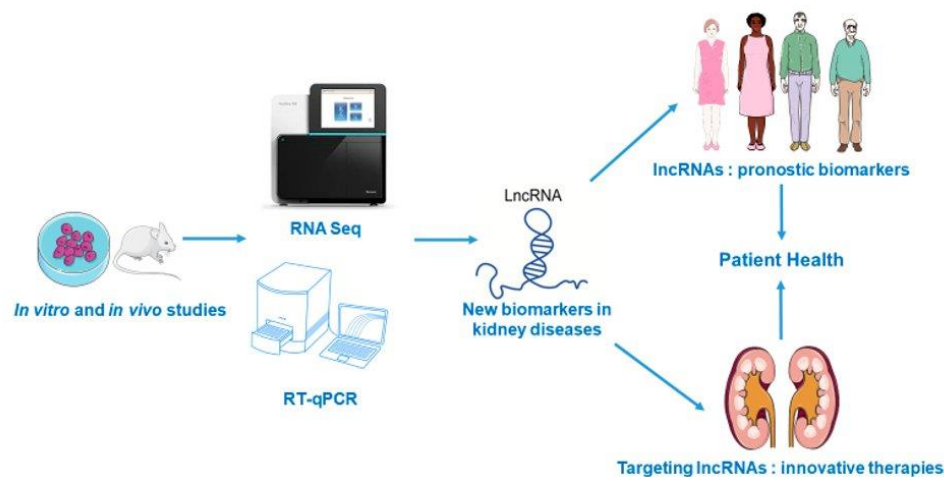


Figure 1. Use of lncRNAs as new prognostic biomarkers and novel therapeutic targets in renal diseases.

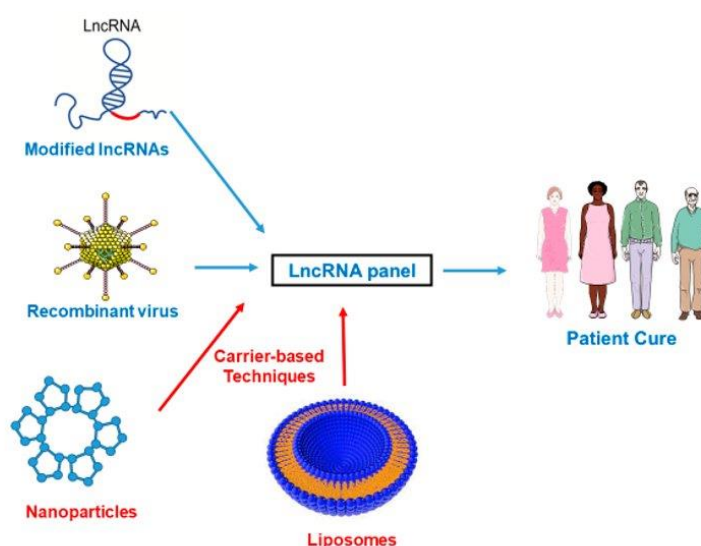


Figure 2. Innovative therapies targeting lncRNAs in the kidney.

4. Conclusions

lncRNAs have been identified as key molecules involved in the pathophysiology of renal injury and may be useful as potential biomarkers for the early diagnosis and prognosis of patients with kidney diseases (Figure 1). New biomarkers are sorely needed in the field of renal diseases in order to have a better prognosis, and it is our belief that lncRNAs can be welcome candidates. Furthermore, regulation of these non-coding RNAs opens new therapeutic approaches to decrease renal damage, although it is necessary to develop new studies to fully address this issue. New technological tools have appeared,

such as nanotechnologies and CrispR/Cas9 (Figure 2), and we can be sure that they will facilitate the transition from the bench to the clinical bed.

Author Contributions: All authors have contributed to the writing, editing, discussion and revision of this manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by SFNDT, Vifor. (L.M., V.M.-L.M. and E.H.), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII, FIS-FEDER PI17/00130 and PI20/00375), Spanish Biomedical Research Centre in Cardiovascular Diseases (CIBERCV), Spanish Ministry of Science and Innovation (RYC-2017-22369), and Spanish Society of Nephrology (SEN). The “PFIS” and “Sara Borrell” training program of the ISCIII supported the salary of MGH (FI18/00310) and SR-M (CD19/00021). Córdoba University supported the salary of C.G.C. No other relevant affiliations or financial involvement exist with any organization or entity with a financial interest in, or financial conflict with the subject matter, or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants, or patents receiving monies or royalties.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Cech, T.R. The RNA worlds in context. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, *4*, a006742. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Yang, L.; Froberg, J.E.; Lee, J.T. Long noncoding RNAs: Fresh perspectives into the RNA world. *Trends Biochem. Sci.* **2014**, *39*, 35–43. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Crick, F.H. On protein synthesis. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **1958**, *12*, 138–163.
4. Bartel, D.P. MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions. *Cell* **2009**, *136*, 215–233. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Catalanotto, C.; Cogoni, C.; Zardo, G. MicroRNA in control of gene expression: An overview of nuclear functions. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1712. [\[CrossRef\]](#)
6. Metzinger-Le Meuth, V.; Fourdinier, O.; Charnaux, N.; Massy, Z.A.; Metzinger, L. The expanding roles of microRNAs in kidney pathophysiology. *Nephrol. Dial. Transpl.* **2019**, *34*, 7–15. [\[CrossRef\]](#)
7. Mattick, J.S. The state of long non-coding RNA biology. *Noncoding RNA* **2018**, *4*, 17. [\[CrossRef\]](#)
8. Bhat, S.A.; Ahmad, S.M.; Mumtaz, P.T.; Malik, A.A.; Dar, M.A.; Urwat, U.; Shah, R.A.; Ganai, N.A. Long non-coding RNAs: Mechanism of action and functional utility. *Noncoding RNA Res.* **2016**, *1*, 43–50. [\[CrossRef\]](#)
9. Guttman, M.; Donaghey, J.; Carey, B.W.; Garber, M.; Grenier, J.K.; Munson, G.; Young, G.; Lucas, A.B.; Ach, R.; Bruhn, L.; et al. lincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation. *Nature* **2011**, *477*, 295–300. [\[CrossRef\]](#)
10. Song, Z.; Lin, L.; Li, Z.; Huang, C. The nuclear functions of long noncoding RNAs come into focus. *Noncoding RNA Res.* **2021**, *6*, 70–79. [\[CrossRef\]](#)
11. Geisler, S.; Collier, J. RNA in unexpected places: Long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2013**, *14*, 699–712. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Poston, J.T.; Koyner, J.L. Sepsis associated acute kidney injury. *BMJ* **2019**, *364*, k4891. [\[CrossRef\]](#)
13. Chun-Mei, H.; Qin-Min, G.; Shu-Ming, P.; Xiang-Yang, Z. Expression profiling and ontology analysis of circulating long non-coding RNAs in septic acute kidney injury patients. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2016**, *54*, e395–e399. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Liu, X.; Zhu, N.; Zhang, B.; Xu, S.B. Long noncoding RNA TCONS_00016406 attenuates Lipopolysaccharide-induced acute kidney injury by regulating the miR-687/PTEN pathway. *Front. Physiol.* **2020**, *11*, 622. [\[CrossRef\]](#)
15. Zhang, P.; Yi, L.; Qu, S.; Dai, J.; Li, X.; Liu, B.; Li, H.; Ai, K.; Zheng, P.; Qiu, S.; et al. The biomarker TCONS_00016233 drives septic AKI by targeting the miR-22-3p/AIFM1 signaling axis. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2020**, *19*, 1027–1042. [\[CrossRef\]](#)
16. Xu, L.; Hu, G.; Xing, P.; Zhou, M.; Wang, D. Paclitaxel alleviates the sepsis-induced acute kidney injury via lnc-MALAT1/miR-370-3p/HMGB1 axis. *Life Sci.* **2020**, *262*, 118505. [\[CrossRef\]](#)
17. Ding, Y.; Guo, F.; Zhu, T.; Li, J.; Gu, D.; Jiang, W.; Lu, Y.; Zhou, D. Mechanism of long non-coding RNA MALAT1 in lipopolysaccharide-induced acute kidney injury is mediated by the miR-146a/NF- κ B signaling pathway. *Int. J. Mol. Med.* **2018**, *41*, 446–454. [\[CrossRef\]](#)
18. Zhu, S.; Lu, Y. Dexmedetomidine suppressed the biological behavior of HK-2 cells treated with LPS by down-regulating ALKBH5. *Inflammation* **2020**, *43*, 2256–2263. [\[CrossRef\]](#)

19. Chen, Y.; Qiu, J.; Chen, B.; Lin, Y.; Chen, Y.; Xie, G.; Qiu, J.; Tong, H.; Jiang, D. Long non-coding RNA NEAT1 plays an important role in sepsis-induced acute kidney injury by targeting miR-204 and modulating the NF- κ B pathway. *Int. Immunopharmacol.* **2018**, *59*, 252–260. [\[CrossRef\]](#)
20. Feng, Y.; Liu, J.; Wu, R.; Yang, P.; Ye, Z.; Song, F. NEAT1 aggravates sepsis-induced acute kidney injury by sponging miR-22-3p. *Open Med.* **2020**, *15*, 333–342. [\[CrossRef\]](#)
21. Gao, C.; Zou, X.; Chen, H.; Shang, R.; Wang, B. Long non-coding RNA nuclear paraspeckle assembly transcript 1 (NEAT1) Relieves sepsis-induced kidney injury and Lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation in HK-2 cells. *Med. Sci. Monit.* **2020**, *26*, e921906. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Wang, W.; Guo, Z.-H. Downregulation of lncRNA NEAT1 ameliorates LPS-induced inflammatory responses by promoting macrophage M2 polarization via miR-125a-5p/TRAFF6/TAK1 axis. *Inflammation* **2020**, *43*, 1548–1560. [\[CrossRef\]](#)
23. Wang, J.; Chen, Y.; Tang, Z.; Hu, D.; Yao, C.; Yang, L. LncRNA NEAT1 regulated inflammation and apoptosis in a rat model of sepsis-induced acute kidney injury via MiR-27a-3p/TAB3 axis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2020**, *84*, 2215–2227. [\[CrossRef\]](#)
24. M'baya-Moutoula, E.; Louvet, L.; Molinié, R.; Guerrero, I.C.; Cerutti, C.; Fourdinier, O.; Nourry, V.; Gutierrez, L.; Morlière, P.; Mesnard, F.; et al. A multi-omics analysis of the regulatory changes induced by miR-223 in a monocyte/macrophage cell line. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2018**, *1864*, 2664–2678. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Li, S.Y.; Susztak, K. The long noncoding RNA Tug1 connects metabolic changes with kidney disease in podocytes. *J. Clin. Invest.* **2016**, *126*, 4072–4075. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Wang, W.; Zhang, S.; Yang, F.; Xie, J.; Chen, J.; Li, Z. Diosmetin alleviates acute kidney injury by promoting the TUG1/Nrf2/HO-1 pathway in sepsis rats. *Int. Immunopharmacol.* **2020**, *88*, 106965. [\[CrossRef\]](#)
27. Wu, H.; Wang, J.; Ma, Z. Long noncoding RNA HOXA-AS2 mediates microRNA-106b-5p to repress sepsis-engendered acute kidney injury. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2020**, *34*, e22453. [\[CrossRef\]](#)
28. Wang, M.; Wei, J.; Shang, F.; Zang, K.; Ji, T. Long non-coding RNA CASC2 ameliorates sepsis-induced acute kidney injury by regulating the miR-155 and NF- κ B pathway. *Int. J. Mol. Med.* **2020**, *45*, 1554–1562. [\[CrossRef\]](#)
29. Shen, J.; Liu, L.; Zhang, F.; Gu, J.; Pan, G. LncRNA TapSAKI promotes inflammation injury in HK-2 cells and urine derived sepsis-induced kidney injury. *J. Pharm. Pharmacol.* **2019**, *71*, 839–848. [\[CrossRef\]](#)
30. Huang, W.; Lan, X.; Li, X.; Wang, D.; Sun, Y.; Wang, Q.; Gao, H.; Yu, K. Long non-coding RNA PVT1 promote LPS-induced septic acute kidney injury by regulating TNF α and JNK/NF- κ B pathways in HK-2 cells. *Int. Immunopharmacol.* **2017**, *47*, 134–140. [\[CrossRef\]](#)
31. Shen, J.; Zhang, J.; Jiang, X.; Wang, H.; Pan, G. LncRNA HOX transcript antisense RNA accelerated kidney injury induced by urine-derived sepsis through the miR-22/high mobility group box 1 pathway. *Life Sci.* **2018**, *210*, 185–191. [\[CrossRef\]](#)
32. Jiang, Z.-J.; Zhang, M.-Y.; Fan, Z.-W.; Sun, W.-L.; Tang, Y. Influence of lncRNA HOTAIR on acute kidney injury in sepsis rats through regulating miR-34a/Bcl-2 pathway. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2019**, *23*, 3512–3519.
33. Yang, R.; Liu, S.; Wen, J.; Xue, L.; Zhang, Y.; Yan, D.; Wang, G.; Liu, Z. Inhibition of maternally expressed gene 3 attenuated lipopolysaccharide-induced apoptosis through sponging miR-21 in renal tubular epithelial cells. *J. Cell. Biochem.* **2018**, *119*, 7800–7806. [\[CrossRef\]](#)
34. Zhao, H.; Chen, B.; Li, Z.; Wang, B.; Li, L. Long noncoding RNA DANCR suppressed Lipopolysaccharide-induced septic acute kidney injury by regulating miR-214 in HK-2 cells. *Med. Sci. Monit.* **2020**, *26*, e921822. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Wang, J.; Song, J.; Li, Y.; Shao, J.; Xie, Z.; Sun, K. Down-regulation of lncRNA CRNDE aggravates kidney injury via increasing MiR-181a-5p in sepsis. *Int. Immunopharmacol.* **2020**, *79*, 105933. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Sun, B.-Q.; Sui, Y.-D.; Huang, H.; Zou, X.-B.; Chen, S.-C.; Yu, Z.-K. Effect of lncRNA CRNDE on sepsis-related kidney injury through the TLR3/NF- κ B pathway. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2019**, *23*, 10489–10497. [\[PubMed\]](#)
37. Wu, S.; Qiu, H.; Wang, Q.; Cao, Z.; Wang, J. Effects and mechanism of lncRNA CRNDE on sepsis-induced acute kidney injury. *Anal. Cell Pathol.* **2020**, *2020*, 8576234. [\[CrossRef\]](#)
38. Lu, S.; Wu, H.; Xu, J.; He, Z.; Li, H.; Ning, C. SIK1AT1/miR-96/FOXO1 axis regulates sepsis-induced kidney injury through induction of apoptosis. *Inflamm. Res.* **2020**, *69*, 645–656. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Zhang, Y.; Zhang, Y.-Y.; Xia, F.; Yang, A.-X.; Qian, J.-X.; Zhao, H.; Tao, W.-Y. Effect of lncRNA-MIAT on kidney injury in sepsis rats via regulating miR-29a expression. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2019**, *23*, 10942–10949. [\[PubMed\]](#)
40. Xie, Z.; Guo, Z.; Liu, J. Whey acidic protein/four-disulfide core domain 21 regulate sepsis pathogenesis in a mouse model and a macrophage cell line via the Stat3/Toll-like receptor 4 (TLR4) signaling pathway. *Med. Sci. Monit.* **2018**, *24*, 4054–4063. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
41. Li, X.; Li, J.; Lu, P.; Li, M. LINC00261 relieves the progression of sepsis-induced acute kidney injury by inhibiting NF- κ B activation through targeting the miR-654-5p/SOCS3 axis. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2021**, *53*, 129–137. [\[CrossRef\]](#)
42. Tan, J.; Fan, J.; He, J.; Zhao, L.; Tang, H. Knockdown of lncRNA DLX6-AS1 inhibits HK-2 cell pyroptosis via regulating miR-223-3p/NLRP3 pathway in lipopolysaccharide-induced acute kidney injury. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2020**, *52*, 367–376. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Wang, M.; Wei, J.; Shang, F.; Zang, K.; Zhang, P. Down-regulation of lncRNA SNHG5 relieves sepsis-induced acute kidney injury by regulating the miR-374a-3p/TLR4/NF- κ B pathway. *J. Biochem.* **2021**. [\[CrossRef\]](#)
44. Shi, C.; Zhao, Y.; Li, Q.; Li, J. lncRNA SNHG14 Plays a Role in Sepsis-Induced Acute Kidney Injury by Regulating miR-93. *Mediat. Inflamm.* **2021**, *2021*, 5318369. [\[CrossRef\]](#)

45. Fang, Y.; Hu, J.-F.; Wang, Z.-H.; Zhang, S.-G.; Zhang, R.-F.; Sun, L.-M.; Cui, H.-W.; Yang, F. GAS5 promotes podocyte injury in sepsis by inhibiting PTEN expression. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2018**, *22*, 8423–8430.
46. Arslan, F.; Keogh, B.; McGuirk, P.; Parker, A.E. TLR2 and TLR4 in ischemia reperfusion injury. *Mediat. Inflamm.* **2010**, *2010*, 704202. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Yang, Y.; Lv, X.; Fan, Q.; Wang, X.; Xu, L.; Lu, X.; Chen, T. Analysis of circulating lncRNA expression profiles in patients with diabetes mellitus and diabetic nephropathy: Differential expression profile of circulating lncRNA. *Clin. Nephrol.* **2019**, *92*, 25–35. [\[CrossRef\]](#)
48. Tao, Q.; Tianyu, W.; Jiangqiao, Z.; Zhongbao, C.; Xiaoxiong, M.; Long, Z.; Jilin, Z. Expression analysis of long non-coding RNAs in a renal ischemia-reperfusion injury model. *Acta Cir. Bras.* **2019**, *34*, e201900403. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
49. Chen, F.; Hu, Y.; Xie, Y.; Zhao, Z.; Ma, L.; Li, Z.; Tan, W. Total glucosides of paeony alleviate cell apoptosis and inflammation by targeting the long noncoding RNA XIST/MicroRNA-124-3p/ITGB1 axis in renal ischemia/reperfusion injury. *Mediat. Inflamm.* **2020**, *2020*, 8869511. [\[CrossRef\]](#)
50. Tang, B.; Li, W.; Ji, T.; Li, X.; Qu, X.; Feng, L.; Zhu, Y.; Qi, Y.; Zhu, C.; Bai, S. Downregulation of XIST ameliorates acute kidney injury by sponging miR-142-5p and targeting PDCD4. *J. Cell Physiol.* **2020**, *235*, 8852–8863. [\[CrossRef\]](#)
51. Haddad, G.; Kölling, M.; Wegmann, U.A.; Dettling, A.; Seeger, H.; Schmitt, R.; Soerensen-Zender, I.; Haller, H.; Kistler, A.D.; Dueck, A.; et al. Renal AAV2-mediated overexpression of long non-coding RNA H19 attenuates ischemic acute kidney injury through sponging of microRNA-30a-5p. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2021**, *32*, 323–341. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Kölling, M.; Genschel, C.; Kaucsar, T.; Hübner, A.; Rong, S.; Schmitt, R.; Soerensen-Zender, I.; Haddad, G.; Kistler, A.D.; Seeger, H.; et al. Hypoxia-induced long non-coding RNA Malat1 is dispensable for renal ischemia/reperfusion-injury. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 3438. [\[CrossRef\]](#)
53. Tian, H.; Wu, M.; Zhou, P.; Huang, C.; Ye, C.; Wang, L. The long non-coding RNA MALAT1 is increased in renal ischemia-reperfusion injury and inhibits hypoxia-induced inflammation. *Ren. Fail.* **2018**, *40*, 527–533. [\[CrossRef\]](#)
54. Jiang, X.; Li, D.; Shen, W.; Shen, X.; Liu, Y. LncRNA NEAT1 promotes hypoxia-induced renal tubular epithelial apoptosis through downregulating miR-27a-3p. *J. Cell Biochem.* **2019**, *120*, 16273–16282. [\[CrossRef\]](#)
55. Wang, I.-K.; Palanisamy, K.; Sun, K.-T.; Yu, S.-H.; Yu, T.-M.; Li, C.-H.; Li, F.-Y.; Chou, A.-K.; Wang, G.-J.; Chen, K.-B.; et al. The functional interplay of lncRNA EGOT and HuR regulates hypoxia-induced autophagy in renal tubular cells. *J. Cell Biochem.* **2020**, *121*, 4522–4534. [\[CrossRef\]](#)
56. Tian, X.; Ji, Y.; Liang, Y.; Zhang, J.; Guan, L.; Wang, C. LINC00520 targeting miR-27b-3p regulates OSMR expression level to promote acute kidney injury development through the PI3K/AKT signaling pathway. *J. Cell Physiol.* **2019**, *234*, 14221–14233. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Xue, Q.; Yang, L.; Wang, H.; Han, S. Silence of long noncoding RNA SNHG14 alleviates ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury by regulating miR-124-3p/MMP2 axis. *Biomed Res. Int.* **2021**, *2021*, 8884438. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
58. Yu, T.-M.; Palanisamy, K.; Sun, K.-T.; Day, Y.-J.; Shu, K.-H.; Wang, I.-K.; Shyu, W.-C.; Chen, P.; Chen, Y.-L.; Li, C.-Y. RANTES mediates kidney ischemia reperfusion injury through a possible role of HIF-1 α and lncRNA PRINS. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 18424. [\[CrossRef\]](#)
59. Mao, H.; Huang, Q.; Liu, Y. MEG3 aggravates hypoxia/reoxygenation induced apoptosis of renal tubular epithelial cells via the miR-129-5p/HMGB1 axis. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2020**, *35*, e22649. [\[CrossRef\]](#)
60. Geng, X.; Song, N.; Zhao, S.; Xu, J.; Liu, Y.; Fang, Y.; Liang, M.; Xu, X.; Ding, X. LncRNA GAS5 promotes apoptosis as a competing endogenous RNA for miR-21 via thrombospondin 1 in ischemic AKI. *Cell Death Discov.* **2020**, *6*, 19. [\[CrossRef\]](#)
61. Zhou, X.; Jiang, K.; Luo, H.; Wu, C.; Yu, W.; Cheng, F. Novel lncRNA XLOC_032768 alleviates cisplatin-induced apoptosis and inflammatory response of renal tubular epithelial cells through TNF- α . *Int. Immunopharmacol.* **2020**, *83*, 106472. [\[CrossRef\]](#)
62. Zhang, Y.; Tang, P.M.-K.; Niu, Y.; García Córdoba, C.A.; Huang, X.-R.; Yu, C.; Lan, H.-Y. Long non-coding RNA LRNA9884 promotes acute kidney injury via regulating NF- κ B-mediated transcriptional activation of MIF. *Front. Physiol.* **2020**, *11*, 590027. [\[CrossRef\]](#)
63. Sun, J.; Zhang, S.; Shi, B.; Zheng, D.; Shi, J. Transcriptome identified lncRNAs associated with renal fibrosis in UUO rat model. *Front. Physiol.* **2017**, *8*, 658. [\[CrossRef\]](#)
64. Xiao, H.; Liao, Y.; Tang, C.; Xiao, Z.; Luo, H.; Li, J.; Liu, H.; Sun, L.; Zeng, D.; Li, Y. RNA-Seq analysis of potential lncRNAs and genes for the anti-renal fibrotic effect of norcantharidin. *J. Cell Biochem.* **2019**, *120*, 17354–17367. [\[CrossRef\]](#)
65. Lu, M.; Wang, P.; Qiao, Y.; Jiang, C.; Ge, Y.; Flickinger, B.; Malhotra, D.K.; Dworkin, L.D.; Liu, Z.; Gong, R. GSK3 β -mediated Keap1-independent regulation of Nrf2 antioxidant response: A molecular rheostat of acute kidney injury to chronic kidney disease transition. *Redox Biol.* **2019**, *26*, 101275. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
66. Xiao, X.; Yuan, Q.; Chen, Y.; Huang, Z.; Fang, X.; Zhang, H.; Peng, L.; Xiao, P. LncRNA ENST00000453774.1 contributes to oxidative stress defense dependent on autophagy mediation to reduce extracellular matrix and alleviate renal fibrosis. *J. Cell Physiol.* **2019**, *234*, 9130–9143. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
67. Wang, Z.; Zhang, B.; Chen, Z.; He, Y.; Ru, F.; Liu, P.; Chen, X. The long noncoding RNA myocardial infarction-associated transcript modulates the epithelial-mesenchymal transition in renal interstitial fibrosis. *Life Sci.* **2020**, *241*, 117187. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
68. Bijkerk, R.; Au, Y.W.; Stam, W.; Duijs, J.M.G.J.; Koudijs, A.; Lievers, E.; Rabelink, T.J.; van Zonneveld, A.J. Long non-coding RNAs rian and miat mediate myofibroblast formation in kidney fibrosis. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 215. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

69. Xie, H.; Xue, J.-D.; Chao, F.; Jin, Y.-F.; Fu, Q. Long non-coding RNA-H19 antagonism protects against renal fibrosis. *Oncotarget* **2016**, *7*, 51473–51481. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
70. Zhou, H.; Qiu, Z.-Z.; Yu, Z.-H.; Gao, L.; He, J.-M.; Zhang, Z.-W.; Zheng, J. Paeonol reverses promoting effect of the HOTAIR/miR-124/Notch1 axis on renal interstitial fibrosis in a rat model. *J. Cell Physiol.* **2019**, *234*, 14351–14363. [\[CrossRef\]](#)
71. Matwijiw, I.; Faiman, C. Control of gonadotropin secretion in the ovine fetus. II. A sex difference in pulsatile luteinizing hormone secretion after castration. *Endocrinology* **1989**, *124*, 1352–1358. [\[CrossRef\]](#)
72. Arany, I.; Safirstein, R.L. Cisplatin nephrotoxicity. *Semin. Nephrol.* **2003**, *23*, 460–464. [\[CrossRef\]](#)
73. Yousef, M.I.; Hussien, H.M. Cisplatin-induced renal toxicity via tumor necrosis factor- α , interleukin 6, tumor suppressor P53, DNA damage, xanthine oxidase, histological changes, oxidative stress and nitric oxide in rats: Protective effect of ginseng. *Food Chem. Toxicol.* **2015**, *78*, 17–25. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
74. Chávez-Iñiguez, J.S.; Navarro-Gallardo, G.J.; Medina-González, R.; Alcantar-Vallín, L.; García-García, G. Acute kidney injury caused by obstructive nephropathy. *Int. J. Nephrol.* **2020**, *2020*, 8846622. [\[CrossRef\]](#)
75. Utero, A.C.; Benito-Martin, A.; Izquierdo, M.C.; Sanchez-Niño, M.D.; Sanz, A.B.; Ramos, A.M.; Berzal, S.; Ruiz-Ortega, M.; Egido, J.; Ortiz, A. Unilateral ureteral obstruction: Beyond obstruction. *Int. Urol. Nephrol.* **2014**, *46*, 765–776. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
76. Docherty, N.G.; O'Sullivan, O.E.; Healy, D.A.; Fitzpatrick, J.M.; Watson, R.W.G. Evidence that inhibition of tubular cell apoptosis protects against renal damage and development of fibrosis following ureteric obstruction. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* **2006**, *290*, F4–F13. [\[CrossRef\]](#)
77. Chevalier, R.L.; Forbes, M.S.; Thornhill, B.A. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney Int.* **2009**, *75*, 1145–1152. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
78. Guo, Y.; Li, G.; Gao, L.; Cheng, X.; Wang, L.; Qin, Y.; Zhang, D. Exaggerated renal fibrosis in lncRNA Gas5-deficient mice after unilateral ureteric obstruction. *Life Sci.* **2021**, *264*, 118656. [\[CrossRef\]](#)
79. Parikh, N.I.; Hwang, S.-J.; Larson, M.G.; Meigs, J.B.; Levy, D.; Fox, C.S. Cardiovascular disease risk factors in chronic kidney disease: Overall burden and rates of treatment and control. *Arch. Intern. Med.* **2006**, *166*, 1884. [\[CrossRef\]](#)
80. Hamza, E.; Metzinger, L.; Meuth, V.M.-L. Uremic toxins affect erythropoiesis during the course of chronic kidney disease: A review. *Cells* **2020**, *9*, 2039. [\[CrossRef\]](#)
81. Fourdinier, O.; Schepers, E.; Meuth, V.M.-L.; Glorieux, G.; Liabeuf, S.; Verbeke, F.; Vanholder, R.; Brigant, B.; Pletinck, A.; Diouf, M.; et al. Serum levels of miR-126 and miR-223 and outcomes in chronic kidney disease patients. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 4477. [\[CrossRef\]](#)
82. Ishida, M.; Selaru, F.M. miRNA-based therapeutic strategies. *Curr. Pathobiol. Rep.* **2013**, *1*, 63–70. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
83. Khurana, R.; Ranches, G.; Schaffer, S.; Lukasser, M.; Rudnicki, M.; Mayer, G.; Hüttenhofer, A. Identification of urinary exosomal noncoding RNAs as novel biomarkers in chronic kidney disease. *RNA* **2017**, *23*, 142–152. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
84. Li, N.; Cui, Y.; Yin, M.; Liu, F. Screening potential prognostic biomarkers of long non-coding RNAs for predicting the risk of chronic kidney disease. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2019**, *52*, e8333. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
85. Lai, C.-F.; Chen, Y.-T.; Gu, J.; Nerbonne, J.M.; Lin, C.-H.; Yang, K.-C. Circulating long noncoding RNA DKFZP434I0714 predicts adverse cardiovascular outcomes in patients with end-stage renal disease. *Int. J. Cardiol.* **2019**, *277*, 212–219. [\[CrossRef\]](#)
86. Santer, L.; López, B.; Ravassa, S.; Baer, C.; Riedel, I.; Chatterjee, S.; Moreno, M.U.; González, A.; Querejeta, R.; Pinet, F.; et al. Circulating long noncoding RNA LIPCAR predicts heart failure outcomes in patients without chronic kidney disease. *Hypertension* **2019**, *73*, 820–828. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
87. Arbiol-Roca, A.; Padró-Miquel, A.; Hueso, M.; Navarro, E.; Alía-Ramos, P.; González-Álvarez, M.; Rama, I.; Torras, J.; Grinyó, J.; Cruzado, J.; et al. Association of ANRIL gene polymorphisms with major adverse cardiovascular events in hemodialysis patients. *Clin. Chim. Acta* **2017**, *466*, 61–67. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
88. Bao, S.; Guo, Y.; Diao, Z.; Guo, W.; Liu, W. Genome-wide identification of lncRNAs and mRNAs differentially expressed in human vascular smooth muscle cells stimulated by high phosphorus. *Ren. Fail.* **2020**, *42*, 437–446. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
89. Wu, H.; Lai, C.-F.; Chang-Panesso, M.; Humphreys, B.D. Proximal tubule translational profiling during kidney fibrosis reveals proinflammatory and long noncoding RNA expression patterns with sexual dimorphism. *JASN* **2020**, *31*, 23–38. [\[CrossRef\]](#)
90. Meng, X.; Nikolic-Paterson, D.J.; Lan, H.Y. TGF- β : The master regulator of fibrosis. *Nat. Rev. Nephrol.* **2016**, *12*, 325–338. [\[CrossRef\]](#)
91. Meng, X.M.; Huang, X.R.; Chung, A.C.K.; Qin, W.; Shao, X.; Igarashi, P.; Ju, W.; Bottinger, E.P.; Lan, H.Y. Smad2 protects against TGF- β /Smad3-mediated renal fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2010**, *21*, 1477–1487. [\[CrossRef\]](#)
92. Zhou, Q.; Chung, A.C.K.; Huang, X.R.; Dong, Y.; Yu, X.; Lan, H.Y. Identification of novel long noncoding RNAs associated with TGF- β /Smad3-mediated renal inflammation and fibrosis by RNA sequencing. *Am. J. Pathol.* **2014**, *184*, 409–417. [\[CrossRef\]](#)
93. Pu, Y.; Zhao, H.; Wu, X.; Mei, M.; Shen, B. The long noncoding RNA Ptpd-IR is a novel molecular target for TGF- β 1-mediated nephritis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2020**, *122*, 105742. [\[CrossRef\]](#)
94. Long, J.; Badal, S.S.; Ye, Z.; Wang, Y.; Ayanga, B.A.; Galvan, D.L.; Green, N.H.; Chang, B.H.; Overbeek, P.A.; Danesh, F.R. Long noncoding RNA *Tug1* regulates mitochondrial bioenergetics in diabetic nephropathy. *J. Clin. Investig.* **2016**, *126*, 4205–4218. [\[CrossRef\]](#)
95. Allison, S.J. A lncRNA and miRNA megacluster in diabetic nephropathy. *Nat. Rev. Nephrol.* **2016**, *12*, 713. [\[CrossRef\]](#)
96. Yang, J.; Shen, Y.; Yang, X.; Long, Y.; Chen, S.; Lin, X.; Dong, R.; Yuan, J. Silencing of long noncoding RNA XIST protects against renal interstitial fibrosis in diabetic nephropathy via microRNA-93-5p-mediated inhibition of CDKN1A. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* **2019**, *317*, F1350–F1358. [\[CrossRef\]](#)

97. Jie, R.; Zhu, P.; Zhong, J.; Zhang, Y.; Wu, H. LncRNA KCNQ1OT1 affects cell proliferation, apoptosis and fibrosis through regulating miR-18b-5p/SORBS2 axis and NF- κ B pathway in diabetic nephropathy. *Diabetol Metab. Syndr.* **2020**, *12*, 77. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
98. Guo, D.-F.; Chenier, I.; Lavoie, J.L.; Chan, J.S.; Hamet, P.; Tremblay, J.; Chen, X.M.; Wang, N.H.; Inagami, T. Development of hypertension and kidney hypertrophy in transgenic mice overexpressing ARAP1 gene in the kidney. *Hypertension* **2006**, *48*, 453–459. [\[CrossRef\]](#)
99. Ma, T.-K.; Xu, L.; Lu, L.-X.; Cao, X.; Li, X.; Li, L.-L.; Wang, X.; Fan, Q.-L. Ursolic acid treatment alleviates diabetic kidney injury by regulating the ARAP1/AT1R signaling pathway. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* **2019**, *12*, 2597–2608. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
100. Li, L.; Xu, L.; Wen, S.; Yang, Y.; Li, X.; Fan, Q. The effect of lncRNA-ARAP1-AS2/ARAP1 on high glucose-induced cytoskeleton rearrangement and epithelial-mesenchymal transition in human renal tubular epithelial cells. *J. Cell Physiol.* **2020**, *235*, 5787–5795. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
101. Liao, Z.; Ye, Z.; Xue, Z.; Wu, L.; Ouyang, Y.; Yao, C.; Cui, C.; Xu, N.; Ma, J.; Hou, G.; et al. Identification of renal long non-coding RNA RP11-2B6.2 as a positive regulator of type I interferon signaling pathway in lupus nephritis. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 975. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
102. Luan, J.; Jiao, C.; Kong, W.; Fu, J.; Qu, W.; Chen, Y.; Zu, X.; Zeng, Y.; Guo, G.; Qi, H.; et al. circHLA-C Plays an important role in lupus nephritis by sponging miR-150. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2018**, *10*, 245–253. [\[CrossRef\]](#)
103. Wu, G.-C.; Li, J.; Leng, R.-X.; Li, X.-P.; Li, X.-M.; Wang, D.-G.; Pan, H.-F.; Ye, D.-Q. Identification of long non-coding RNAs GAS5, linc0597 and lnc-DC in plasma as novel biomarkers for systemic lupus erythematosus. *Oncotarget* **2017**, *8*, 23650–23663. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
104. Ouyang, Q.; Huang, Q.; Jiang, Z.; Zhao, J.; Shi, G.-P.; Yang, M. Using plasma circRNA_002453 as a novel biomarker in the diagnosis of lupus nephritis. *Mol. Immunol.* **2018**, *101*, 531–538. [\[CrossRef\]](#)
105. Han, R.; Hu, S.; Qin, W.; Shi, J.; Zeng, C.; Bao, H.; Liu, Z. Upregulated long noncoding RNA LOC105375913 induces tubulointerstitial fibrosis in focal segmental glomerulosclerosis. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 716. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
106. Hu, S.; Han, R.; Shi, J.; Zhu, X.; Qin, W.; Zeng, C.; Bao, H.; Liu, Z. The long noncoding RNA LOC105374325 causes podocyte injury in individuals with focal segmental glomerulosclerosis. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 20227–20239. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
107. Sui, W.; Li, H.; Ou, M.; Tang, D.; Dai, Y. Altered long non-coding RNA expression profile in patients with IgA-negative mesangial proliferative glomerulonephritis. *Int. J. Mol. Med.* **2012**, *30*, 173–178.
108. Zuo, N.; Li, Y.; Liu, N.; Wang, L. Differentially expressed long non-coding RNAs and mRNAs in patients with IgA nephropathy. *Mol. Med. Rep.* **2017**, *16*, 7724–7730. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
109. Gholaminejad, A.; Gheisari, Y.; Jalali, S.; Roozintan, A. Comprehensive analysis of IgA nephropathy expression profiles: Identification of potential biomarkers and therapeutic agents. *BMC Nephrol.* **2021**, *22*, 137. [\[CrossRef\]](#)
110. Guo, N.; Zhou, Q.; Huang, X.; Yu, J.; Han, Q.; Nong, B.; Xiong, Y.; Liang, P.; Li, J.; Feng, M.; et al. Identification of differentially expressed circulating exosomal lncRNAs in IgA nephropathy patients. *BMC Immunol.* **2020**, *21*, 16. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
111. Huang, Y.-S.; Hsieh, H.-Y.; Shih, H.-M.; Sytwu, H.-K.; Wu, C.-C. Urinary Xist is a potential biomarker for membranous nephropathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *452*, 415–421. [\[CrossRef\]](#)
112. Jin, L.-W.; Pan, M.; Ye, H.-Y.; Zheng, Y.; Chen, Y.; Huang, W.-W.; Xu, X.-Y.; Zheng, S.-B. Down-regulation of the long non-coding RNA XIST ameliorates podocyte apoptosis in membranous nephropathy via the miR-217-TLR4 pathway. *Exp. Physiol.* **2019**, *104*, 220–230. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
113. Sun, K.; Jia, Z.; Duan, R.; Yan, Z.; Jin, Z.; Yan, L.; Li, Q.; Yang, J. Long non-coding RNA XIST regulates miR-106b-5p/P21 axis to suppress tumor progression in renal cell carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, *510*, 416–420. [\[CrossRef\]](#)
114. Kong, Y.; Hsieh, C.-H.; Alonso, L.C. ANRIL: A lncRNA at the CDKN2A/B locus with roles in cancer and metabolic disease. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **2018**, *9*, 405. [\[CrossRef\]](#)
115. Li, Q.; Tian, Y.; Hu, G.; Liang, Y.; Bai, W.; Li, H. Highly expressed antisense noncoding RNA in the INK4 locus promotes growth and invasion of renal clear carcinoma cells via the β -Catenin pathway. *Oncol. Res.* **2017**, *25*, 1373–1382. [\[CrossRef\]](#)
116. Sun, Y.; Ma, L. New insights into long non-coding RNA MALAT1 in cancer and metastasis. *Cancers* **2019**, *11*, 216. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
117. Zhang, H.; Li, W.; Gu, W.; Yan, Y.; Yao, X.; Zheng, J. MALAT1 accelerates the development and progression of renal cell carcinoma by decreasing the expression of miR-203 and promoting the expression of BIRC5. *Cell Prolif.* **2019**, *52*, e12640. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
118. Chen, J.; Chen, Y.; Gu, L.; Li, X.; Gao, Y.; Lyu, X.; Chen, L.; Luo, G.; Wang, L.; Xie, Y.; et al. LncRNAs act as prognostic and diagnostic biomarkers in renal cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* **2016**, *7*, 74325–74336. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
119. Du, L.; Duan, W.; Jiang, X.; Zhao, L.; Li, J.; Wang, R.; Yan, S.; Xie, Y.; Yan, K.; Wang, Q.; et al. Cell-free lncRNA expression signatures in urine serve as novel non-invasive biomarkers for diagnosis and recurrence prediction of bladder cancer. *J. Cell Mol. Med.* **2018**, *22*, 2838–2845. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
120. von Siebenthal, M.; Besic, M.; Gheinani, A.H.; Akshay, A.; Lizun-Platoni, S.; Kunz, N.; Bukhard, F.C.; Monastyrskaya, K. Urinary miRNA profiles discriminate between obstruction-induced bladder dysfunction and healthy controls. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 10204. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

-
121. Metzinger-Le Meuth, V.; Burtey, S.; Maitrias, P.; Massy, Z.A.; Metzinger, L. microRNAs in the pathophysiology of CKD-MBD: Biomarkers and innovative drugs. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2017**, *1863*, 337–345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 122. Tabet, F.; Vickers, K.C.; Cuesta Torres, L.F.; Wiese, C.B.; Shoucri, B.M.; Lambert, G.; Catherinet, C.; Prado-Lourenco, L.; Levin, M.G.; Thacker, S.; et al. HDL-transferred microRNA-223 regulates ICAM-1 expression in endothelial cells. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3292. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

5. Objectifs de thèse

Ce sujet de thèse a débuté pendant le stage de Master 2 que j'ai effectué au sein du laboratoire HEMATIM au sein de l'équipe du Pr. Laurent Metzinger et de la Dr. Valérie Metzinger Le-Meuth. Notre but était d'éclaircir les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de l'effet des toxines urémiques sur l'érythropoïèse. La 1^{ère} partie du travail a été de regrouper tout ce qui est connu autour de ce sujet afin d'établir des hypothèses pour mieux comprendre le mécanisme moléculaire de l'anémie liée à une IRC.

L'objectif principal de la thèse est d'étudier l'impact d'une toxine urémique, l'IS sur l'érythropoïèse. Ainsi, nous avons subdivisé l'objectif principal en plusieurs axes pour répondre à notre problématique :

- Axe 1 : Étudier l'impact de l'IS, du PCS et du sérum urémique sur l'érythropoïèse
- Axe 2 : Identification de nouveaux miARNs impliqués dans l'érythropoïèse par étude transcriptomique
- Axe 3 : Etude de l'effet des toxines urémiques sur les progéniteurs érythroïdes dans deux modèles de souris

II. Matériels et méthodes

1. Produits chimiques et réactifs

L'IS (Sigma-Aldrich) et le PCS (Alsa Chim) ont été dissous dans du phosphate-buffered saline (PBS). Les cellules ont été traitées avec différentes toxines urémiques à des concentrations de toxines urémiques retrouvées chez les patients atteints d'IRC (IS : 125-250 μ M et PCS : 50-200 μ M) pendant 24h et 48h [11]. Les cellules ont été prétraitées avec l'inhibiteur anti-apoptotique pan-caspase q-VD-Oph hydrate (10 μ M, Sigma) au propriété anti-apoptotique pendant 1h avant l'incubation avec l'IS.

Les sérums urémiques de patients ont été obtenus auprès du Centre de Recherche Clinique, CHU Amiens Picardie (**Tableau 5**). Le protocole a été approuvé par le comité de recherche (CPP Nord-Ouest II, Amiens, France ; référence : **2008-004673-17**) et mis en œuvre conformément aux principes éthiques de la Déclaration d'Helsinki (numéro d'enregistrement ClinicalTrials.gov : **NCT01011699**) [213].

L'impact des pools de sérums obtenus à partir de patients urémiques (patient 5004, patient 19006 et patient 50003) a été comparé à celui du sérum de contrôle (patient 2003, patient 19004 et patient 1017) et au sérum de veau fœtal (SVF) dans les cellules (1:10) [214], [215]. La concentration en IS dans le pool de sérum contrôle est de 32 μ M et celle du sérum de patients urémiques est de 405 μ M.

Patients	IS (ng/mL)
2003	4 575
19004	11 501
1017	8 002
5004	114 986
19006	74 952
50003	117 154

Tableau 5. Concentration sérique en IS (ng/mL) des différents patients urémiques

2. Culture cellulaire

2.1. Lignées cellulaires

La lignée cellulaire leucémique humaine UT7 a été établie au Japon à partir de la MO d'un patient atteint de leucémie mégacaryoblastique aiguë [216]. Cette lignée est capable de proliférer en présence de l'IL-3, ou en présence du granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) ou en présence de l'EPO [217]. La lignée UT7/EPO est un sous-clone de la lignée UT7. Cette lignée a été utilisée comme un modèle de prolifération induite par l'EPO. Les cellules ont été cultivées dans un milieu α -Milieu Essentiel Minimum (α -MEM, Dominique Dutscher) contenant 1% de pénicilline-streptomycine (Biowest), 2 UI/mL de rhEPO (époétine bêta) et 10% de SVF (Eurobio) préalablement décomplémenté à 54°C pendant 5 min [218]. Ce modèle exprime fortement le marqueur de différenciation érythroïde CD235a (GPA) (**Figure 11**).

Les lignées cellulaires érythroleucémiques humaines K562 et HEL ont été utilisées comme modèles de différenciation hématopoïétique [219]–[221]. Elles ont été cultivées dans un milieu Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) contenant 10% de SVF et 1% de pénicilline-streptomycine. La lignée cellulaire HEL exprime fortement le marqueur CD235a, CD71 et CD41a (**Figure 11**). La lignée cellulaire K562 exprime fortement les marqueurs CD235a et CD71 (**Figure 11**).

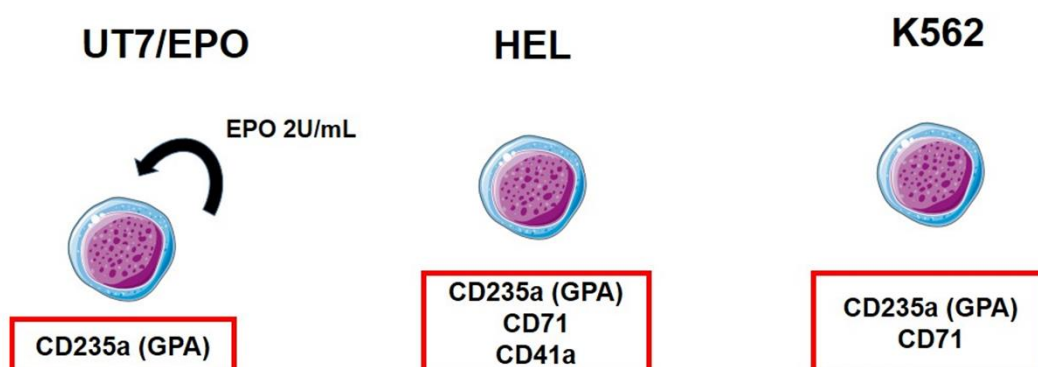


Figure 11. Les différents modèles de lignées cellulaires utilisés UT7/EPO, HEL et K562 et leurs marqueurs membranaires respectifs

Le passage des cellules est effectué 2 fois par semaine et elles sont alors ensemencées dans une nouvelle flasque (25 ou 75 cm²) à raison de 10⁵ cellules/mL. Les cellules sont conservées à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO₂. Le comptage des cellules est effectué sur la cellule de Malassez à la suite d'une coloration des cellules mortes au bleu Trypan.

La congélation des cellules est réalisée en isolant 2.10⁶ cellules dans une solution de SVF 90% et DiMéthylSulfOxyde 10% (DMSO, Pan Biotech) (v/v) et sont conservées à -150°C.

2.2. Culture primaire

Les CSH ont été obtenues à partir de sang périphérique mobilisé après avoir reçu le consentement éclairé des patients, conformément au protocole d'Helsinki [218]. Cette étude est considérée comme de la recherche non interventionnelle. Les cellules humaines CD34⁺ primaires ont été isolées par des microbilles magnétiques (pureté > 94 ± 3%) sur des colonnes MACS (AutoMACS Separator) [218]. Pour induire la différenciation érythroïde, les cellules CD34⁺ ont été cultivées dans un milieu Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (Biochrom, Merck-Millipore) contenant 2 UI/mL d'héparine non fractionnée, 5% de plasma humain (don de l'Etablissement Français du Sang, EFS), 10 µg/mL d'insuline recombinante humaine (Sigma-Aldrich), 1% de pénicilline-streptomycine (PANTM-Biotech) et 330 µg/mL d'holo-transferrine humaine (Sigma-Aldrich). La procédure d'expansion, décrite par Giarratana *et al.* [222], a été réalisée après une stimulation séquentielle par des cytokines ajoutées au milieu (**Figure 12**): rhEPO (3 UI/mL), human SCF (hSCF 100 ng/mL, Miltenyi), IL-3 humaine recombinante (rhIL-3, Miltenyi) et dexaméthasone (DXM 10⁻⁶M, Sigma-Aldrich) de J0 à J7. La DXM et la rhIL-3 ont été enlevées à J7, le hSCF a été enlevé à J10, et l'EPO a été maintenu jusqu'à la fin de la culture. Les cellules CD34⁺ ont été traitées avec de l'IS 250 µM à J4, J7, J10 et J14, correspondant aux jours de changement de milieu de culture.

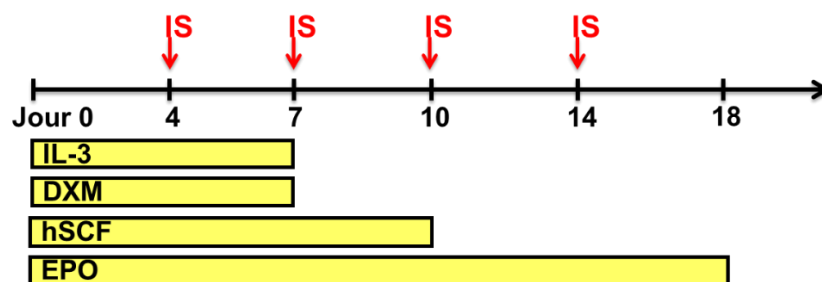


Figure 12. Protocole de différenciation érythroïde

La différenciation érythroïde a été analysée par CMF et la coloration May-Grünwald-Giemsa (MGG) selon une procédure standard.

Les CPH ont été comptées en utilisant un milieu complet à base de méthylcellulose MethoCult™ H4435 enrichi (MethoCult™ GF+ H4435) selon le protocole du fabricant.

2.3. Modèles animaux

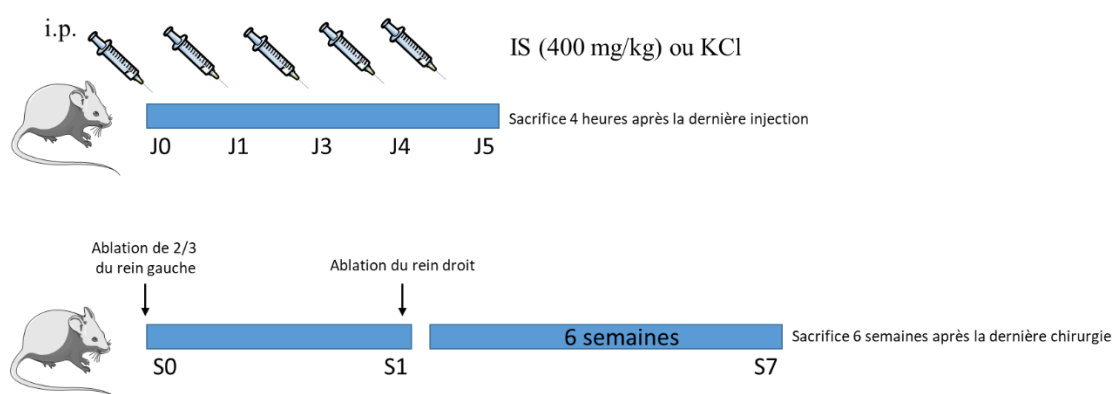


Figure 13. Modèles de souris utilisés

Pour étudier l'exposition à court terme à l'IS, des souris C57BL/6 mâles (âgées de dix semaines) ont reçu en i.p. de l'IS (400 mg/kg/jour pendant 5 jours, n=5) ou une solution de chlorure de potassium (KCl) pour les contrôles (n=3) [223] (**Figure 13**). Les souris ont été sacrifiées 4h après la dernière injection d'IS ou de KCl.

Dans un second modèle, des souris C57BL/6 mâles (âgées de dix semaines) ont subi une Néphrectomie subtotalaire par une chirurgie en deux étapes avec des modifications mineures [64] (n=8) (**Figure 13**). Dans la première étape de la chirurgie, les 2/3 du rein gauche (les pôles supérieur et inférieur) ont été ligaturés. Dans la deuxième étape de la chirurgie, qui a été réalisée une semaine plus tard, le rein droit a été enlevé. Six semaines après l'induction de l'IRC, toutes les souris ont été sacrifiées. Les souris témoins (n=7) n'ont pas subi de chirurgie.

Toutes les expériences ont été réalisées conformément à la directive 2010/63/UE du Parlement européen et ont été approuvées par le comité institutionnel local de protection et d'utilisation des animaux de l'université de Cordoba (17/03/2022/041). Des échantillons de sang ont été

prélevés par ponction cardiaque après le sacrifice. La créatinine sérique, les taux d'urée et d'autres paramètres sanguins ont été mesurés au laboratoire de biochimie des installations de recherche sur les animaux de l'université de Cordoba en Espagne. Les taux sériques d'EPO ont été détectés par le kit d'immunodosage de l'EPO de souris Quantikine® ELISA (R&D Systems). La quantification sérique de l'IS a été réalisée en collaboration avec le Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie de l'Hôpital Raymond-Poincaré, France.

Les cellules souches de souris ont été isolées à partir de la MO (fémur et tibia) [224]. Le kit d'isolation de cellules souches et progénitrices hématopoïétiques de souris BD Stemflow™ a été utilisé pour identifier les progéniteurs hématopoïétiques dans la MO de la souris par cytométrie de flux (FACS) en utilisant un marqueur de lineage négatif (Lin⁻). Le cocktail d'anticorps de Lin⁻ comprend le CD3, CD45R, Ly6C, Ly6G, CD11B et TER-119. A partir des cellules Lin⁻, nous avons examiné une petite sous-population de cellules Lin⁻ de la MO : les cellules c-Kit⁺, Sca-1⁺, Lin⁻ (KSL⁻). Les marqueurs classiques de surface cellulaire KSL⁻ dans la MO représentent les CPH et les CSH de la MO. Les progéniteurs érythroïdes murins de la MO ont été cultivés en utilisant un milieu de prolifération érythroïde sans sérum modifié (SFEM, Stem Cell Technologies) avec 100 ng/mL de recombinant murine SCF (rmSCF) et 2 UI/mL de rhEPO, comme décrit par Dolzning *et al.* [101].

3. Cytométrie en flux

La cytométrie en flux a été réalisée pour analyser le phénotype cellulaire, la mort cellulaire et la distribution du cycle cellulaire. Pour l'analyse du phénotype de la lignée cellulaire UT7/EPO, nous avons utilisé le CD235a comme marqueur de surface des cellules érythroïdes. Pour le phénotypage des lignées cellulaires HEL et K562, nous avons utilisé le CD235a, le CD71 exprimé dans les cellules érythroïdes, et le CD41a (marqueur de mégacaryocyte).

Des cellules CD34⁺ primaires humaines ont été isolées et analysées à différents stades de développement afin d'étudier l'effet de l'IS sur le processus d'érythropoïèse. 1×10^5 cellules ont été marquées avec des anticorps comprenant des anti-CD235a, CD71, CD34, CD36, CD123 (IL3) (Miltenyi) et 7AAD (BD Pharmingen™) pour l'analyse du phénotype des cultures de cellules primaires humaines. Les stades humains BFU-E et CFU-E ont été caractérisés par

CD123⁻/GPA⁻/CD34⁺/CD36⁻/CD71^{low} et CD123⁻/GPA⁻/CD34⁻/CD36⁺/CD71^{high} (Miltenyi), respectivement.

Le phénotypage cellulaire des CSH murines a été réalisé par utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre c-kit, CD45, TER-119, CD71 et 7AAD anti-mouse. Les stades BFU-E et CFU-E murins ont été caractérisés comme c-kit⁺/CD45⁺/TER-119⁻/CD71^{low} et c-kit⁺/CD45⁻/TER-119⁻/CD71^{high} (Miltenyi), respectivement. Le stade de Pro-E murins et les cellules érythroïdes terminales différenciées ont été caractérisés par c-kit⁻/CD45⁻/TER-119^{med}/CD71^{high} et c-kit⁻/CD45⁻/TER-119^{high}/CD71⁻, respectivement.

La mort cellulaire apoptotique a été caractérisée par le co-marquage DAPI et annexine V (APC). 1×10^5 cellules ont été lavées deux fois avec du PBS froid, puis remises en suspension dans 100 μ L de Binding buffer 1X. L'Annexine V et le DAPI ont été déposés à 1×10^5 cellules, et incubés pendant 15 min à température ambiante dans l'obscurité. Après 15 min d'incubation, 400 μ L de Binding buffer 1X ont été additionnés à chaque tube.

Le sevrage en sérum a permis d'induire la synchronisation du cycle cellulaire par un arrêt au stade G0/G1. Les cellules UT7/EPO ont été traitées avec l'IS (250 μ M) pendant 48h pour la distribution du cycle cellulaire. 1×10^6 cellules ont été centrifugées à 300 g pendant 5 min et fixées goutte à goutte dans de l'éthanol glacé à 70% à 4°C toute la nuit. Les cellules ont été lavées dans du PBS et mises en suspension dans 200 μ L de PBS contenant du DAPI et 50 μ g/mL de RNase A. Les cellules ont été incubées dans l'obscurité pendant 30 min à température ambiante puis analysées par CMF.

Pour évaluer la prolifération cellulaire, les cellules UT7/EPO, exposées à l'IS pendant 48h, ont été marquées à l'anticorps Ki-67 qui est un marqueur de prolifération cellulaire. Le kit spécial BD Cytotfix/Cytoperm™ Plus Fixation/Permeabilization with BD GolgiPlug™ Kit (BD Biosciences) a été utilisé. Tout d'abord, les cellules UT7/EPO sont centrifugées pendant 5 min à 300 g, puis, sont remises en suspension dans 100 μ L de solution BD Cytotfix/Cytoperm (1X) et laissées incuber pendant 20 min à 4°C. Par la suite les cellules ont été lavées deux fois dans le tampon BD Perm/Wash™ (10X) et ont été resuspendues dans une solution contenant 10 μ L de tampon BD Perm/Wash™ et 190 μ L de PBS. 5 μ L d'anticorps Ki-67 (FITC Mouse Anti-Human de BD Pharmingen™) et 10 μ L de DAPI (Thermofisher D13-06) ont été ajoutés à la solution et laissés incuber à 4°C pendant 30 min dans l'obscurité. Ensuite, les cellules ont été centrifugées et lavées deux fois au PBS, puis remise en suspension dans 200 μ L de PBS pour l'analyse au CMF.

L'acquisition des cellules a été effectuée avec un cytomètre en flux MacsQuant 8 couleurs (Miltenyi) et l'analyse des données a été effectuée avec le logiciel FlowJo (Treestar). Les caractéristiques et les références des anticorps utilisés pour la CMF sont décrites dans le **tableau 6**.

Anticorps	Espèce	Clone	Dilution	Conjugué	Source
CD235a (GPA)	Anti-Human	REA175	1:200	APC	Miltenyi Biotec
CD71	Anti-Human	REA902	1:200	FITC	Miltenyi Biotec
CD41a	Anti-Human	AC136	1:100	APC	Miltenyi Biotec
CD36	Anti-Human	REA760	1:200	VioBlue	Miltenyi Biotec
CD123	Anti-Human	REA918	1:200	PerCP-Vio700	Miltenyi Biotec
CD34	Anti-Human	REA1164	1:200	PE	Miltenyi Biotec
DAPI			2:100	VioBlue	PanReac AppliChem
Annexin V			2:100	APC	BD Biosciences
7AAD			2:100	PerCP	BD Biosciences
CD71	Anti-Mouse	REA627	1:200	APC	Miltenyi Biotec
TER-119	Anti-Mouse	REA847	1:200	FITC	Miltenyi Biotec
CD45	Anti-Mouse	30F11	1:200	PerCP	Miltenyi Biotec
CD117	Anti-Mouse	REA791	1:200	PE	Miltenyi Biotec
Mouse HSC Isolation Kit	Anti-Mouse				BD Biosciences
Ki-67	Anti-Human	B56 (ASR)	20:100	FITC	BD Biosciences

Tableau 6. Caractéristiques et références des anticorps utilisés pour la CMF.

4. Biologie moléculaire

4.1. Extraction des ARNs (ARNm et miARNs)

Les extractions d'ARN totaux sont réalisées grâce au miRNeasy Mini Kit (Qiagen Germany) optimisé pour extraire les ARNs et les miARNs à partir de cellules. 700 µL de QIAzol Lysis Reagent ont été ajoutés aux culots secs des cellules et laissés 5 min à température ambiante. Un volume de 140 µL de chloroforme est ajouté au mélange suivi d'une agitation de 15 sec. Après une incubation de 3 min à température ambiante, les échantillons sont centrifugés 15 min à 12000 g à 4°C. La phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube RNase free. 525 µL d'éthanol 100% (1,5 fois le volume de surnageant) est mélangé à la phase aqueuse, puis, 700 µL du tube sont prélevés et transférés sur les colonnes spécifiques. Les colonnes sont centrifugées (15 sec à 8000 g) pour que le liquide traverse la membrane afin qu'elle retienne les ARNs. La membrane est rincée deux fois à l'aide de 500 µL de Buffer RPE (tampon de lavage) puis séchée par centrifugation de la colonne à vide (5 min à 8000 g). Finalement, 30 µL d'eau sans RNase est ajoutée sur la membrane pour éluer les ARNs qui sont alors décrochés en centrifugeant la colonne pendant 1 min à 8000 g. Au final 30 µL d'ARN sont élués.

4.2. Dosage des ARNs

Les ARNs extraits sont dosés par le spectrophotomètre NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) avec un volume de 1 µL d'ARN. Les échantillons d'ARNs obtenus sont ensuite conservés à -20°C jusqu'à réalisation de la Polymerase Chain Reaction (PCR).

4.3. Transcription inverse

La réaction de transcription inverse permet d'obtenir des ADN complémentaires (ADNc) à partir d'ARN dans le but de réaliser une PCR.

La transcription inverse a été réalisée grâce au TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription (RT) Kit (Applied biosystems™) sur glace pour l'étude de l'expression des miARNs. Chaque

puits contenait le mélange suivant : 2.8 µL d'eau ARN free, 1.5 µL de Tampon RT 10X, 1.5 µL de dNTPs (10 mM), 0.2 µL de RNase inhibitor (20 UI/µL), 1 µL d'enzyme RT (50 UI/µL), 3 µL de primers 5X (hsa miR-223 RT002295, U6 snRNA RT001973) et 5 µL d'ARN à 10ng/µL. Les échantillons sont placés dans un thermocycleur Eppendorf Mastercycler® programmé pour le cycle suivant : 30 min à 16°C, 30 min à 42°C suivi de 5 min à 85°C pour inactiver l'enzyme.

L'expression des gènes de l'érythropoïèse a été réalisée avec le kit High Capacity Reverse Transcription Kit (Applied Biotechnologies). Chaque puits contenait le mélange suivant : 2.8 µL d'eau ARN free, 1.5 µL de Tampon RT 10X, 1.5 µL de dNTPs 25X, 0.2 µL de RNase inhibitor (20 UI/µL), 1 µL d'enzyme RT (50 UI/µL), 3 µL de Random Primers 5X et 5 µL d'ARN à 10 ng/µL. Les échantillons sont placés dans un thermocycleur Eppendorf Mastercycler® programmé pour le cycle : 10 min à 25°C, 120 min à 37°C suivi de 5 min à 85°C.

4.4. PCR quantitative (q-PCR)

4.4.1. MicroARN

La réaction de PCR quantitative en sonde Taqman a été réalisée à partir d'amorces spécifiques de : hsa miR-223 TM000526 et U6 snRNA TM 001973 sur plaque 96 puits (12 µL/puits) contenant : 0.6 µL d'amorce miR-223 (ou U6) à 20X, 6 µL de TaqMan Universal Master Mix, 0.8 µL de produit de réaction de RT (ADNc) et 4.6 µL d'eau RNase-DNase free.

4.4.2. ARNm

La réaction de PCR quantitative en sonde SYBER Green a été réalisée à partir d'amorces spécifiques des gènes de l'érythropoïèse contenant : 0,5 µL d'amorce 20X (forward/reverse) des gènes érythroïdes cités dans le **tableau 7** ci-dessous, 5 µL de Master Mix SYBER Green, 0.8 µL d'ADNc et 3.7 µL d'eau RNase-DNase free.

Les réactions sont effectuées en plaque de 96 puits (10 µL/puits). Chaque échantillon est analysé en triplicat technique pour limiter les variations des Ct. Les échantillons sont ensuite disposés dans l'automate QuantStudio 7 Flex (Applied Biotechnology) selon le protocole

Taqman ou le protocole SYBER Green. Les résultats sont exprimés sous la forme $2^{-\Delta\Delta C_t}$. La différence entre le C_t de l'échantillon étudié et le C_t du contrôle exogène étant le ΔC_t .

ACTB	Forward	5'- GACCTGACCGACTACCTCATG-3'
	Reverse	5'- TCTCCTTGATGTCCCGCAC-3'
EPO-R	Forward	5'-ATCCTGACGCTCTCCCTCAT-3'
	Reverse	5'-AGAGCGAGTTTGAAGGCCTC -3'
GAPDH	Forward	5'-TCGGAGTCAACGGATTTGGTCG -3'
	Reverse	5'-AGGGCATCCTGGGCTACACTGA -3'
GPA	Forward	5'-GGGGTGATGGCTGTTAT -3'
	Reverse	5'-CCTCACCTGACACAGACGTG -3'
GATA-1	Forward	5'-AGCAGCTTCCTCCACTGCTG-3'
	Reverse	5'-CCTCACCTGACACAGACGTG -3'
GATA-2	Forward	5'-TACAGCAGCGGACTCTTCC-3'
	Reverse	5'-CTCGTTCCTGTTTCTCAGAAGGC-3'
β-Globin	Forward	5'-CAACGTGCTGGTCTGTGTG -3'
	Reverse	5'-CACTAAGCTCGCTTTCTTGCTG -3'
STAT5A	Forward	5'-CTGGACTTTTCTGAAGGGGCT -3'
	Reverse	5'-AGAATAGCCGGGGGAATGTG -3'
Bcl-xL	Forward	5'-TCGGATCGCAGCTTGGATGG-3'
	Reverse	5'-GAAGCGTTCCTGGCCCTTTC-3'
HPRT	Forward	5'- TGTAATCCAGCAGGTCAGCA -3'
	Reverse	5'- ACCCTTTCCAAATCCTCAGC -3'
JAK2	Forward	5'-AGAGTCTTTCTTTGAAGCAGC -3'
	Reverse	5'- CCAGAATATTCTCGTCTCCAC-3'
FOG 1	Forward	5'-CCAGGCGGAAACAGAGCAAC -3'
	Reverse	5'- GAGTTAACATCTGCGCTGGGA-3'
PU.1	Forward	5'-CCCCTCCATCAGAAGACCTG -3'
	Reverse	5'-GAAGTTGTTCTCGGCGAAGC -3'
ERFE	Forward	5'-TGCTCATCTGCATCCAGTCC -3'
	Reverse	5'- TTGTCCAAGAACACGGAGGTC -3'
CD71	Forward	5'-TCTGGAATCCCAGCAGTTTCTT -3'

	Reverse	5'-ATCACGAACTGACCAGCGAC -3'
EKLF	Forward	5'-TGACTTCCTCAAGTGGTGGC -3'
	Reverse	5'-GGTGAGGAGGAGATCCAGGT -3'

Tableau 7. Liste des amorces utilisées pour la RT-qPCR.

4.5. Etude transcriptomique

La technologie nCounter de NanoString est une variante de la puce à ADN. Elle utilise des "codes à barres" moléculaires et une imagerie microscopique pour détecter et compter jusqu'à plusieurs centaines de transcrits uniques lors d'une réaction d'hybridation. Le système d'analyse nCounter de NanoString fournit les profils d'expression de miARNs en relevant l'abondance relative des transcrits en suivant ces différentes étapes : 1) hybridation de l'ARN par des sondes de capture et des sondes rapporteuses fluorescentes, 2) puis, purification des complexes cible/sonde, et 3) analyse de la puce nCounter sur l'analyseur numérique nCounter et lecture des résultats. On dépose 12 échantillons des ARNs totaux extraits des cellules UT7/EPO après 48h d'incubation (condition contrôle et IS à 250 μ M- 1 mM) sur la puce à miARN à une concentration de 50 ng/ μ L d'ARN.

5. Western Blot

Environ 1×10^6 cellules stimulées (avec/sans EPO, avec/sans IS 250 μ M) ont été récoltées et lysées avec le tampon de lyse RIPA en présence d'inhibiteurs de protéase et de phosphatase (Sigma). Après une incubation sur glace pendant 30 min, les lysats ont été soniqués pendant 10 sec sur glace puis ont été centrifugés à 300 g à 4°C pendant 30 min. Après centrifugation, les lysats cellulaires ont été recueillis et les concentrations de protéines ont été mesurées par le test de Bradford (Bio-rad, Hercules, CA, USA). Les extraits protéiques ont été congelés jusqu'à leur utilisation.

Des quantités égales de protéines (30 μ g) ont été diluées avec du tampon d'échantillon Laemmli et chauffées à 95°C, pendant 5 min, puis refroidies à température ambiante avant d'être déposés sur un gel SDS-PAGE de 10 à 15% dans du tampon Tris-Glycine (Thermo Fisher scientific).

Les échantillons ont ensuite été transférés sur une membrane en nitrocellulose (Sigma-Aldrich) dans du tampon de transfert. Après blocage pendant 1h avec dans du lait à 5% dans du tampon TBS-Tween 0,1%, les membranes ont été incubées à 4°C overnight avec des anticorps primaires dilués dans du lait 5% (w/v) TBS-Tween 0,1% pour les anticorps non-phosphorylés ou dans du BSA à 5% (w/v) TBS-Tween 0,1% pour les anticorps phosphorylés listés dans le **tableau 8**. Les anticorps secondaires ont tous été dilués à 1:3000 dans leur tampon de blocage respectif et incubés pendant 1h à température ambiante. Les membranes ont été lavées trois fois avec du TBS-Tween 0,1% pendant 10 min par lavage. Enfin, les blots ont été visualisés avec des réactifs chimioluminescents (SuperSignal Pico, ThermoFisher Scientific) en utilisant un dispositif ChemiDoc Universal HoodII (Bio-rad) et l'intensité des bandes a été analysée avec le logiciel ImageJ (NCBI).

Anticorps	Source	Dilution	Espèce/Clone
P-stat5 (Tyr694)	Cell Signaling	1 :1000	Rabbit/ Polyclonal
Stat5	BD Biosciences	1 :1000	Mouse/8 9/STAT5
Beta Actine	Abcam	1 :1000	Rabbit/polyclonal
Caspase 3 clivée	Cell Signaling	1 :1000	Rabbit/SA1E
Bcl-xL	Cell Signaling	1 :1000	Rabbit/27625
P-erk1/2 (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling	1 :1000	Rabbit/D13.14.4E
Erk1/2	Cell Signaling	1 :1000	Rabbit/137F5

Tableau 8. Caractéristiques et références des anticorps utilisés pour le Western Blot.

6. Analyses statistiques

Les expériences ont été répétées au moins trois fois et tous les résultats ont été exprimés en tant que moyenne $\pm$ erreur standard de la moyenne (SEM). Les comparaisons entre les groupes ont été réalisées à l'aide du test de Kruskal-Wallis et la comparaison de deux groupes a été effectuée par le test U de Mann-Whitney. L'analyse statistique et la représentation graphique ont été réalisées avec GraphPad Prism (version 6.01 ; GraphPad Software). Les différences biostatistiques ont été considérées comme significatives à partir de $p < 0,05$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

III. Résultats

1. Effet des toxines urémiques sur la viabilité cellulaire

Les cellules UT7/EPO ont été traitées avec différentes concentrations d'IS (125 et 250 μM) à 24h et 48h. La mort cellulaire médiée par l'apoptose a été évaluée par CMF. D'autres types de mort cellulaire (par exemple, la nécrose) n'ont pas été observées (**Figure 28 en annexe**). L'administration d'IS (250 μM) pendant 48h a induit l'apoptose dans les cellules UT7/EPO (8,49% vs 4,22%) par rapport à la condition contrôle mais pas à 24h (**Figure 14A**). Aucune différence significative sur l'apoptose n'a été observée après l'incubation avec le PCS (**Figure 14B**) ni avec le PCS et l'IS combinés ensemble (à 100 μM et à 250 μM , respectivement) (**Figure 14C**). L'incubation avec 10% de sérum urémique n'a pas montré de résultat significatif comparé à la condition SVF ou comparé à la condition 10% de sérum normal (**Figure 14D**).

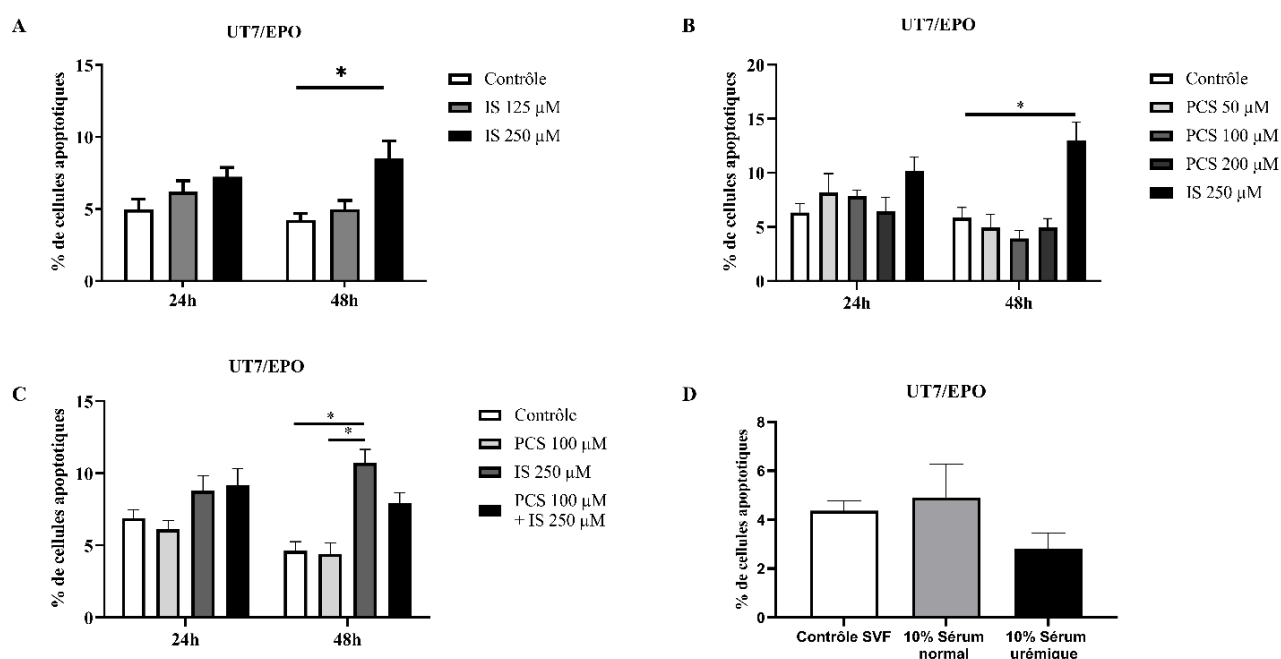


Figure 14. L'effet de l'IS, du PCS et du sérum urémique sur l'apoptose dans les cellules UT7/EPO

(A) Analyse par CMF des cellules apoptotiques dans les cellules UT7/EPO après incubation avec l'IS (0, 125, 250 μM) pendant 24h et 48h ($n=5$). (B) Effet du PCS (0, 50, 100, 200 μM) et de l'IS (250 μM) à 24h et 48h sur l'apoptose dans les UT7/EPO ($n=3$). (C) Effet du PCS (100 μM), IS (250 μM) et des deux toxines combinées à 24h et 48h sur l'apoptose dans les UT7/EPO ($n=3$). (D) Effet du sérum urémique 10% à 48h sur l'apoptose des cellules

UT7/EPO ($n=4$). Les valeurs sont indiquées en moyenne $\pm$ SEM. Le test U de Mann-Whitney a été utilisé pour l'analyse statistique. $*p < 0.05$.

Par conséquent, pour la suite des expériences, la concentration de 250 μ M d'IS a été choisie. Pour confirmer les précédents résultats, les cellules UT7/EPO ont été prétraitées avec le q-VD, un inhibiteur de la pan-caspase. Le q-VD a réduit l'apoptose médiée par l'IS (6,67% vs 10,32%) comparé à la condition contrôle (**Figure 15A**). L'analyse du cycle cellulaire a montré une proportion significativement plus élevée de la fraction Sub-G1 lorsque les cellules ont été traitées avec l'IS (250 μ M) par rapport au contrôle (11,21% vs 5,65%) (**Figure 15B**). L'expression relative des protéines impliquées dans l'apoptose a été déterminée par Western Blot. L'expression protéique de Bcl-xL (anti-apoptotique) était significativement diminuée (**Figure 15C**) et l'expression de la Caspase 3 clivée était significativement augmentée (**Figure 15D**) dans les cellules UT7/EPO stimulées par l'IS comparée au contrôle.

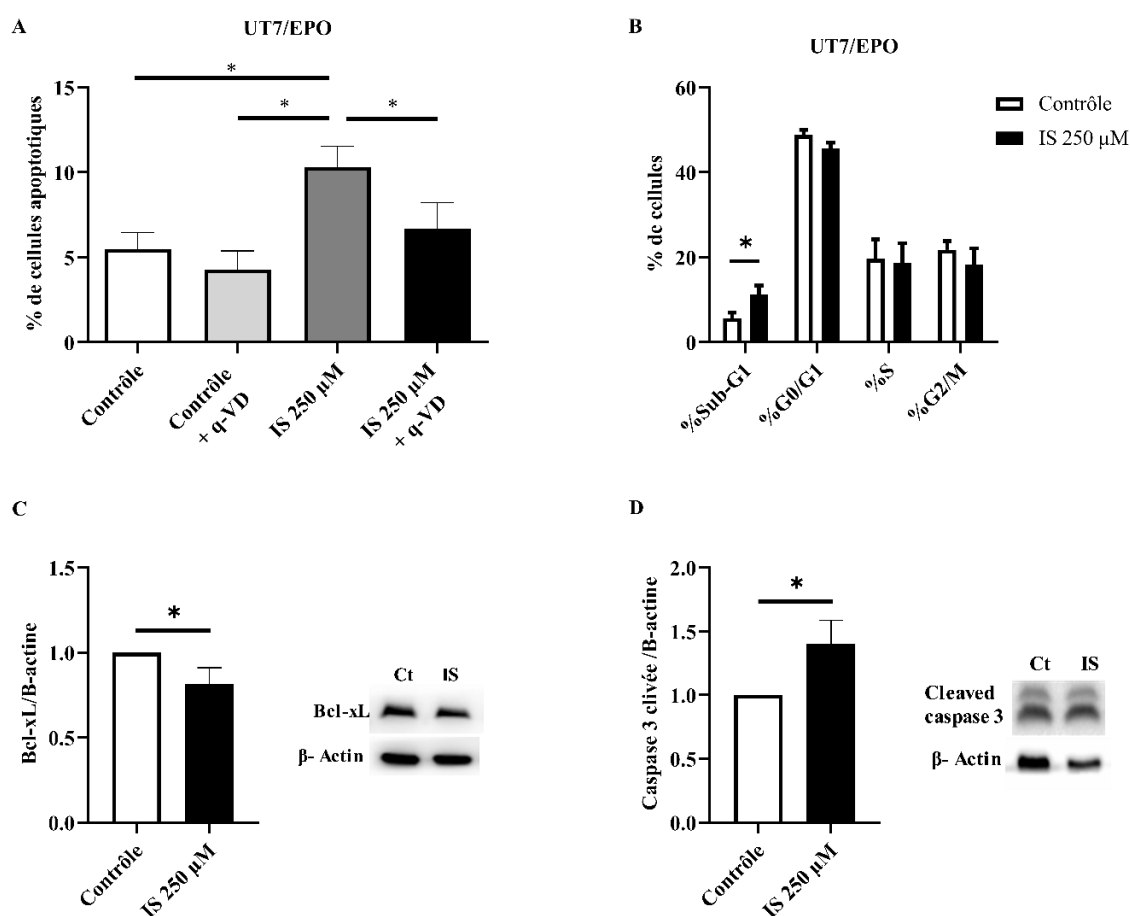


Figure 15. Confirmation de l'effet apoptotique de l'IS (250 μ M) à 48h dans les cellules UT7/EPO

(A) Effet de l'inhibiteur pan-caspase q-VD (10 μ M) sur les cellules UT7/EPO avec et sans IS (n=4). (B) L'effet de l'IS sur le cycle cellulaire (n=4). (C) Analyse par Western Blot de Bcl-xL (30 kDa) dans les cellules UT7/EPO (n=3). (D) Analyse par Western Blot de la caspase 3 clivée (17 kDa) dans les cellules UT7/EPO (n=3). Les valeurs sont indiquées en moyenne +/- SEM. Le test U de Mann-Whitney a été utilisé pour l'analyse statistique. *p < 0.05.

Afin de vérifier si l'IS affecte la prolifération, on a marqué les cellules UT7/EPO au Ki-67 pour mesurer l'intensité moyenne de fluorescence (MFI). Les résultats du CMF obtenus sont représentés sur la **figure 16** ci-dessus. La MFI ne varie pas avec l'IS (250 μ M) comparé à la condition contrôle.

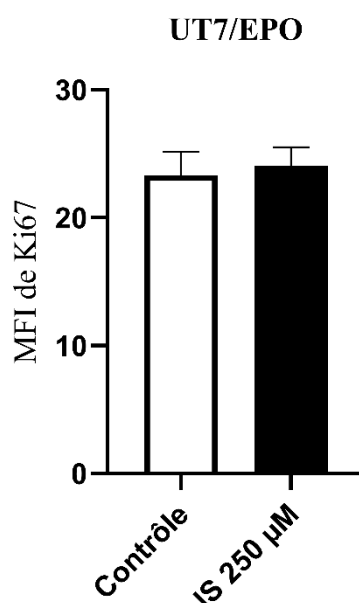


Figure 16. L'intensité moyenne de fluorescence (MFI) de Ki-67 dans les cellules UT7/EPO à 48h d'exposition à l'IS (250 μ M) (n=3).

Les valeurs sont indiquées en moyenne +/- SEM. Le test U de Mann-Whitney a été utilisé pour l'analyse statistique.

Nous avons ensuite décidé de confirmer ces résultats dans d'autres lignées cellulaires reflétant l'érythropoïèse : les cellules HEL et les cellules K562. L'IS (250 μ M) a augmenté significativement l'apoptose dans les cellules HEL (**Figure 17A**) à 24h (6,14% vs 3,67%) et 48h (5,59% vs 2,76%), mais n'a pas affecté les cellules K562 (**Figure 17B**).

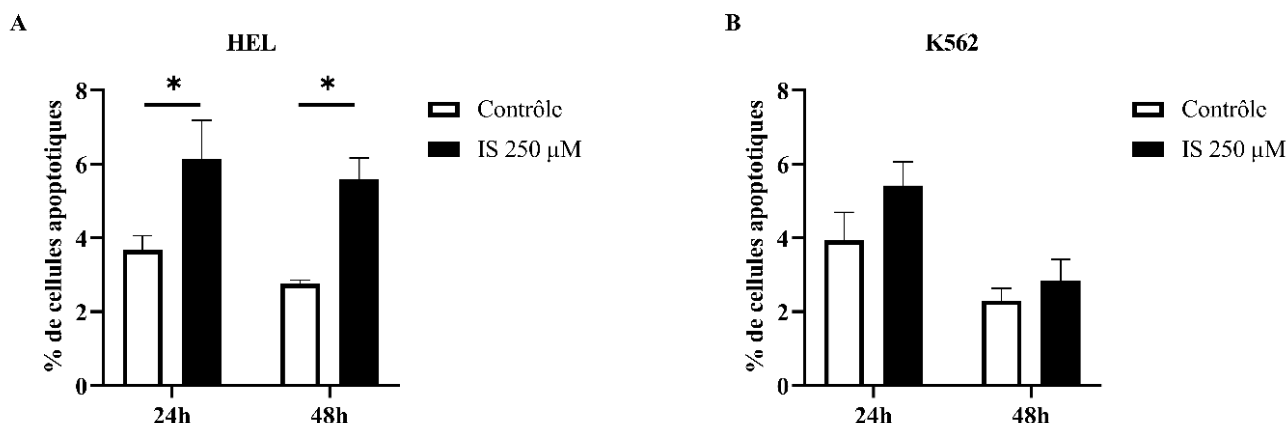


Figure 17. L'effet de l'IS (250 μM) sur l'apoptose dans les lignées cellulaires érythropoïétiques HEL et K562

(A) Effet de l'IS (250 μM) à 24h et 48h sur l'apoptose dans les cellules HEL (n=4). (B) Effet de l'IS (250 μM) sur l'apoptose dans les cellules K562 à 24h et 48h (n=4). Les valeurs sont indiquées en moyenne $\pm$ SEM. Le test U de Mann-Whitney a été utilisé pour l'analyse statistique. * $p < 0.05$.

Par la suite, nous nous sommes intéressés à l'effet de l'IS sur les différents marqueurs membranaires afin de regarder si le phénotype des cellules est modifié.

2. Effet de l'IS sur la différenciation cellulaire

Le marqueur membranaire CD235a (GPA) apparaît à partir du stade des précurseurs érythroïdes et, est fortement exprimé par les érythrocytes. Une analyse par CMF dans les cellules UT7/EPO traitées par l'IS a montré qu'il n'y a pas de modification sur le pourcentage de cellules exprimant le CD235a⁺ à 24h et à 48h (**Figure 18A**). Les cellules UT7/EPO traitées par le pool de sérum urémique de patients (10%) n'a pas montré de modification sur le pourcentage de cellules exprimant le CD235a⁺ à 48h comparé à la condition SVF et à la condition normale (**Figure 18B**).

Pour caractériser le phénotype des cellules HEL et K562, le marqueur membranaire CD41a (marqueur des mégacaryocytes) a été utilisé. La lignée cellulaire HEL exprime fortement le CD41a⁺, tandis qu'il est moins exprimé dans la lignée cellulaire K562. Dans les cellules HEL

ou K562, l'exposition à l'IS a augmenté le pourcentage de cellules exprimant le CD41a⁺ par rapport au contrôle, ce qui suggère un changement vers un phénotype mégacaryocytaire (Figure 18C-D).

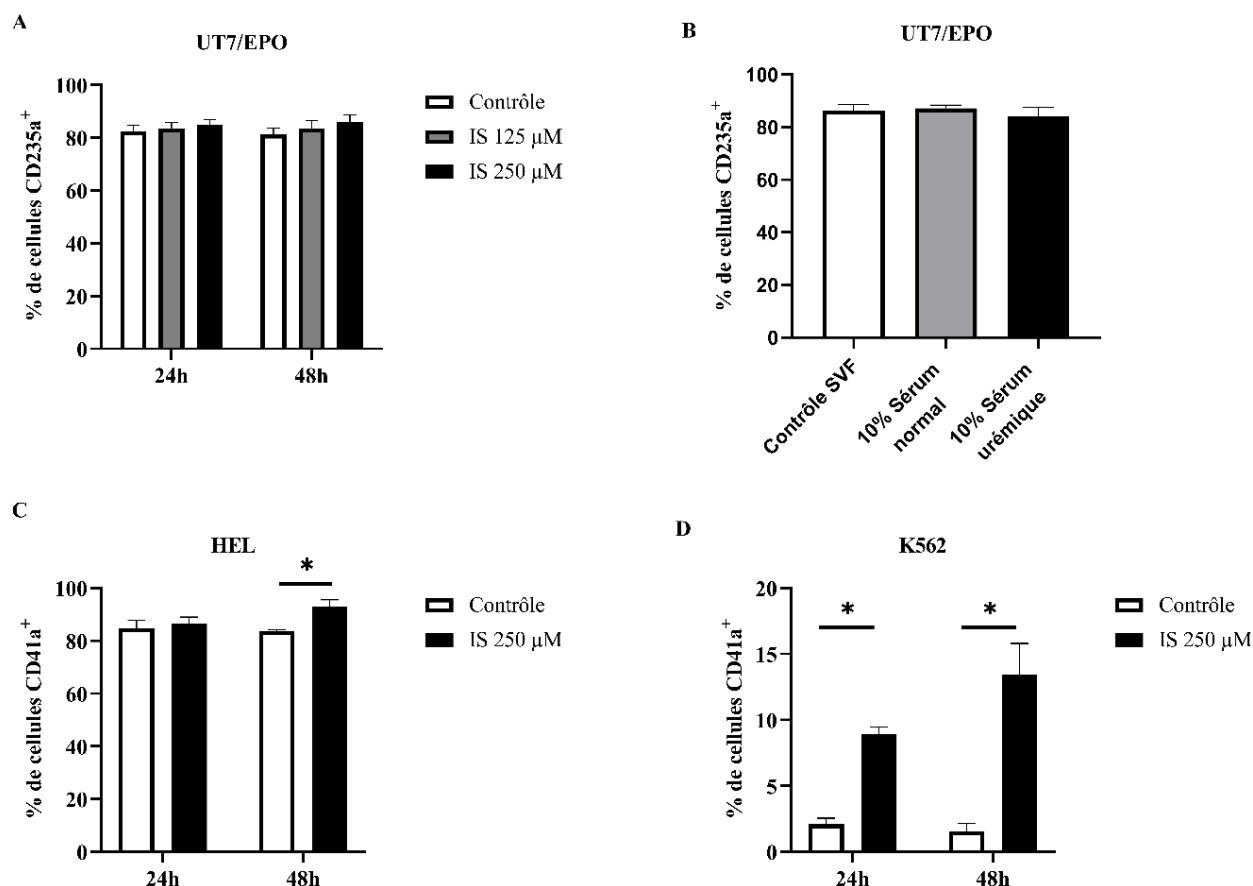


Figure 18. L'effet de l'IS sur le phénotype des lignées cellulaires érythropoïétiques

(A) Quantification des cellules exprimant le CD235a⁺ dans les cellules UT7/EPO après incubation avec l'IS (0-250 μ M) à 24h et 48h (n=5). (B) Quantification des cellules exprimant le CD235a⁺ dans les cellules UT7/EPO après incubation avec 10% de sérum urémique pendant 48h (n=4). (C) Quantification des cellules CD41a⁺ à 24h et 48h d'incubation avec l'IS (250 μ M) dans les cellules HEL (n=3). (D) Quantification des cellules CD41a⁺ à 24h et 48h d'incubation avec l'IS (250 μ M) dans les cellules K562 (n=3). Les valeurs sont indiquées en moyenne $\pm$ SEM. Le test U de Mann-Whitney a été utilisé pour l'analyse statistique. *p < 0.05.

3. Effet de l'IS sur la viabilité et la différenciation cellulaire au cours de l'érythropoïèse

Nous avons ensuite cherché à confirmer si l'effet apoptotique et l'effet phénotypique médié par l'IS dans les lignées cellulaires étaient également observé dans les cellules primaires humaines. Pour cela, nous avons recueilli des cellules primaires humaines CD34⁺ provenant de donneurs sains qui ont été induites vers une différenciation érythroïde comme décrit par Caulier *et al.* [218]. Les cellules CD34⁺ humaines ont été incubées avec l'IS de J4 à J14.

Nos résultats montrent que l'IS diminue le nombre total de cellules de J7 à J14 comparé à la condition contrôle ($1,15 \times 10^6$ vs $3,52 \times 10^6$ à J7, $2,11 \times 10^6$ vs $7,37 \times 10^6$ à J10, $1,16 \times 10^6$ vs $4,5 \times 10^6$ à J14, respectivement) (**Figure 19A**). Une augmentation significative du pourcentage de cellules apoptotiques à J18 de l'incubation avec l'IS (250 μ M) a été observée par rapport au contrôle (50,23% vs 19,50%) (**Figure 19B**). Nous avons quantifié les colonies BFU-E et CFU-E sans les différencier pour étudier l'effet de l'IS sur les progéniteurs érythroïdes après culture dans la méthylcellulose à J18. Le nombre de colonies hématopoïétiques BFU-E/CFU-E après une incubation avec l'IS a significativement diminué comparé à la condition contrôle (17 vs 66 colonies) (**Figure 19C**). Par la suite, nous avons quantifié les colonies BFU-E et CFU-E en utilisant la CMF. A partir de J7 jusqu'à J14, le pourcentage de cellules BFU-E était nettement augmenté après stimulation avec l'IS par rapport au contrôle (14,94% vs 5,17% à J7, 10,06% vs 2,43% à J10, 3,94% vs 2,04% à J14, respectivement) suggérant un blocage au stade BFU-E (**Figure 19D**). En conséquence, le pourcentage de cellules CFU-E était significativement diminué après stimulation avec l'IS (250 μ M) par rapport au contrôle (11,67% vs 21,75% à J7, 21,24% vs 42,46% à J10, 10,97% vs 23,37% à J14, respectivement), confirmant le blocage des cellules au stade BFU-E des cultures primaires humaines CD34⁺ (**Figure 19E**).

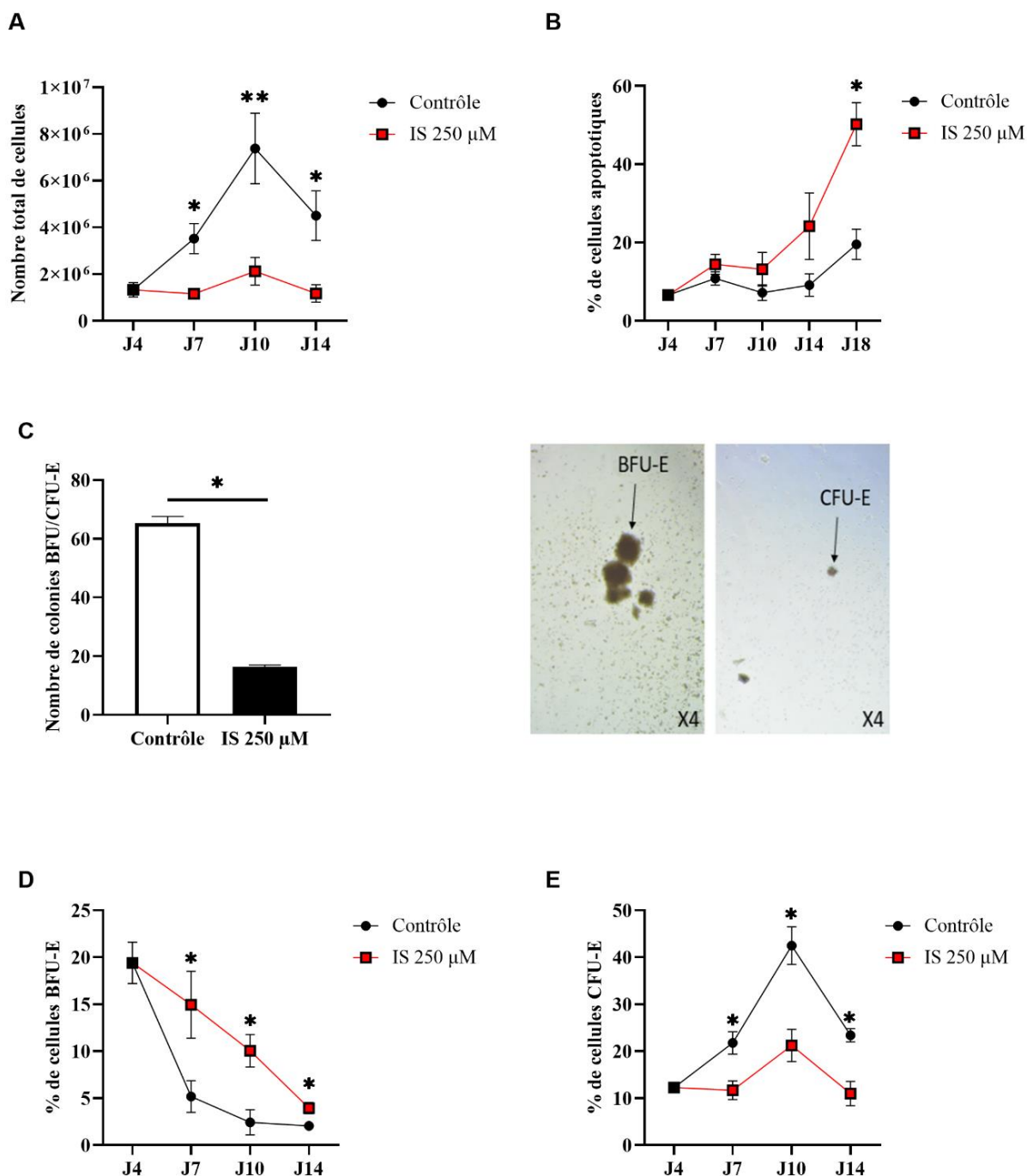


Figure 19. L'effet de l'IS sur les cellules CD34⁺ humaines durant l'érythropoïèse *in vitro*.

(A) Comptage des cellules CD34⁺ au bleu trypan sur une cellule de Malassez à J4, J7, J10 et J14 en présence ou en l'absence d'IS à 250 μM (n=5). (B) Pourcentage des cellules apoptotiques CD34⁺ incubées avec l'IS (250 μM) à J4, J7, J10, J14 et J18 (n=4). (C) Comptage du nombre de colonies hématopoïétiques BFU-E/CFU-E après incubation avec l'IS et après culture dans la méthylcellulose à J18. A droite, est représentée la morphologie

*des colonies hématopoïétiques BFU-E et CFU-E à J18. (D) Quantification des colonies BFU-E dans les cellules humaines CD34⁺ traitées par l'IS (250 μ M) à J4, J7, J10 et J14 (n=4). (E) Quantification des colonies CFU-E dans les cellules humaines CD34⁺ traitées par l'IS (250 μ M) à J4, J7, J10 et J14 (n=4). Les valeurs sont indiquées en tant que moyenne $\pm$ SEM. Le test U de Mann-Whitney a été utilisé pour l'analyse statistique. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.*

Afin de mieux caractériser l'effet de l'IS sur le phénotype des cellules CD34⁺, nous avons déterminé l'expression de l'IL3 (CD123) exprimée dans les CSH. L'IS a augmenté le pourcentage de cellules CD34⁺/CD123⁺ à J7 et à J14 (72,4% vs 25,3% à J7, 48,9% vs 27,48% à J14, respectivement) (**Figure 20A**) tandis qu'il a diminué le pourcentage de cellules CD235a⁺ par rapport à la condition contrôle (14,05% vs 27,07% à J10, 37,42% vs 55,15% à J14, respectivement) (**Figure 20B**). Ces résultats suggèrent que l'IS bloque les cellules à un stade précoce, ce qui a pour conséquence un retard dans la différenciation érythroïde.

Dans le but de confirmer que l'IS peut être associée à l'érythropoïèse précoce, nous avons quantifié l'expression de deux facteurs de transcription : GATA-1 et GATA-2 à J7. L'expression de GATA-2 est associée au stade de prolifération précoce tandis que GATA-1 est un marqueur clé de la phase de différenciation tardive de l'érythropoïèse. En présence de l'IS, le ratio GATA-2/GATA-1 était augmenté de 25% par rapport à la condition contrôle (**Figure 20C**). Une cytologie par coloration MGG a été réalisée pour évaluer le pourcentage de cellules immatures. Le pourcentage de cellules érythroïdes immatures à J10 a augmenté après incubation avec l'IS (72,5 % vs 57,75%) confirmant ainsi le blocage aux stades précoces de l'érythropoïèse (**Figure 20D**).

L'ensemble de ses résultats suggère que l'IS affecte la viabilité cellulaire, retarde la transition de BFU-E à CFU-E et modifie le phénotype durant l'érythropoïèse dans les cellules primaires humaines CD34⁺.

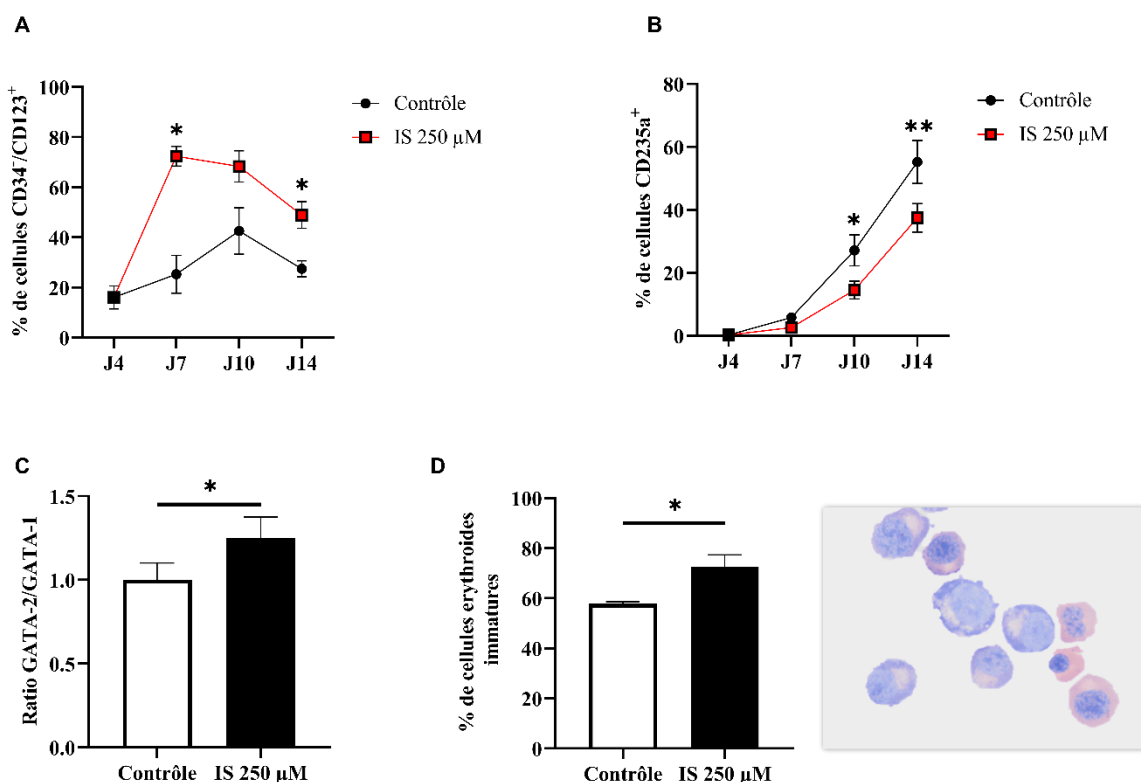


Figure 20. L'effet de l'IS induit un retard dans la différenciation érythroïde dans les cellules humaines CD34⁺.

(A) Le pourcentage de cellules CD34⁺/CD123⁺ dans les cellules CD34⁺ humaines traitées par l'IS (250 μ M) à J4, J7, J10 et J14 (n=4). (B) Le pourcentage de cellules CD235⁺ dans les cellules CD34⁺ humaines traitées par l'IS (250 μ M) à J4, J7, J10 et J14 (n=4). (C) Ratio des ARNs GATA-2/GATA-1 dans les cellules CD34⁺ humaines à J7 en présence ou en absence d'IS à 250 μ M (n=4). (D) Comptage cytologique du pourcentage de cellules érythroïdes immatures en présence ou en absence d'IS à 250 μ M dans les cellules CD34⁺ humaines à J10, évalué par coloration MGG à droite, grossissement X64 (n=3). Les valeurs sont indiquées en tant que moyenne $\pm$ SEM. Le test U de Mann-Whitney a été utilisé pour l'analyse statistique.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4. Effet de l'IS sur les gènes liés à l'érythropoïèse et sur la voie de signalisation EPO-EPO-R.

Ensuite l'analyse de l'expression des gènes liés à l'érythropoïèse sous l'effet de l'IS a été réalisée. Dans les cellules UT7/EPO traitées par l'IS, l'analyse par RT-PCR en temps réel a montré une baisse significative en ARNm de GATA-1, GPA, CD71, Bcl-xL, EPO-R et EKLF (**Figure 21A**).

Par la suite, nous avons essayé de confirmer l'effet de l'IS sur certains de ces gènes dans des stades précoces de l'érythropoïèse dans les cellules primaires humaines CD34⁺ à J7. Nous avons observé une diminution significative de l'expression en ARNm de la GPA, CD71, EPO-R, β -globine, STAT5a, EKLF, FOG 1, et JAK2 ainsi qu'une augmentation de l'expression en ARNm de PU.1, qui est impliqué dans la différenciation myéloïde (**Figure 21B**).

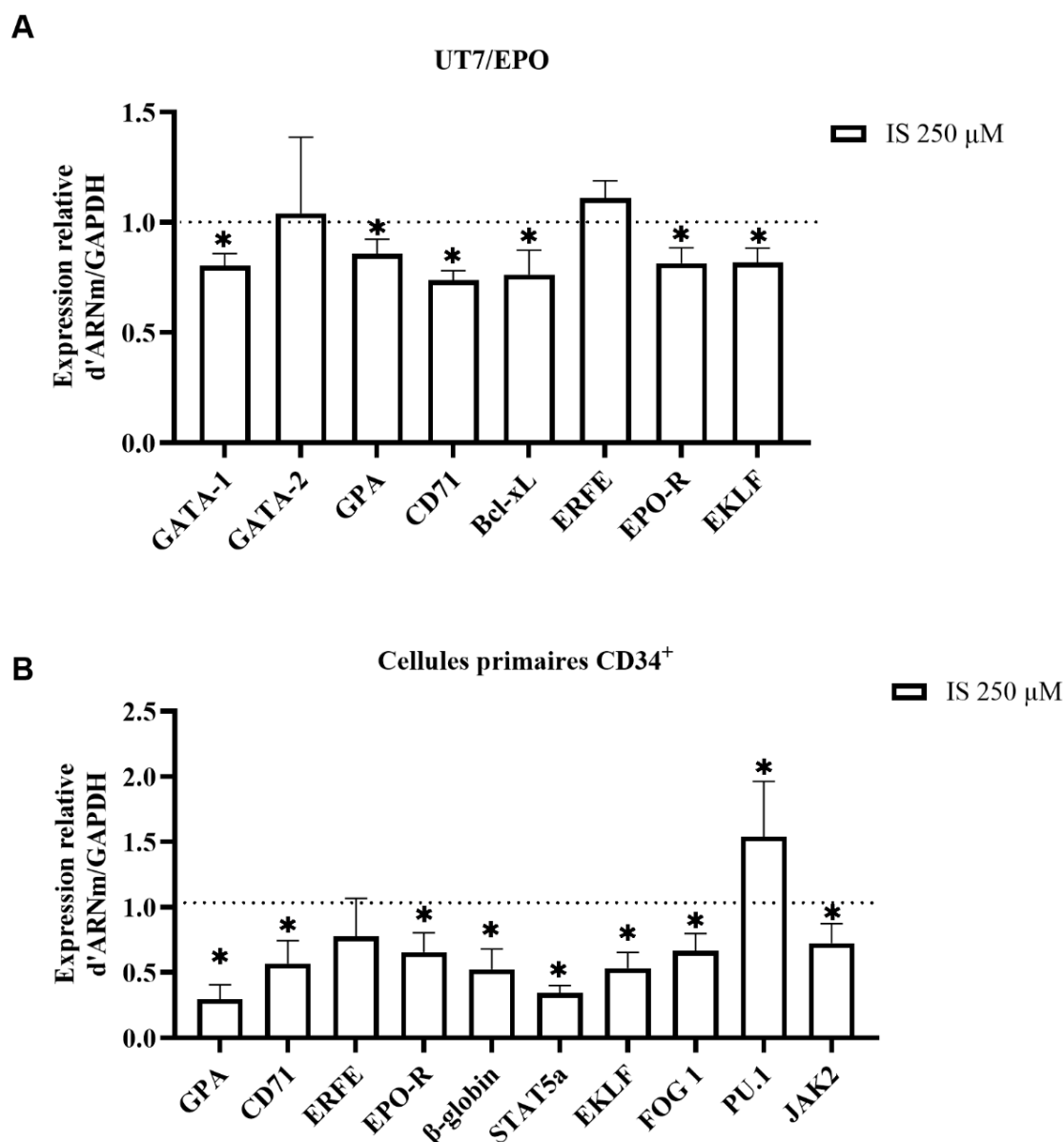


Figure 21. L'IS dérégule des gènes liés à l'érythropoïèse.

(A) L'expression relative des gènes liés à l'érythropoïèse dans les cellules UT7/EPO à 24h en présence ou en absence d'IS à 250 μ M (n=3). (B) L'expression relative des gènes liés à l'érythropoïèse dans les cellules CD34⁺ humaines à J7 en présence ou en l'absence d'IS à 250 μ M (n=4). Les valeurs sont indiquées en tant que moyenne $\pm$ SEM. Le test U de Mann-Whitney a été utilisé pour l'analyse statistique. *p < 0,05. Abréviations : GPA, glycophorine A ; ERFE, érythroferrone ; EKLF, facteur de transcription spécifique des érythroïdes ; FOG-1, Friend Of GATA-1.

Nous avons ensuite analysé les effets de l'IS sur la voie de signalisation EPO-EPO-R. La quantification protéique par western blot a montré que le ratio p-STAT5a/b/STAT5a/b ainsi que le ratio p-ERK1/2/ ERK1/2 étaient significativement diminués après l'incubation à l'IS et une stimulation avec l'EPO par rapport à la condition contrôle (**Figure 22A-C**).

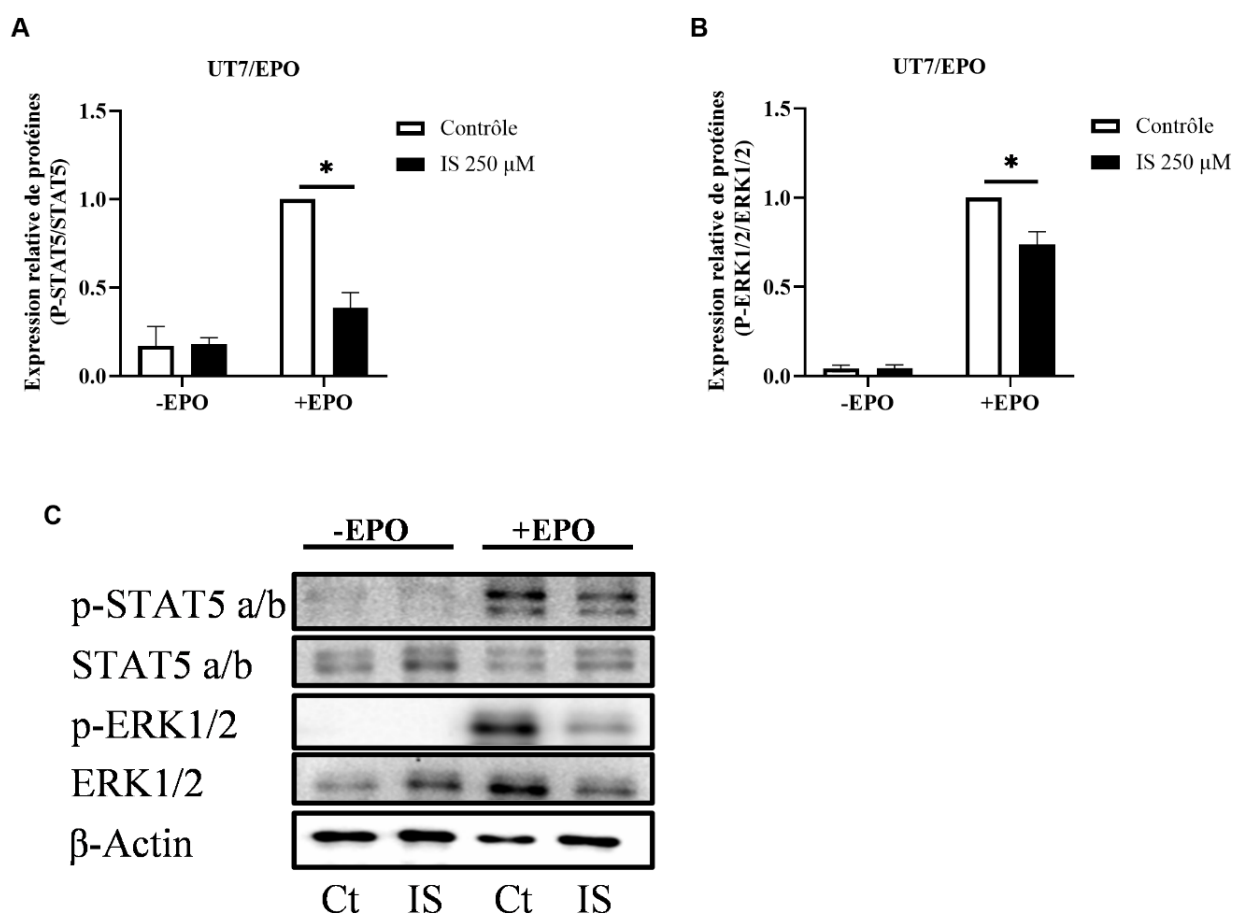


Figure 22. L'IS dérégule la voie de signalisation EPO-EPO-R.

(A) Quantification protéique du ratio p-STAT5a/b sur STAT5a/b total en présence ou en absence d'IS et, avec ou sans EPO. (B) Quantification protéique du ratio p-ERK1/2 sur ERK1/2 total en présence ou en absence d'IS et, avec ou sans EPO. (C) Représentation des bandes de Western blot montrant l'expression protéique de p-STAT5 a/b, STAT5 a/b, p-ERK1/2, ERK1/2 et β -Actin dans les UT7/EPO ($n=3$). Les valeurs sont indiquées en tant que moyenne $\pm$ SEM. Le test U de Mann-Whitney a été utilisé pour l'analyse statistique. * $p < 0,05$.

5. Effet de l'IS sur les miARNs

Une analyse transcriptomique a été effectuée par Nanostring en collaboration avec la Plateforme LIGAN-PMEGID, EGID - UMR8199 de Lille. Le but était de déterminer les miARNs dont l'expression était la plus affectée par l'IS dans les cellules UT7/EPO à 48h à l'aide d'une puce spécifique de miARNs (puce Agilent RNA 6000 Nano de Agilent Technologies). Parmi 804 miARNs, nous avons retenu 20 miARNs les plus dérégulés en présence d'IS comparé à la condition contrôle.

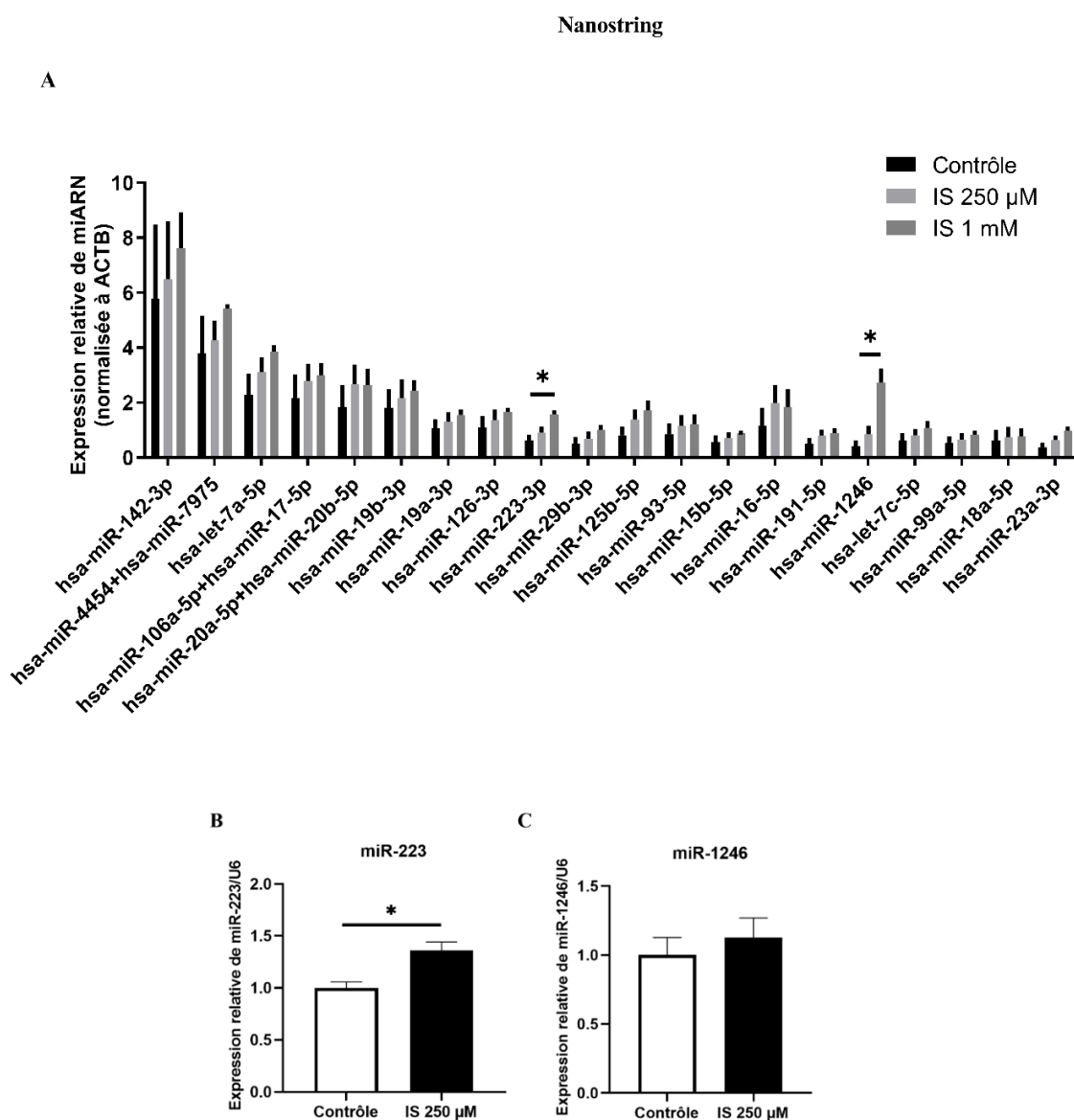


Figure 23. L'expression relative de miARNs dans les UT7/EPO après 48h d'incubation avec l'IS (250 µM).

(A) Les 20 miARNs normalisés par rapport à l'ACTB les plus exprimés dans les UT7/EPO après 48h d'incubation avec l'IS (250 μ M) identifiés par le Nanostring (n=3). (B) Expression relative de miR-223 quantifié par RT-qPCR et normalisé par rapport à U6 (n=4). (C) Expression relative de miR-1246 quantifié par RT-qPCR et normalisé par rapport à U6 (n=3). Les valeurs sont indiquées en tant que moyenne $\pm$ SEM. Le test U de Mann-Whitney a été utilisé pour l'analyse statistique. *p < 0,05.

Parmi tous les miARNs analysés, 2 miARNs sont surexprimés à plus forte concentration (1mM) par rapport à la condition contrôle tels que : le miR-1246 et le miR-223-3p. A 1 mM d'IS, le miR-1246 semble être le miARN le plus dérégulé, trois fois plus exprimé ($p < 0.05$) par rapport à la condition contrôle. Quant au miR-223, il est 1,8 fois plus exprimé ($p < 0.05$) avec 1 mM par rapport à la condition contrôle. On observe une tendance à une surexpression en présence d'IS à 250 μ M non significative de 4 autres miARNs tels que : le miR-20a-5p+miR-20b-5p ($p = 0,2$), le miR-16-5p ($p = 0,2$) et le miR-23a-3p ($p = 0,2$) (**Figure 23A**).

Par la suite, nous avons essayé de confirmer par RT-qPCR les deux miARNs les plus dérégulés obtenus par l'analyse au Nanostring avec une concentration en IS de 250 μ M tels que : le miR-223-3p et le miR-1246 (**Figure 23B-C**). Seul miR-223 est 1,26 plus exprimé en présence de l'IS comparé à la condition contrôle dans les cellules UT7/EPO (**Figure 23B**). Nous n'avons pas réussi à confirmer par RT-qPCR les résultats du Nanostring pour le miR-1246 (**Figure 23C**). Nous avons confirmé une surexpression de miR-223 (2,18 fois) dans les cellules de culture primaire CD34⁺ à J7 en présence d'IS 250 μ M par rapport à la condition contrôle (**Figure 24**).

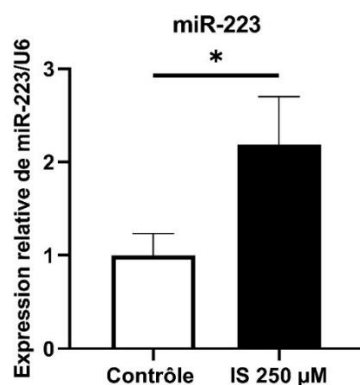


Figure 24. L'expression relative de miR-223 dans les cellules de culture primaire CD34⁺ à J7 avec l'IS 250 μ M (n=3).

Les valeurs sont indiquées en tant que moyenne +/- SEM. Le test U de Mann-Whitney a été utilisé pour l'analyse statistique. *p < 0,05.

6. Effet des toxines urémiques sur les CSH et les CPH dans deux modèles de souris

Une collaboration avec le Dr Juan Moreno du laboratoire GE06 au Maimonides Biomedical Research Institute of Cordoba (IMIBIC) nous a permis de confirmer nos données *in vivo* en utilisant deux modèles murins d'atteinte rénale.

Le premier modèle consiste en une administration aiguë d'IS (400 mg/Kg) sur des souris présentant une fonction rénale normale et le deuxième modèle est un modèle de souris néphrectomisé 5/6 Nx. L'administration d'IS à court terme n'a pas modifié la fonction rénale comme l'indiquent les concentrations en créatinine et urée (**Tableau 9**).

Cependant, l'induction de l'IRC dans le modèle de souris 5/6 Nx a induit une augmentation de la concentration sérique en urée (105,76 mg/dL vs 61,07 mg/dL), en créatinine (0,47 mg/dL vs 0,37 mg/dL) et en Blood Urea Nitrogen (BUN, azote uréique) par rapport aux souris contrôles (**Tableau 9**). La concentration en Hb (12,22 g/dL vs 12,74 g/dL) et le pourcentage d'hématocrite (HCT) (36,35% vs 37,85%) ont significativement diminué chez les souris 5/6 Nx comparé aux souris contrôles (**Tableau 9**). Dans ce modèle, on retrouve un taux sérique d'EPO significativement augmenté par rapport à celui des souris contrôles (220,64 pg/mL vs 175,21 pg/mL). De même, les concentrations d'IS dans le sérum étaient significativement plus élevées chez les souris 5/6 Nx par rapport aux souris contrôles (7680 ng/mL vs 5736,71 ng/mL équivalent à 30,56 µM vs 22,82 µM, respectivement).

Souris IS (400 mg/Kg)	Contrôle (n=3)	IS (400 mg/Kg) (n=5)	P
Créatinine (mg/dL)	0,35	0,38	0,3452
Urée (mg/dL)	59,55	55,3	0,206
EPO (pg/mL)	125,1	178,54	0,21
IS (ng/mL)	2841,2	1974,8	0,51

Souris 5/6 Nx	Contrôle (n=7)	5/6 Nx (n=8)	P
Créatinine (mg/dL)	0,37	0,47	0,0002
Urée (md/dL)	61,07	105,76	0,0002
BUN (mg/dL)	28,53	49,38	0,0002
GR (10 ⁶ /µL)	8,59	8,91	0,0637
GB (10 ³ /µL)	5,04	6,78	0,0103
Hb (g/dL)	12,74	12,22	0,0326
HCT (%)	37,85	36,35	0,0361
MCV (fL)	44,02	40,77	0,0002
MCH (pg)	14,82	13,72	0,0002
PLT (10 ³ /uL)	542	949,75	0,0361
EPO (pg/mL)	175,21	220,64	0,02
IS (ng/mL)	5736,71	7680	0,03

Tableau 9. Paramètres hématologiques et urinaires chez les souris IS (400 mg/Kg) (n=3/5) et chez les souris 5/6 Nx (n=7/8) comparés aux souris contrôles.

Les valeurs sont indiquées en tant que moyenne +/- SEM. Le test U de Mann-Whitney a été utilisé pour l'analyse statistique. Abréviations : BUN, Blood Urea Nitrogen (azote uréique) ; GB, globules blancs, GR, globules rouges ; Hb, hémoglobine ; HCT, hématocrite ; MCV, volume corpusculaire moyen ; MCH, hémoglobine corpusculaire moyenne ; PLT, plaquettes.

Dans le but d'explorer l'apoptose et la différenciation des cellules souches érythroïdes, les cellules de la MO des souris ont été isolées à partir de nos deux modèles murins.

Aucune différence significative dans le pourcentage de cellules apoptotiques dans la MO n'a été observé chez les souris IS par rapport aux souris contrôle (**Figure 25A**). Chez les souris 5/6 Nx, le pourcentage de cellules apoptotiques dans la MO était légèrement augmenté comparé aux souris contrôles après le sacrifice (6,35% vs 5,22%) (**Figure 25B**).

La sous-population KSL⁻ représente les CSH et les CPH dans la MO. Dans le modèle de souris IS, aucun changement significatif dans le pourcentage de cellules KSL⁻ par rapport aux souris contrôles n'a été observé (**Figure 25C**). Chez les souris 5/6 Nx, nous avons trouvé une augmentation du pourcentage de cellules KSL⁻ par rapport aux souris contrôles (0,82% vs 0,62%) (**Figure 25D**).

L'ensemble de nos données suggère une accumulation significative de cellules KSL^- chez les souris 5/6 Nx qui peut être expliquée par un blocage des CSH et des CPH dans la MO induisant peut-être une légère augmentation de l'apoptose dans les cellules isolées de la MO.

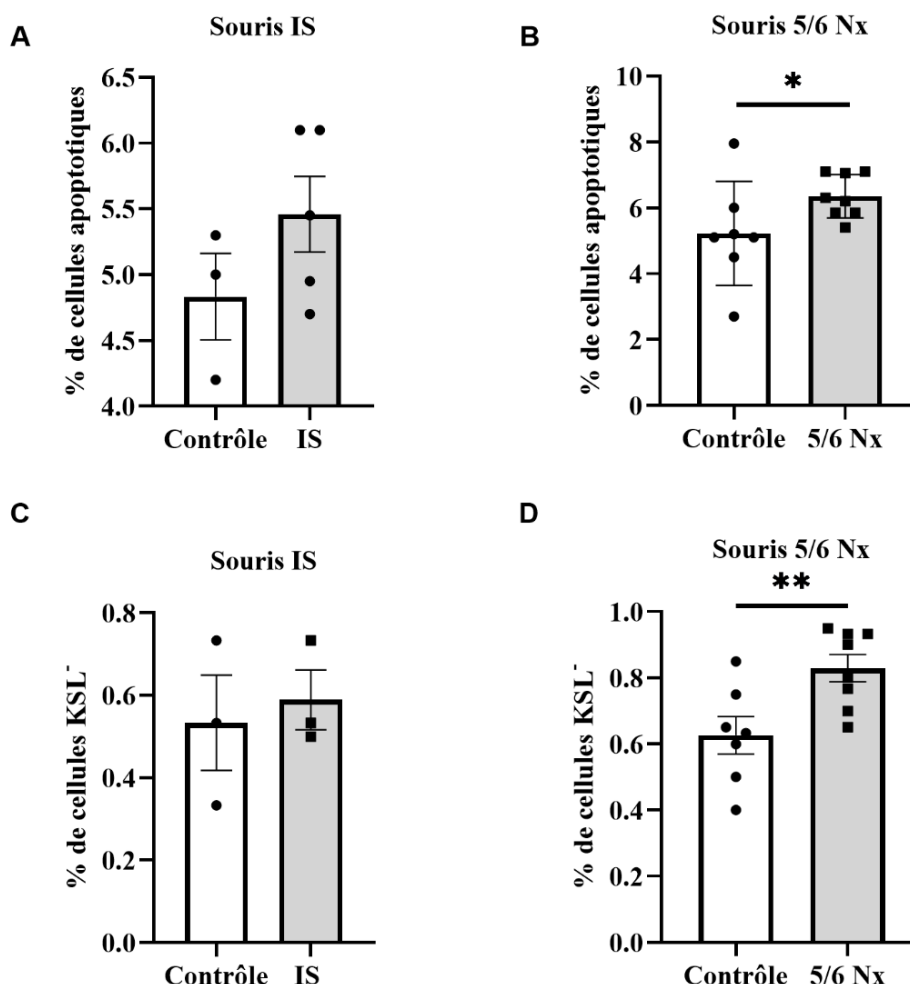


Figure 25. L'effet des toxines urémiques sur les CSH et les CPH dans deux modèles de souris.

(A) Pourcentage de cellules apoptotiques dans la MO de souris IS (400 mg/Kg) comparé aux souris contrôle après sacrifice (n=3/5). (B) Pourcentage de cellules apoptotiques dans la MO de souris 5/6 Nx comparé aux souris contrôle après sacrifice (n=7/8). (C) Pourcentage de cellules KSL^- chez les souris IS (400 mg/Kg) comparé aux souris contrôle (n=3). (D) Pourcentage de KSL^- chez les souris 5/6 Nx comparé aux souris contrôle (n=7/8). Les valeurs

sont indiquées en tant que moyenne $\pm$ SEM. Le test U de Mann-Whitney a été utilisé pour l'analyse statistique. $*p < 0,05$, $**p < 0,01$.

Puis, l'effet des toxines urémiques sur les progéniteurs érythroïdes murins a été évalué pendant 24h durant l'érythropoïèse *in vitro* à partir des cellules isolées de la MO. Dans le modèle de souris IS, une réduction significative du pourcentage de BFU-E a été constatée après 24h de culture dans un milieu de différenciation comparé aux souris contrôles (0,13% vs 0,21%) (**Figure 26A**). Néanmoins, ces souris n'ont montré aucun changement dans le pourcentage de CFU-E et de Pro-E par rapport aux souris contrôles (**Figure 26B,C**). Cependant, nous avons constaté un pourcentage plus réduit de TER-119⁺ chez les souris IS par rapport aux souris contrôle après sacrifice des souris (0h) (22,24% vs 26,82%). Les résultats suggèrent que dans ce modèle, l'IS peut affecter les cellules érythroïdes matures en phase terminale (**Figure 26D**).

Dans le modèle 5/6 Nx, le pourcentage de BFU-E est significativement plus élevé après sacrifice (0,76% vs 0,44%) (**Figure 26E**) ainsi qu'une augmentation significative du pourcentage de CFU-E à 24h (0,94% vs 0,31%) comparé aux souris contrôle (**Figure 26F**). Après le sacrifice, le pourcentage de cellules Pro-E était significativement diminué dans ce modèle (0,17% vs 0,32%) par rapport aux souris contrôle, alors qu'il était significativement augmenté à 24h de culture cellulaire (3,37% vs 1,53%) (**Figure 26G**). Dans ce même modèle, le pourcentage de TER-119⁺ était significativement diminué après sacrifice (34,63% vs 42,29%) et après 24h de culture cellulaire (38,55% vs 54,29%) (**Figure 26H**) par rapport aux souris contrôle.

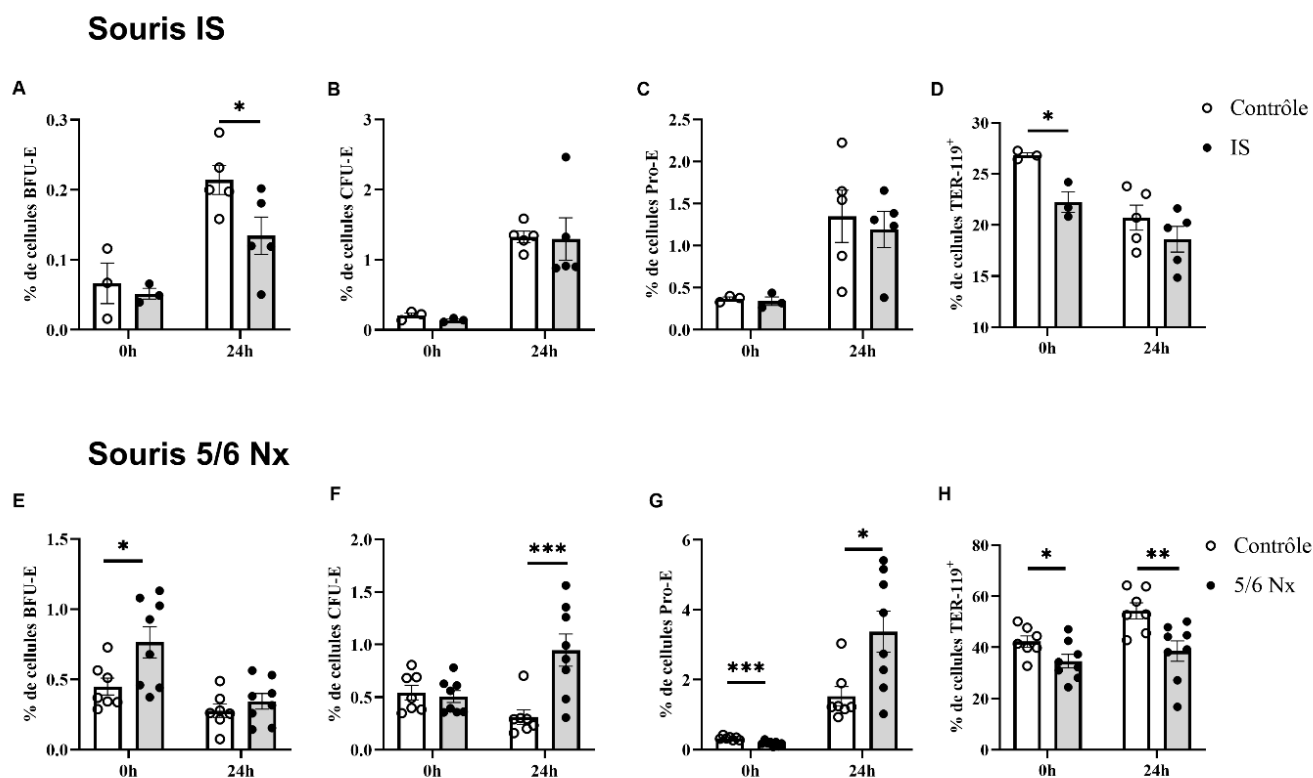


Figure 26. Les toxines urémiques affectent les progéniteurs érythroïdes murins durant l'érythropoïèse *in vitro*.

(A) Pourcentage de BFU-E chez les souris IS (400 mg/Kg) comparé aux souris contrôle (n=3/5). (B) Pourcentage de CFU-E chez les souris IS (400 mg/Kg) comparé aux souris contrôle (n=3/5). (C) Pourcentage de Pro-E chez les souris IS (400 mg/Kg) comparé aux souris contrôle (n=3/5). (D) Pourcentage de cellules TER-119⁺ chez les souris IS (400 mg/Kg) comparé aux souris contrôle (n=3/5). (E) Pourcentage de BFU-E chez les souris 5/6 Nx comparé aux souris contrôle (n=7/8). (F) Pourcentage de CFU-E chez les souris 5/6 Nx comparé aux souris contrôle (n=7/8). (G) Pourcentage de Pro-E chez les souris 5/6 Nx comparé aux souris contrôle (n=7/8). (H) Pourcentage de cellules TER-119⁺ chez les souris 5/6 Nx comparé aux souris contrôle (n=7/8). Les valeurs sont indiquées en tant que moyenne $\pm$ SEM. Le test U de Mann-Whitney a été utilisé pour l'analyse statistique. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

V. Discussion

L'ensemble de nos résultats indique que l'IS affecte les cellules érythropoïétiques aux stades de cellules progénitrices de l'érythropoïèse. En effet, nous avons démontré que l'IS affecte la viabilité cellulaire et la différenciation des progéniteurs érythroïdes *in vitro* et *in vivo* en induisant une altération de l'érythropoïèse qui pourrait expliquer en partie la genèse de l'anémie dans l'IRC.

1. Les toxines urémiques induisent l'apoptose dans les lignées cellulaires érythropoïétiques et les cellules humaines CD34⁺ pendant l'érythropoïèse *in vitro*.

En utilisant la CMF, nous avons étudié l'impact de l'IS et du PCS sur le phénotype cellulaire et l'apoptose dans différentes lignées cellulaires érythropoïétiques : UT7/EPO, K562 et HEL. La lignée cellulaire UT7/EPO est un modèle de prolifération induite par l'EPO, tandis que les lignées K562 et HEL sont un modèle de différenciation. Dans la lignée cellulaire UT7/EPO, le pourcentage de cellules en apoptose a doublé lorsque les cellules ont été incubées avec une concentration en IS de 250 μ M pendant 48h. L'utilisation de q-VD, un inhibiteur d'apoptose, a confirmé que la mort cellulaire des cellules UT7/EPO était due à l'apoptose et non à la nécrose. Nos résultats ont également confirmé l'apoptose par l'augmentation de la fraction Sub-G1 dans les cellules UT7/EPO traitées par l'IS. Des études ont montré que l'IS augmente l'apoptose dans d'autres types de cellules comme les astrocytes [225], les ostéoblastes [226] ou les cellules rénales [227]. Nos résultats sont en accord avec une étude récente qui a montré que l'IS dérégule l'érythropoïèse *in vitro* en déclenchant l'apoptose dans les CSH CD34⁺ [60].

Dans la lignée cellulaire HEL, le pourcentage de cellules entrant en apoptose a augmenté à des taux similaires lorsque les cellules ont été incubées à 24h et 48h avec l'IS. En revanche, dans la lignée cellulaire K562, nous n'avons pas observé d'apoptose à 24h et 48h d'incubation avec l'IS, due à la kinase oncogène anti-apoptotique Bcr-Abl déjà décrite [228].

Il a déjà été démontré que l'IS et le PCS s'accumulent dans les érythrocytes des patients en HD [229]. Dans les cellules UT7/EPO, la PCS n'a montré aucun effet significatif. De plus, nous n'avons trouvé aucun effet additif des deux toxines combinées ensemble sur l'apoptose. Ces données suggèrent que l'IS pourrait être la principale toxine urémique dans l'anémie induite par l'IRC.

Nous avons ensuite essayé de confirmer nos résultats dans un modèle d'érythropoïèse dans des cellules primaires CD34⁺ humaines en différenciation. Notre modèle CD34⁺ a confirmé l'effet apoptotique de l'IS observé dans les lignées cellulaires puisque nous avons constaté une augmentation du pourcentage de cellules en apoptose dans l'érythropoïèse tardive (J18). Cette apoptose pourrait être associée à la diminution de la prolifération cellulaire. De plus, la caractérisation des progéniteurs érythroïdes à différents stades indique que l'IS pourrait bloquer les cellules au stade BFU-E. Le blocage au stade BFU-E peut expliquer pourquoi nous avons observé à la fois une accumulation de cellules BFU-E et une diminution de cellules CFU-E. Les mêmes résultats ont été observés dans le modèle de souris 5/6 Nx comme discuté plus loin.

Ces résultats suggèrent que l'IS provoque un blocage des cellules BFU-E ainsi qu'une diminution de la prolifération cellulaire conduisant probablement à la mort cellulaire par apoptose. Ceci est en accord avec la littérature, car les cellules au stade BFU-E ont besoin d'EPO pour proliférer [87], ce qui peut suggérer que l'IS inhibe directement ou indirectement l'EPO, car les cellules UT7/EPO privées d'EPO meurent par apoptose [230].

2. L'IS affecte le phénotype dans les lignées cellulaires et induit un retard de différenciation dans les cellules CD34⁺ humaines pendant l'érythropoïèse *in vitro*.

L'IS agit sur le phénotype des cellules HEL mais surtout sur le phénotype des cellules K562 avec l'expression de CD41a⁺. En condition normale, le marqueur CD41a⁺ n'est pas exprimé dans les cellules K562 ce qui indique que l'IS pourrait potentiellement induire des changements dans le phénotype cellulaire.

Une autre modification du phénotype a été confirmée avec les cultures primaires de CD34⁺. Nous avons examiné la co-expression des marqueurs CD34⁺/CD123⁺ dans les cellules CD34⁺ humaines primaires, car l'IL3-R devrait diminuer au cours de l'érythropoïèse [87]. Comme attendu, l'IS a induit une diminution des cellules co-exprimant le CD34⁺/CD123⁺, ce qui suggère que l'IS peut induire un changement phénotypique vers les progéniteurs myéloïdes.

Le pourcentage de cellules exprimant le CD235a⁺ au niveau de l'érythropoïèse terminale observée en présence de l'IS peut confirmer le retard de la différenciation érythroïde suite au blocage de cellules au stade BFU-E. Enfin, l'augmentation du ratio GATA-2/GATA-1 et l'augmentation du pourcentage de cellules érythroïdes immatures en présence d'IS ont confirmé

que les cellules sont bloquées au stade précoce BFU-E. GATA-2 est connu dans la littérature pour être exprimé dans les CSH, les CPS et les BFU-E [110]. L'ensemble de nos données suggère que l'IS induit une déviation du phénotype cellulaire, conduisant potentiellement à l'apoptose cellulaire.

3. L'IS dérégule les gènes liés à l'érythropoïèse

L'augmentation du rapport GATA-2/GATA-1 et l'accumulation de cellules érythroïdes immatures en présence de l'IS sont en faveur des gènes associés à l'érythropoïèse précoce.

Le modèle CD34⁺ primaire a permis d'examiner les gènes dérégulés liés à l'érythropoïèse en présence d'IS à un stade précoce de l'érythropoïèse et de confirmer une accumulation de cellules au stade BFU-E. Plusieurs gènes sont connus pour être dérégulés dans l'anémie tels que la GPA (ou TER-119 chez les souris), le CD71, le EKLF, le GATA-1, le GATA-2, la β -globine, et le FOG 1 [231]–[235]. Nos travaux ont également démontré une dérégulation de ces gènes dans les cellules primaires humains CD34⁺.

L'expression des gènes spécifiques de l'érythropoïèse (EPO-R, GPA, et β -globine) ciblant GATA-1 était diminuée après l'incubation avec l'IS. GATA-1 est un facteur de transcription essentiel spécifique aux érythroïdes et impliqué dans la survie des progéniteurs érythroïdes. Ce dernier régule directement le gène de la β -globine et le gène du EKLF [126]. Par exemple, les souris homozygotes EKLF^{-/-} en stade embryonnaire de l'hématopoïèse développent une anémie fœtale [232]. De même, GATA-1 est connu pour être impliqué dans la différenciation des BFU-E vers le stade CFU-E [236]. Dans notre étude, l'IS bloque les cellules au stade BFU-E chez les souris 5/6 Nx et au stade BFU-E dans les cellules CD34⁺. La littérature a montré qu'une modulation négative de GATA-1 est suffisante pour convertir les BFU-E en progéniteurs CFU-granulocytes-macrophages (CFU-GM) et augmenter l'expression du facteur de transcription PU.1 [237].

Notre étude s'est limitée à l'effet de l'IS sur la différenciation érythroïde. Néanmoins, notre hypothèse, qui doit être confirmée par des marqueurs spécifiques, suppose que l'IS agit sur le phénotype en faveur d'une différenciation myéloïde. Nous supposons que l'IS empêche l'EPO de se lier à son récepteur, dérégulant ainsi la voie de signalisation EPO-R en réduisant l'activation de la voie JAK-STAT. En conséquence, de nombreux gènes sont sous exprimés

avec l'IS conduisant potentiellement à un changement du phénotype cellulaire. Ainsi, les cellules ne disposent pas des cytokines adéquates pour se différencier, ce qui peut conduire à la mort cellulaire par apoptose.

Nos résultats démontrent clairement que l'IS empêche d'avoir une érythropoïèse efficace en bloquant les cellules en stade BFU-E affectant directement le développement des cellules érythroïdes terminales.

4. Identification de nouveaux miRNAs impliqués dans l'érythropoïèse par étude transcriptomique

Les miRNAs jouent des rôles importants dans de nombreux processus biologiques, y compris l'érythropoïèse. Le Nanostring nous a permis d'identifier les miARNs les plus dérégulés dans les UT7/EPO sous l'effet de l'IS. Les limites de nos résultats résultent du fait que le Nanostring ressort des tendances à une dérégulation de certains miARNs (miR-223 et miR-1246) à forte concentration en IS (1 mM) mais non concluants. Seul miR-223 a pu être confirmé dans les cellules UT7/EPO et dans les cellules en culture primaire CD34⁺ à une concentration en IS de 250 μ M.

Chez les patients atteints d'IRC de stade 4 et 5, l'expression relative de miR-223 dans le sérum est sous-exprimée par rapport à des témoins sains. Dans cette même étude, il a été démontré que miR-223 était associé à l'IL-6 et aux niveaux de DFG [238]. Une autre étude a démontré l'importance de miR-223 dans l'IRC. 10 semaines après une néphrectomie subtotale, miR-223 était diminué dans le sérum des souris en IRC par rapport aux souris SHAM. MiR-223 pourrait représenter une cible utile pour prévenir ou traiter les complications de l'IRC [239].

Dans une cohorte de 638 patients, une étude a démontré que le taux sérique de miR-223 était faible chez les patients atteints d'IRC (à partir du stade 3B) avec un taux de survie plus faible par rapport aux contrôles sains [240]. La modulation de ce miR-223 chez les patients atteints d'IRC pourrait être utile pour traiter les complications liées à l'IRC. Cependant, l'étude de Fourdinier *et al.* [197] sur le miR-223 réalisée pour évaluer la relation entre ce miARN avec la mortalité et les maladies cardiovasculaires n'a révélé aucune association indépendante de la DFG. Le miR-223 est un marqueur de l'IRC mais pas meilleur que l'examen de référence qu'est la DFG. Certains biomarqueurs miARNs non invasifs prometteurs ont déjà été reconnus dans

les maladies rénales et pourraient améliorer la précision du diagnostic, prédire le pronostic et surveiller l'évolution de la maladie. Toutefois, des essais cliniques à grande échelle portant sur des patients hétérogènes sont nécessaires pour évaluer la valeur clinique des miARNs [241].

MiR-223 est essentiel pour une myélopoïèse normale chez les mammifères, favorisant la différenciation des granulocytes, des ostéoclastes et des mégacaryocytes et supprimant l'érythropoïèse [242]. Une étude confirme cela également en démontrant que miR-223 est 10 fois plus exprimé pendant la granulopoïèse, 3 fois plus exprimé pendant la monocytopoïèse et maintenu à de faibles niveaux pendant l'érythropoïèse. La surexpression de miR-223 augmente la granulopoïèse et nuit à la différenciation érythroïde et monocyttaire/macrophagique. Sa sous-expression induit l'effet inverse, en réprimant la granulopoïèse et en induisant l'érythropoïèse et la différenciation monocyttaire/macrophagique [243].

Des travaux ont porté sur le rôle fonctionnel du miR-223 sur la différenciation érythroïde. Dans les CPH CD34⁺, le miR-223 est sous-exprimé, tandis que LMO2, une protéine essentielle pour la différenciation érythroïde, est surexprimée. LMO2 est connu pour être une cible directe de miR-223. Des études fonctionnelles ont montré que l'expression forcée du miR-223 réduit les niveaux d'ARNm et de protéine de LMO2, et empêche la différenciation des cellules érythroïdes [244, p. 2]. Cela suggère que la modulation à la baisse de ce miARN est nécessaire pour enclencher une différenciation érythroïde et débloquent l'expression protéique de LMO2.

Etant donné qu'il est difficile d'identifier un miARN qui soit spécifiquement dérégulé dans un contexte d'anémie liée à l'IRC, les UT7/EPO ont servi de tri pour sélectionner les miARNs les plus dérégulés. Cela permet plus facilement de confirmer les données par la suite sur des cellules de culture primaire. À l'avenir, on pourra étudier le miR-223 dans un modèle d'IRC, par exemple de souris 5/6 Nx, et d'identifier d'autres miARNs dérégulés dans la MO et/ou dans les reins.

En corrélation avec les résultats obtenus dans les cellules UT7/EPO et dans les cellules CD34⁺ à J7, on peut supposer que la surexpression observée de miR-223 aurait pour conséquence une inhibition de l'érythropoïèse, ce qui expliquerait le retard dans la différenciation érythroïde. Cette hypothèse peut être vérifiée à l'avenir en modulant le miR-223 (anti-miR-223) dans les cellules de culture primaire CD34⁺ (tri des BFU-E) et regarder si cela affecte la viabilité et la différenciation cellulaire.

L'effet de l'IS avec le blocage au stade BFU-E et les quelques gènes identifiés pourrait nous permettre de prédire à l'aide d'algorithmes les miARNs ciblant les ARNm dérégulés durant

l'érythropoïèse précoce. En utilisant le moteur de recherche Targetscan (www.targetscan.org/), avons pu ressortir LMO2 comme cible directe de miR-223 qui a déjà été confirmé dans l'étude de Felli *et al* [245]. Un autre gène semble être également une cible de miR-223, l'EPO-R qui n'a pas encore été étudié. Il serait très intéressant d'étudier ce gène en perspective d'avenir et prouver qu'il est régulé par miR-223.

5. L'IS dérégule la voie de signalisation EPO-EPO-R.

Notre hypothèse est que l'IS affecte l'EPO-R conduisant à une dérégulation de gènes essentiels spécifiques à l'érythropoïèse. En effet, l'expression de l'ARNm de l'EPO-R est diminuée dans les UT7/EPO en présence d'IS (250 μ M). Une étude sur des rats en IRC a montré que l'anémie rénale est liée à une diminution des niveaux d'EPO-R dans la MO [246]. Ensuite, nous avons concentré notre étude sur la voie centrale de signalisation de l'EPO-R qui est STAT-5 [104]. Le rôle de STAT-5 dans la régulation de l'érythropoïèse est important. Un knock-out de STAT-5 chez les fœtus de souris induit une anémie fœtale et l'apoptose des progéniteurs érythroïdes [100], [247]. Dans les UT7/EPO, l'IS a diminué l'expression protéique de STAT-5 en aval de l'EPO-R, ce qui peut expliquer l'apoptose mentionnée ci-dessus.

Selon nos résultats, l'IS diminue significativement la phosphorylation de ERK dans les UT7/EPO. Le contrôle de la prolifération cellulaire pendant la maturation des progéniteurs en érythroblastes est lié à la voie de signalisation ERK [248]. ERK est activé par phosphorylation pendant les stades EPO-dépendants, et son activation est ROS-dépendante [249], [250]. En accord avec la littérature, nous avons émis l'hypothèse que l'IS a un impact directement sur la signalisation de la cascade MAPK/ERK. L'effet de l'IS sur la phosphorylation ERK peut par conséquent expliquer la réduction de la prolifération des cellules CD34⁺ à partir de J7, l'apoptose observée à J18 et la diminution de cellules exprimant le CD235a⁺ lors de l'érythropoïèse terminale. En perspective, nous pouvons confirmer l'implication de la voie ERK dans les cultures primaires CD34⁺ en utilisant un inhibiteur d'ERK.

6. Les toxines urémiques affectent les CSH, les CPH et les progéniteurs érythroïdes dans deux modèles de souris.

Dans notre modèle de souris IS, aucune modification des paramètres urinaires n'a été observée. L'exposition à court terme à l'IS confirme ce qui a été partiellement observé dans les cultures primaires de CD34⁺ où l'IS a diminué le pourcentage de cellules CD235a⁺ (érythroïdes terminales).

La fonction rénale des souris 5/6 Nx était bien réduite comme le montrent les paramètres sanguins et urinaires. Nous avons constaté un début d'anémie, une des complications majeures observées lors de l'IRC. Les paramètres hématologiques suggèrent un développement de l'anémie avec une diminution du taux d'Hb et de l'HCT [251]. L'analyse en cytométrie de différents marqueurs membranaires a confirmé le début d'anémie avec la diminution du nombre de cellules de stade mature (TER-119⁺) ainsi que la diminution du nombre de cellules Pro-E [251].

Chez les souris 5/6 Nx, la caractérisation des progéniteurs érythroïdes murins a identifié une accumulation de cellules au stade BFU-E comme cela a déjà été observé dans les cellules humaines primaires. Néanmoins, les taux d'EPO sériques sont supérieurs chez les souris 5/6 Nx par rapport aux souris témoins malgré l'observation d'un blocage au stade BFU-E. Après avoir mis en culture les cellules pendant 24h dans un milieu contenant de l'EPO et du SCF, une augmentation du nombre de cellules CFU-E, certainement due au déblocage des cellules BFU-E, a été observé. Cela pourrait être un moyen de compenser le manque de production d'EPO dans le rein ou un possible effet synergique des deux cytokines sur les CPH [252], [253]. Cette libération de cellules BFU-E suggère que, bien que les taux sériques d'EPO soient élevés chez les souris 5/6 Nx par rapport aux souris témoins, cela ne suffit pas à compenser les besoins en EPO pour stimuler la production de GR dans la MO. Il est également possible que les toxines urémiques ne permettent pas à l'EPO d'atteindre la MO et donc empêcher sa liaison à son récepteur, car lorsque les cellules ont été incubées avec l'EPO et du SCF, il n'y avait pas de toxines urémiques dans le milieu.

Une étude a démontré que l'augmentation de l'EPO au cours de l'IRC provenait du foie pour compenser la production insuffisante d'EPO par les reins [254]. Ces auteurs ont suggéré que la synthèse d'EPO par le foie ne peut pas compenser entièrement la production nécessaire et suffisante d'EPO que les reins auraient produit en condition normale. Ceci est probablement dû

à la capacité maximale de production d'EPO par le foie mais pourrait également être lié à une demi-vie plus courte de l'EPO produite [143], [254].

Toutes ces données suggèrent que l'IS empêche la différenciation des cellules BFU-E en cellules CFU-E. Ceci peut être lié à une déficience en EPO et/ou à une dérégulation de l'expression de l'EPO-R pendant les premiers stades de l'érythropoïèse. En conséquence, toutes les cellules BFU-E n'atteindraient pas les derniers stades de la différenciation, ce qui entraînerait un manque de cellules érythroïdes matures différenciées.

L'anémie chez les patients atteints d'IRC peut être traitée par des ASE ou par une supplémentation en fer par voie intraveineuse [165], [166]. Une cause potentielle de résistance aux ASE est l'accumulation de toxines urémiques [255]. Malgré l'ASE et la supplémentation en fer, certains patients atteints d'IRC n'atteignent pas la référence cible d'Hb. Une alternative pour corriger l'anémie rénale sont les HIF-PHI qui réduisent la progression de l'IRC [256]. Bien que l'ASE ou les inhibiteurs de l'HIF-PHI améliorent la production de GR, ils n'améliorent pas la durée de vie des GR chez les patients atteints d'IRC [257]. Une nouvelle stratégie thérapeutique potentielle consiste à cibler spécifiquement l'IS des patients atteints d'IRC en utilisant l'absorbant oral AST-120. Une étude a montré que l'association de l'AST-120 et d'un traitement par ASE a amélioré les taux d'Hb [188] mais sans affecter les taux de créatinine sérique [258]. Le développement de traitements plus physiologiques et plus efficaces est donc nécessaire pour l'anémie liée à l'IRC.

VI. Conclusion et perspectives

L'anémie est une conséquence commune de l'IRC qui est associée aux MCV et à une augmentation de la morbi-mortalité chez ces patients. La combinaison de modèles d'étude *in vitro* et *in vivo* nous a permis de confirmer que l'IS est capable d'affecter la viabilité et la différenciation cellulaire des progéniteurs érythroïdes altérant l'érythropoïèse et contribuant au développement de l'anémie dans l'IRC. Le blocage des cellules au stade BFU-E et la dérégulation de l'EPO-R pourrait expliquer le retard de différenciation observé avec la diminution des cellules érythroïdes matures et l'augmentation des cellules en apoptose (**Figure 27**).

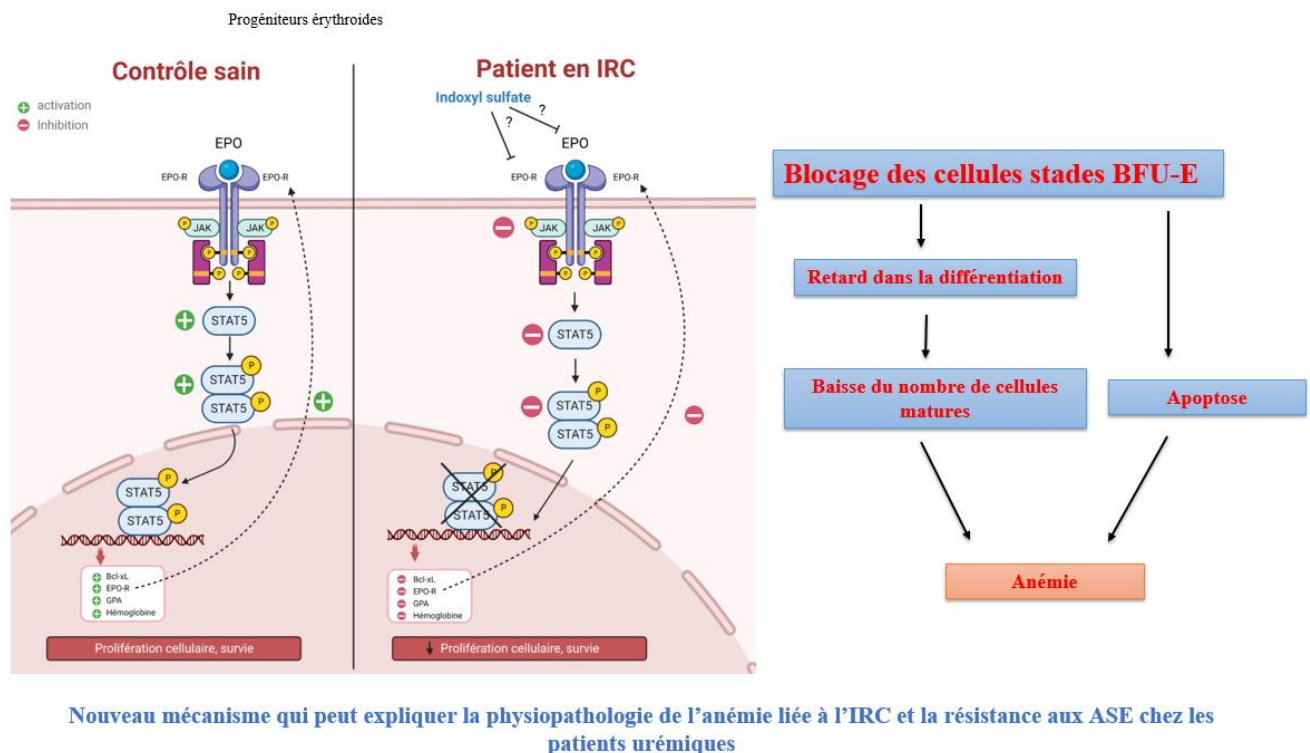


Figure 27. Schéma récapitulatif des résultats obtenus

Le modèle de souris 5/6 Nx est le plus proche de ce que l'on observe chez les patients en IRC. Il est intéressant de regarder dans la globalité tout ce qui se passe au moment de la maladie. Notre étude s'est basée sur la MO, mais on a récupéré après le sacrifice des souris les reins et le foie. L'expression relative de plusieurs gènes (EPO, Hpcidine, HIF-2 α) serait à quantifier

dans les principaux organes impliqués. Il serait intéressant de regarder les mécanismes compensatoires et démontrer que l'augmentation de l'EPO dans le sérum des souris est liée à la production de l'EPO à partir du foie et non pas à partir du 1/3 de rein restant.

Les résultats du Nanostring n'ont pas été très concluants. À l'avenir la technologie du RNA seq sera utilisée afin d'identifier les miARNs les plus dérégulés lors du passage du stade BFU-E vers CFU-E en utilisant des cellules primaires CD34⁺. Par la suite, en fonction des résultats obtenus nous pourrions moduler l'expression des miARNs en utilisant des mimic miARNs ou des anti miARNs pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le blocage des cellules au stade BFU-E.

À ce jour, la plupart des recherches sur l'IRC se sont concentrées sur les miARNs, mais on ne sait pas grand-chose du rôle des LncARNs. Dans notre revue sur les ARNnc, les LncARNs NOP14-AS1 et LncARNs HCP5 sont dérégulés durant l'IRC [191]. Il serait intéressant d'étudier l'expression de ces deux LncARNs dans nos modèles cellulaires. Une caractéristique prometteuse des LncARNs est qu'ils sont plus spécifiques de tissus ou de types cellulaires donnés que les ARNm ou les miARNs. Ces dernières années, les LncARNs ont été de plus en plus reconnus comme étant impliqués dans la pathophysiologie de diverses maladies rénales. Les LncARNs sont des biomarqueurs pronostiques émergents dans les maladies rénales et peuvent dans l'avenir servir de cibles thérapeutiques pour réduire les dommages rénaux.

Enfin, l'hypothèse d'un effet de l'IS sur un changement phénotypique n'a pas pu être confirmée lors de notre étude. Une autre perspective serait de caractériser avec des marqueurs membranaires en CMF la population qui coexiste avec les cellules érythroïdes lors de la différenciation érythroïde. On peut utiliser des marqueurs spécifiques de la lignée myéloïde (par exemple, mégacaryocyte, monocyte et granulocyte).

VII. Annexe

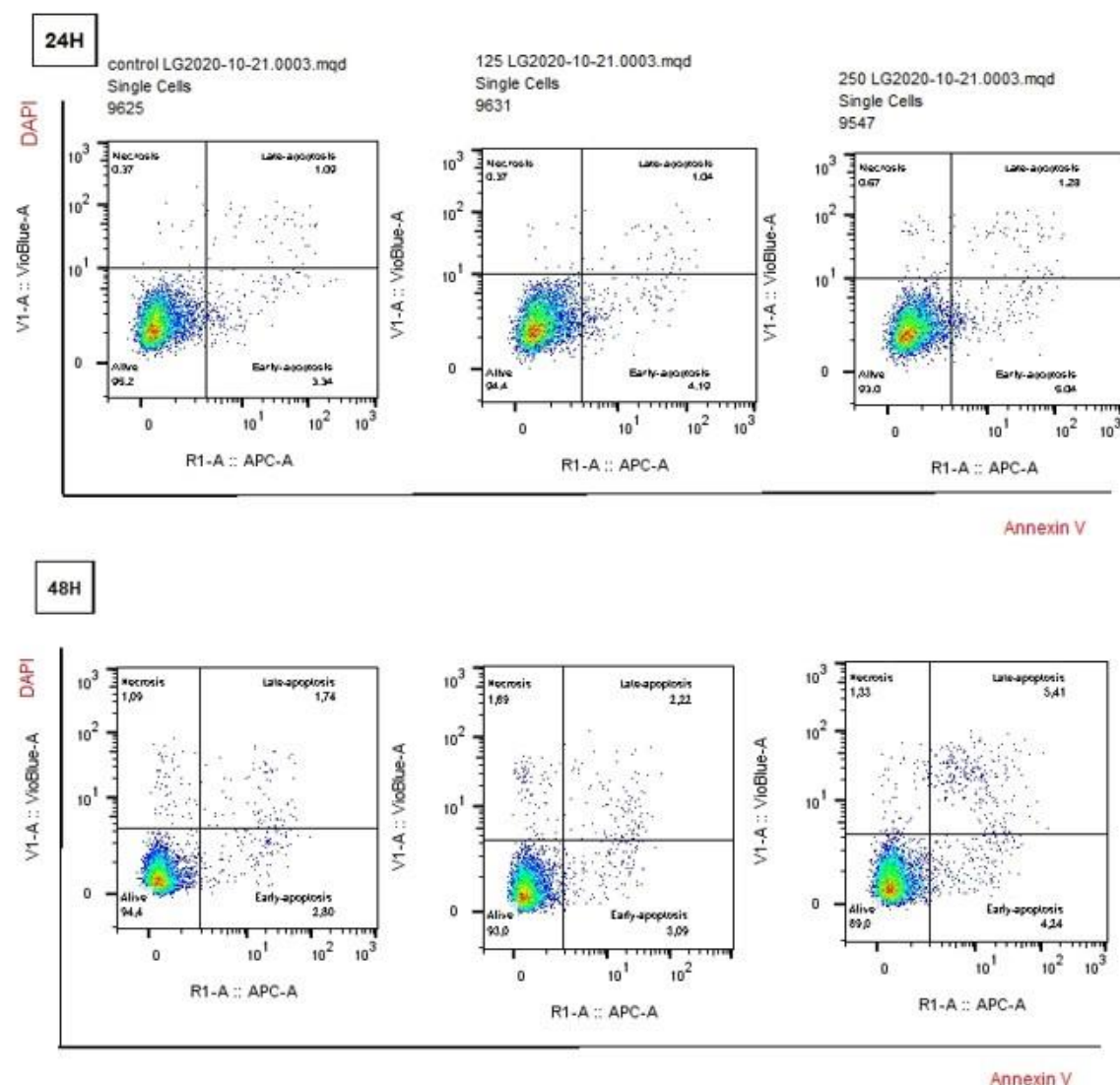


Figure 28. L'effet de l'IS sur la nécrose dans les UT7/EPO

Abstract congrès:

**INDOXYL SULFATE AFFECTS ERYTHROPOIESIS
DURING THE COURSE OF CHRONIC KIDNEY
DISEASE: A MOLECULAR STUDY**

<https://doi.org/10.1093/ndt/gfab085.0013>

MO550

INDOXYL SULFATE AFFECTS ERYTHROPOIESIS DURING THE COURSE OF CHRONIC KIDNEY DISEASE: A MOLECULAR STUDY

Eya Hamza¹, Hakim Ouled-Haddou¹, Nicolas Jankovsky¹, Yohann Demont^{1,2}, Benjamin Brigant^{3,4}, Ziad Massy^{5,6}, Stéphane Burtay^{7,8}, Gabriel Choukroun^{4,9}, Loïc Garçon^{1,2}, Laurent Metzinger¹, Valérie Metzinger-le Meuth^{1,10}

¹HEMATIM UR-UPJV 4666, C.U.R.S. University of Picardie Jules Verne, Amiens, France,

²Service Hématologie Biologique, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Amiens-

Picardie, Amiens, France, ³NTNU Norwegian University of Science and Technology,

Faculty of Medicine and Health Sciences, Trondheim, Norway, ⁴UR-UPJV7517, MP3CV,

C.U.R.S. University of Picardie Jules Verne, Amiens, France, ⁵Inserm U-1018, Team 5,

Centre de recherche en épidémiologie et santé des populations, Versailles Saint-

Quentin-en-Yvelines University (Paris-Île-de-France-Ouest University), Villejuif, France,

⁶Division of Nephrology, Ambroise Paré Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de

Paris, Paris, France, ⁷C2VN, Aix Marseille Univ, INSERM, INRAE, Marseille, France, ⁸Centre

de Néphrologie et Transplantation Rénale, AP-HM, Hôpital de la Conception, Marseille,

France, ⁹Department of Nephrology, Dialysis and Transplantation, Centre Hospitalier

Universitaire (CHU) Amiens-Picardie, Amiens, France and ¹⁰INSERM UMRS 1148,

Laboratory for Vascular Translational Science (LVTS), Bobigny, France

BACKGROUND AND AIMS: Chronic kidney disease (CKD) is a global health condition characterized by a progressive deterioration of renal function due to high serum levels of uremic toxins. Anemia is a major trouble in CKD patients that contributes to a faster deterioration of renal failure, leading to cardiovascular disease and increasing morbimortality. Erythropoietin (EPO) is known to contribute to CKD-associated anemia. Thus, accumulation of uremic toxins in blood impairs EPO synthesis, leading to a subsequent impairment of erythropoiesis in the bone marrow. Very few molecular clues explain why erythropoiesis is affected in CKD or explain why erythropoiesis-stimulating agents (ESA) are not efficient in some patients with CKD. The current study aims to characterize the impact of one of the most representative uremic toxins, Indoxyl Sulfate (IS), in CKD-related anemia. IS is a protein-bound uremic toxin derived from the tryptophan dietary metabolism which is difficult to remove by dialysis. Our study demonstrates the molecular effects of IS on the growth and the differentiation of red blood cells in an erythroid cell line and in primary cell cultures CD34+.

METHOD: Firstly, we examined in vitro the time-courses of IS under clinically relevant concentrations of IS (250 µM -1 mM) in a human leukemic cell line in which proliferation is induced by EPO, the UT7/EPO cell line. Cell apoptosis, proliferation, differentiation and cell cycle analysis were assessed by the MACSQuant flow cytometry. Erythroid gene expression analysis was assessed by RT-qPCR (Quantstudio 7 flex). The ratio A260/280 assessed the quality of nucleic acids. Western blotting experiments were performed to study protein expression. Human primary CD34+ cells were obtained from mobilized peripheral blood mononuclear cells (MNC) of healthy subjects and were isolated by magnetic microbeads separation on MACS columns.

RESULTS: IS at 250 µM and 1 mM increased apoptosis of UT7/EPO cell line at 48h compared to control condition. On the other hand, we found no significant effect of IS on the phenotype of UT7/EPO, when using CD235a (Glycophorin A), as a marker for the detection of the erythroid cell lineage.

Ki67 cellular levels, a cell proliferation marker, was not altered between control and IS experiments. This indicated that IS did not affect proliferation in UT7/EPO. At 48h, at the clinically relevant concentration of IS (250 µM), we observed an increase of the cell phase cycle Sub-G1. The analysis of erythropoiesis related genes shows that HIF2α was deregulated with IS (250 µM). Finally, in the Epo-EpoR signalling pathway, we studied the activation of the Jak2/Stat5 proteins.

Results in human primary CD34+ cells confirmed the apoptotic effect of IS observed in UT7/EPO.

CONCLUSION: Our findings suggest that IS, a representative protein-bound uremic toxin, could affect cell viability, apoptosis and the cell cycle. This study suggests clues to develop new therapies for CKD-associated anemia.

Article original:

**Indoxyl Sulfate Impairs Erythropoiesis at BFU-E
stage in Chronic Kidney Disease**

<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2022.110583>

Indoxyl Sulfate Impairs Erythropoiesis at BFU-E stage in Chronic Kidney Disease

Eya Hamza ¹, Mercedes Vallejo-Mudarra ², Hakim Ouled-Haddou¹, Cristina García-Caballero ², Melania Guerrero-Hue ², Laure Santier¹, Sandra Rayego-Mateos³, Islam Amine LARABI ^{4,5}, Jean-Claude Alvarez ^{4,5}, Loïc Garçon^{1,6}, Ziad A Massy ^{7,8}, Gabriel Choukroun^{9,10}, Juan Antonio Moreno ^{2,11,12**}, Laurent Metzinger ^{1*,§}, Valérie Metzinger-Le Meuth^{1,13,**§}

¹ HEMATIM UR 4666, C.U.R.S, University of Picardie Jules Verne, CEDEX 1, 80025 Amiens, France.

² Maimonides Biomedical Research Institute of Cordoba (IMIBIC), UGC Nephrology, Hospital Universitario Reina Sofía, 14004 Córdoba, Spain.

³ Cellular Biology in Renal Diseases Laboratory. IIS-Fundación Jiménez Díaz-Universidad Autónoma Madrid, Spain.

⁴ Service de Pharmacologie-Toxicologie, Groupe Hospitalier Universitaires AP-HP, Paris-Saclay, Hôpital Raymond Poincaré, FHU Sepsis, 92380 Garches, France.

⁵ MasSpecLab, Plateforme de spectrométrie de masse, Inserm U-1173, Université Paris Saclay (Versailles Saint Quentin-en-Yvelines), France, 78180 Montigny-le Bretonneux, France.

⁶ Service d'Hématologie Biologique, Centre Hospitalier Universitaire, Amiens, France.

⁷ Centre for Research in Epidemiology and Population Health (CESP), University Paris-Saclay, University Versailles-Saint Quentin, Inserm UMRS 1018, Clinical Epidemiology Team, Villejuif, France.

⁸ Department of Nephrology, CHU Ambroise Paré, APHP, 92104 Boulogne Billancourt, Paris Cedex, France

⁹ Department of Nephrology Dialysis Transplantation, Amiens University Medical Center, F-80000 Amiens, France.

¹⁰ MP3CV Laboratory, EA7517, Jules Verne University of Picardie, F-80000 Amiens, France.

¹¹ Biomedical Research Networking Center on Cardiovascular Diseases (CIBERCV), 28029 Madrid, Spain.

¹² Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, University of Cordoba, 14014 Cordoba, Spain.

¹³ INSERM UMRS 1148, Laboratory for Vascular Translational Science (LVTS), UFR SMBH, University Sorbonne Paris Nord, 93000 Bobigny, France.

* Corresponding author: LM

** co-corresponding authors: VMLM and JAM

§: these authors contributed equally

Abstract.

Chronic kidney disease (CKD) is a global health condition characterized by a progressive deterioration of kidney function. It is associated with high serum levels of uremic toxins (UT), such as Indoxyl Sulfate (IS), which may participate in the genesis of several uremic complications. Anemia is one of the major complications in CKD patients that contribute to cardiovascular disease, increase morbi-mortality, and is associated with a deterioration of kidney failure in these patients. Our study aimed to characterize the impact of IS on CKD-related erythropoiesis. Using cellular and pre-clinical models, we studied cellular and molecular effects of IS on the growth and differentiation of erythroid cells. First, we examined the effect of clinically relevant concentrations of IS (up to 250 μ M) in the UT7/EPO cell line. IS at 250 μ M increased apoptosis of UT7/EPO cells at 48h compared to the control condition. We confirmed this apoptotic effect of IS in erythropoiesis in human primary CD34⁺ cells during the later stages of erythropoiesis. Then, in IS-treated human primary CD34⁺ cells and in a 5/6 nephrectomized (5/6 Nx) mice model, a blockage at the burst-forming unit-erythroid (BFU-E) stage of erythropoiesis was also observed. Finally, IS deregulates a number of erythropoietic related genes such as GATA-1, EPO-Receptor, and β -globin. Our findings suggest that IS could affect cell viability and differentiation of erythroid progenitors by altering erythropoiesis and contributing to the development of anemia in CKD.

Keywords: Indoxyl sulfate, erythropoiesis, chronic kidney disease, erythroid progenitors, anemia, apoptosis.

1. Introduction

Chronic kidney disease (CKD) is a worldwide health problem characterized by a progressive loss of kidney function [1]. It is a complex and systemic disease that develops over a long period of time associated with high serum levels of uremic toxins (UT). Progression of CKD involves several multisystemic pathologies including kidney fibrosis, inflammation, atherosclerosis, and potentially anemia [1]–[3]. Anemia may contribute to cardiovascular disease and increase morbi-mortality in CKD patients [4]. This condition is defined by a hemoglobin (HGB) concentration lower than 13 g/dL in men and 12 g/dL in women [2]. It has been reported that more than 90 percent of the individuals with end-stage kidney disease (ESKD) suffering from anemia have an erythropoietin (EPO) deficiency, and an ineffective erythropoiesis [5]. Erythropoiesis is activated by hypoxia and is tightly regulated by cytokines and, growth hormones, among others [6]. Accumulation of UT impairs kidney EPO synthesis, potentially compromising the growth and differentiation of erythroid cells in the bone marrow (BM) [7]. This in turn results in a decrease of red blood cells (RBC) production leading to CKD-associated anemia. However, other factors than EPO deficiency may affect uremic erythropoiesis.

Few molecular clues explain why erythropoiesis is affected in CKD and the potential role of UT in these abnormalities. A study suggested that circulating UT are inhibitors of erythropoiesis and thus contribute to CKD-related anemia [8]. Indoxyl Sulfate (IS), one of the most representative protein-bound UT, is derived from the tryptophan dietary metabolism and is difficult to remove by dialysis [9][10]. In mature RBC from healthy and dialyzed patients, Dias et al. have reported that IS increases oxidative stress and eryptosis (specific apoptosis of RBC), suggesting a role of this toxin in the pathogenesis of kidney anemia [11]. Apart from IS, other UT, such as para-cresyl sulfate (PCS) may also affect clinical parameters in CKD [4]. Apoptosis (including apoptosis-related protein caspase-3) has been shown to be involved in primitive hematopoietic stem cell differentiation, but no specific study was performed to study the impact of molecular mechanisms in erythroid stem cells *in vitro* and/or *in vivo* in a CKD-related context [12].

The current study aims to characterize the impact of IS and related UT on erythropoiesis. We evaluated the molecular effects of IS on the growth and the differentiation of RBC in an erythroid cell line, in primary CD34⁺ cell cultures, and in murine models of acute IS administration (IS mice) and 5/6 Nephrectomy (5/6 Nx).

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and Reagents

IS (Sigma-Aldrich) and PCS (Alsa Chim) were dissolved in phosphate-buffered saline (PBS). Cells were treated with different UT at uremic range serum concentrations of patients with CKD (IS: 125-250 μ M and PCS: 50-200 μ M) [13]. Cells were pretreated with the pan-caspase inhibitor q-VD-Oph hydrate (10 μ M) (Sigma) with potent antiapoptotic properties for 1 hour (h) before incubation with IS.

2.2 Cell lines culture and primary cell cultures

• Cell Lines

The UT7/EPO cell line (RRID: CVCL_5202), a human leukemic cell line, was used as a model of EPO-driven proliferation and cultured in α -minimum essential medium (α -MEM) (Dominique Dutscher), supplemented with 10% of fetal calf serum (FCS) (Eurobio), 1% penicillin-streptomycin (Biowest) and 2 UI/mL recombinant human EPO (rhEPO, epoetin beta) [14]. The human erythroleukemia cell lines K562 (RRID: CVCL_0004) and HEL (RRID: CVCL_0001) were used as models of hematopoietic differentiation. They were cultured in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI 1640) containing 10% FCS and 1% penicillin-streptomycin. The cells were incubated for 24/48h with UT at various concentrations. To study protein expression, UT7/EPO cells were EPO-starved in a culture medium without FCS for 16h overnight (ON). Then, cells were pretreated with or without IS (250 μ M) for 1h before EPO (10 UI/mL for 10 min and 2 UI/mL for 24h) stimulation. We used cells from passage 7 to 10 and all cells were passed regularly every 3–4 days (D). Cells were grown under standard cell culture conditions (at 37°C in 5% CO₂).

• Primary cell cultures

Human hematopoietic cells were obtained from mobilized peripheral blood after patients' informed consent according to Helsinki protocol [14]. This study followed French legislation in terms of non-interventional research. Human primary CD34⁺ cells were isolated by magnetic microbeads (purity > 94 $\pm$ 3%) on MACS columns (AutoMACS Separator) [14]. To induce the erythroid differentiation, CD34⁺ cells were cultured in supplemented Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (Biochrom, Merck-Millipore) containing 2 UI/mL unfractionated heparin, 5% human plasma (gift from Etablissement Français du Sang, EFS), 10 μ g/mL human recombinant insulin (Sigma-Aldrich), 1% penicillin-streptomycin (PANTM-Biotech), 330 μ g/mL human holo-transferrin (Sigma-Aldrich). The expansion procedure, as described by Giarratana et al. [15], was performed following sequential cytokine stimulation added to the media: rhEPO (3 UI/mL), human stem cell factor (hSCF 100 ng/mL, Miltenyi), recombinant human interleukin-3 (rhIL-3, Miltenyi), and dexamethasone (DXM 10⁻⁶M, Sigma-Aldrich) from D0 to D7. DXM and rhIL-3 were removed at D7, hSCF was removed at D10, and EPO was maintained till the end of the culture. CD34⁺ cells were treated with 250 μ M of IS at D4, D7, D10 and D14, corresponding to the days of culture medium changes. Erythroid differentiation was followed using flow cytometry and May-Grünwald-Giemsa (MGG) staining using standard procedure.

2.3 Animal models

To study short-term exposure to IS, male C57BL/6 mice (ten-week-old) were intraperitoneally injected (i.p.) with IS (400 mg/kg/day for 5 days, n=5) or a potassium chloride solution (KCl) as control (n=3) [16] (**Supp figure 1**). Mice were sacrificed 4h after the last injection of IS or KCl. In a second model, male C57BL/6 mice (ten-week-old) underwent 5/6 Nx by a two-step surgery with minor modifications [17] (n=8) (**Supp figure 1**). In step one of the surgery, 2/3 of the left kidney (the upper and lower poles) were ligated. In step two of the surgery, which was performed one week later, the right kidney was removed. Six weeks after induction of CKD, all mice were

sacrificed. Control mice (n=7) didn't undergo surgery. All experiments were performed in accordance with the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and were approved by the local Institutional Animal Care and Use Committee of Cordoba University (17/03/2022/041). Blood samples were drawn *via* cardiac puncture during the sacrifice. Serum creatinine, urea levels, and other blood parameters were measured at the Biochemistry Laboratory of the Animal Research Facilities at Cordoba University Spain. Serum EPO levels were detected by Mouse Erythropoietin Immunoassay kit Quantikine® ELISA (R&D Systems). IS serum quantification was carried out in collaboration with the Laboratory of Pharmacology-Toxicology in Hôpital Raymond-Poincaré, France.

Mouse Stem Cells were isolated from BM (femur and tibia) [18]. BD Stemflow™ Mouse Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Isolation Kit were performed to identify the hematopoietic progenitors in mouse BM by flow cytometry (FACS) by using a lineage negative (Lin⁻) marker. The lineage antibody cocktail includes CD3, CD45R, Ly6C, Ly6G, CD11B, and TER-119. From the Lin⁻, we examined a small sub-population of BM Lin⁻ cells: the c-kit⁺, Sca-1⁺, Lin⁻ (KSL⁻) cells. The classical KSL⁻ cell surface markers in BM represent the hematopoietic progenitor cells (HPCs) and hematopoietic stem cells (HSCs) from BM. Murine erythroid progenitors from BM were cultivated using a modified serum-free erythroid proliferation medium (SFEM, Stem Cell Technologies) plus 100 ng/mL recombinant murine stem cell factor (rmSCF), and 2 UI/mL rhEPO as described by Dolzning et al. [19].

2.4 Flow cytometry

Flow cytometry was performed to analyze cell surface phenotype, cell death, and the cell cycle distribution. For phenotype analysis of the UT7/EPO cell line, CD235a (Glycophorin A, GPA) was used as an erythroid cell surface marker (**Supp figure 2**). For cell surface phenotyping of HEL and K562, we used CD235a, CD71 (transferrin receptor 1) expressed in erythroid cells, and CD41a (megakaryocyte marker) (**Supp figure 2**). Human primary CD34⁺ cells were isolated and studied at distinct stages of development to study the process of erythropoiesis (**Supp figure 3A**). For phenotype analysis of human primary cell cultures, 1×10⁵ cells were stained with antibodies including anti-CD235a, CD71, CD34, CD36, CD123 (IL3) (Miltenyi) and 7AAD (BD Pharmingen™) (**Suppl. Table 1**). Human burst-forming unit-erythroid (BFU-E) and colony-forming unit-erythroid (CFU-E) stages were characterized with CD123⁻/GPA⁻/CD34⁺/CD36⁻/CD71^{low} and CD123⁻/GPA⁻/CD34⁻/CD36⁺/CD71^{high} (Miltenyi), respectively. For cell surface phenotyping of murine HSCs, monoclonal antibodies against c-kit, CD45, TER-119, CD71 and 7AAD anti-mouse were used (**Supp figure 3B**). Murine BFU-E and CFU-E stages were characterized as c-kit⁺/CD45⁺/TER-119⁻/CD71^{low} and c-kit⁺/CD45⁻/TER-119⁻/CD71^{high} (Miltenyi), respectively. Murine proerythroblasts (Pro-E) stage and terminally differentiated erythroid cells were characterized by c-kit⁻/CD45⁻/TER-119^{med}/CD71^{high} and c-kit⁻/CD45⁻/TER-119^{high}/CD71⁻, respectively.

DAPI and annexin V (APC) staining assays were used to examine apoptotic cell death. 1×10⁵ cells were washed twice with cold PBS and then resuspended in 100 µL of 1X Binding Buffer. Annexin V and DAPI were added to 1×10⁵ cells, gently mixed and incubated for 15 minutes (min) at room temperature in the dark. After 15 min incubation, 400 µL of 1X Binding Buffer were added to each tube.

Serum starvation was used to induce cell cycle synchronization by an arrest at G0/G1 stage. For cell cycle distribution, UT7/EPO cells were treated with IS (250 µM) for 48h. 1×10⁶ cells were centrifuged at 300 g for 5

min and fixed drop by drop in 70% ice-cold ethanol at 4°C ON. The cells were washed in PBS and suspended in 200 µL of PBS containing DAPI and 50 µg/mL RNase A. Cells were incubated in darkness for 30 min at room temperature and then analyzed by flow cytometry.

The acquisition of cells was realized with a MacsQuant 8-colors flow cytometer (Miltenyi) and Data analysis was performed using FlowJo software (Treestar). Characteristics and references of antibodies used for flow cytometry are described in the **Suppl. Table 1**.

2.5 Reverse Transcription-qPCR (RT-qPCR)

Total RNA was extracted with the miRNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. The quantity and quality of the RNA were assessed with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop). cDNA templates were prepared after RT using high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems) from 10 ng/µL of total RNA. SYBR Green-based qPCR was then performed using specific primers indicated at the **Suppl. Table 2**. RT-qPCR reactions were performed in triplicate, using 5 µL SYBR Green® qPCR Master Mix (2X), 3,2 µL RNase free water, 0,5 µL Forward Primer (20X), 0,5 µL Reverse Primer (20X), and 0,8 µL diluted RT product per reaction. Cycling conditions were as follows: 1 cycle at 95 °C for 2 min, 40 cycles at 95 °C for 15 seconds (s), 60°C for 1 min. The $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method has been used to calculate the relative expression of described genes with GAPDH serving as an endogenous control.

2.6 Western Blotting

Approximately 1×10^6 stimulated cells (IS 250 µM) were harvested and lysed with RIPA lysis buffer in the presence of protease and phosphatase inhibitors (Sigma). After incubation on ice for 30 min, the lysates were sonicated for 10 s on ice and then were centrifuged at 300 g and 4°C for 30 min. After centrifugation, the cleared cell lysates were collected and protein concentrations were measured by the Bradford assay (Bio-rad, Hercules, CA, USA). The whole-cell extracts were frozen until use. Equal amounts of protein (30 µg) were diluted with Laemmli sample buffer and heated at 95°C, for 5 min, then cooled to room temperature before electrophoresis in Tris-Glycine buffer (Thermo Fisher scientific) onto 10 to 15% SDS-PAGE gel. Then, samples were transferred to Nitrocellulose membranes (Sigma-Aldrich). After blocking for 1h with 5% non-fat dry milk in TBS -Tween 0.1% buffer, membranes were incubated at 4°C ON with primary antibodies diluted in 5% (w/v) non-fat dry milk TBS-Tween 0.1% for non-phospho antibody or 5% (w/v) BSA TBS-Tween 0.1% for phospho antibody listed in **Suppl. Table 3**. The secondary antibodies were all diluted at 1:3000 in their respective blocking buffer and incubated for 1h at room temperature. Membranes were washed three times with TBS-Tween 0.1% for 10 min per wash. Finally, blots were visualized with chemiluminescent reagents (SuperSignal Pico, ThermoFisher Scientific) using a ChemiDoc Universal HoodII device (Bio-rad) and band intensity was analyzed with ImageJ software (NCBI).

2.7 Statistical Analysis

Experiments were repeated at least three times and all results were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). Comparisons between groups were performed using the Kruskal-Wallis test and a comparison of two groups was done by Mann–Whitney U test. Statistical analysis and graphic presentation were performed with GraphPad Prism (version 6.01; GraphPad Software). Differences were considered significant starting with $p < 0.05$ (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

3. Results

UT7/EPO cells, a model of erythropoiesis, were treated with different concentrations of the IS (125 and 250 μ M). Apoptosis-mediated cell death was evaluated by flow cytometry. Other types of cell death (e.g. necrosis) were not observed (data not shown). Administration of IS (250 μ M) for 48h induced apoptosis in UT7/EPO cells (8,49 % vs 4,22 %) but not at 24h (**Figure 1A**). To confirm these findings, cells were pre-treated with q-VD, a pan-caspase inhibitor. Q-VD decreased IS-mediated apoptosis (6,67 % vs 10,32 %) (**Figure 1B**). Cell cycle distribution showed a significant higher proportion of Sub-G1 fraction when cells were treated with IS (250 μ M) compared to control (11,21 % vs 5,65 %) (**Figure 1C**). No significant differences on apoptosis were observed after stimulation with PCS (**Figure 1D**) nor with PCS and IS both combined (100 μ M and 250 μ M, respectively) (**Figure 1E**). Therefore, for further experiments, the concentration of 250 μ M of IS was selected. We next decided to confirm these results in other cell lines reflecting erythropoiesis. IS (250 μ M) increased significantly apoptosis in HEL cells (**Figure 1F**) at 24h (6,14 % vs 3,67 %) and 48h (5,59 % vs 2,76 %), but did not affect apoptosis in K562 cells (**Figure 1G**). We next determined the expression of proteins implicated in apoptosis by Western Blot. The expression of the anti-apoptotic Bcl-xL was significantly decreased (**Figure 1H**) and the expression of Cleaved Caspase 3 was significantly increased (**Figure 1I**) in IS-stimulated UT7/EPO compared to control.

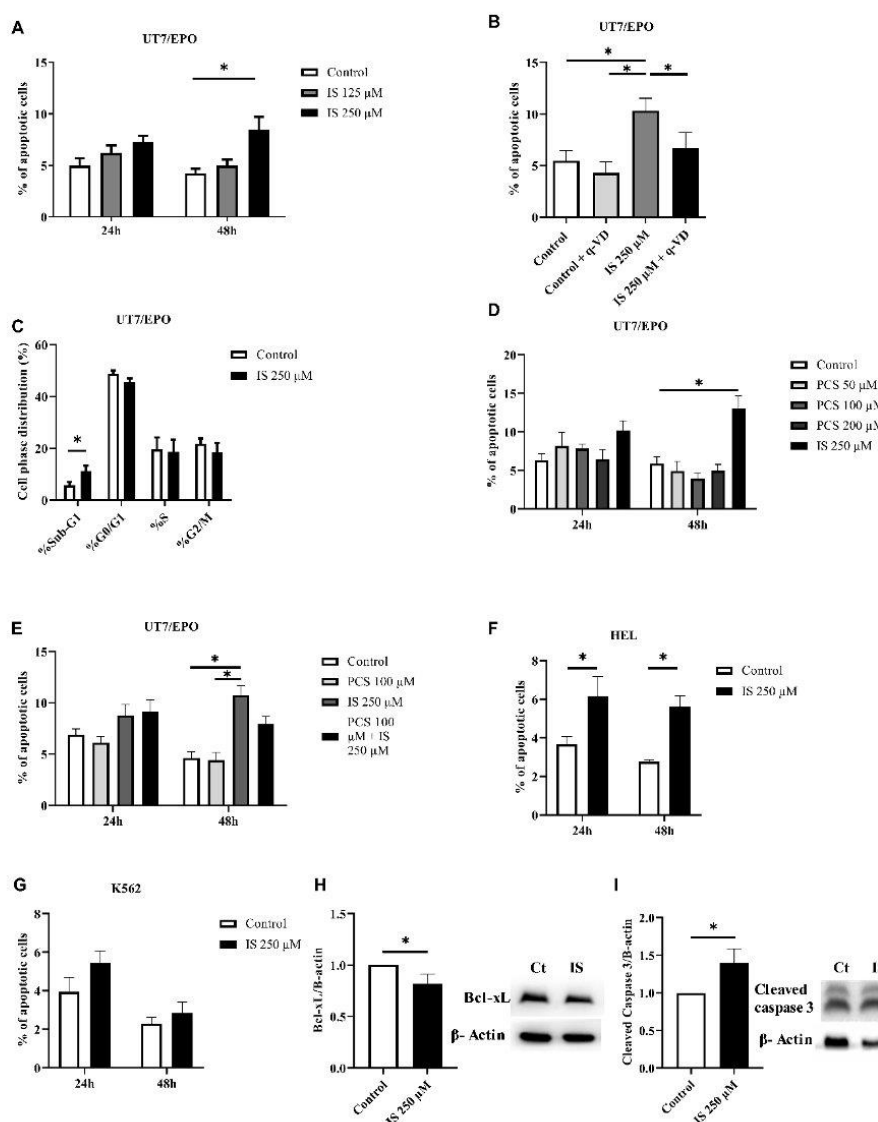


Figure 1. UT induce apoptosis in erythropoietic cell lines. (A) Flow cytometry analysis of apoptotic cells (DAPI/Annexin V staining) in UT7/EPO cells after incubation with IS (0, 125, 250 μ M) for 24h and 48h (n=5). (B) Effect of the pan-caspase inhibitor q-VD (10 μ M) on apoptotic UT7/EPO cells in the absence or presence of IS (n=4). (C) Cell cycle progression per stage was analyzed by flow cytometry using DAPI staining (n=4). (D) Effect of PCS (0, 50, 100, 200 μ M) and IS (250 μ M) at 24h and 48h on UT7/EPO apoptosis (n=3). (E) Effect of PCS (100 μ M), IS (250 μ M) and both toxins at 24h and 48h on UT7/EPO apoptosis (n=3). (F) Effect of IS (250 μ M) at 24h and 48h on HEL apoptosis (n=4). (G) Effect of IS (250 μ M) at 24h and 48h on K562 apoptosis (n=4).

(H) Western blot analysis of Bcl-xL (30 kDa) (n=3). (I) Western blot analysis of Cleaved caspase 3 (17 kDa) (n=3). Values are indicated as mean $\pm$ SEM. The Mann-Whitney U test was used for statistical analysis. * $p < 0.05$. Abbreviations: UT, Uremic toxins; IS, Indoxyl Sulfate; PCS, Para-Cresyl Sulfate; h, hours.

CD235a (GPA) is expressed in erythroid precursor cells and is highly expressed in mature erythrocytes. Flow cytometry analysis in IS-treated UT7/EPO cells showed that this UT did not modify the percentage of the erythroid marker CD235a⁺ cells (**Figure 2A**). For cell surface phenotyping of HEL and K562, we used CD41a (used as a megakaryocyte marker). The HEL cell line highly expressed CD41a⁺, while the K562 cell line did not express it. In HEL or K562 cells, IS increased the percentage of CD41a⁺ cells as compared to control suggesting a change towards the megakaryocytic phenotype (**Figure 2B-C**).

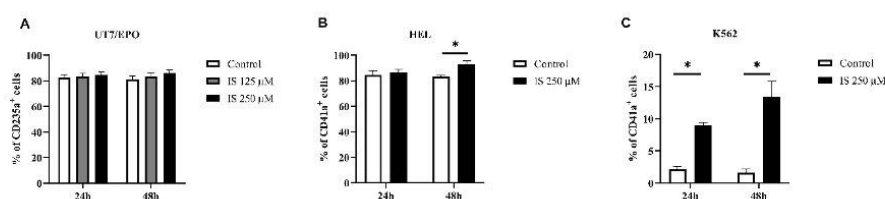


Figure 2. IS affects the phenotype in erythropoietic cell lines. (A) Flow cytometry analysis of CD235a⁺ cells (erythroid marker) in UT7/EPO cells after incubation with IS (0-250 μ M) for 24h and 48h (n=5). (B) Quantification of CD41a⁺ (megakaryocyte marker) positive cells after 24h and 48h of incubation in HEL cells with IS (250 μ M) (n=3). (C) Quantification of CD41a⁺ positive cells after 24h and 48h of incubation in K562 cells with IS (250 μ M) (n=3). Values are indicated as mean $\pm$ SEM. The Mann-Whitney U test was used for statistical analysis. * $p < 0.05$. Abbreviation: IS, Indoxyl Sulfate h, hours.

We next investigated whether the IS-mediated apoptotic effect in cell lines was also observed in human primary cells. For this, we used CD34⁺ human primary cells from healthy donors that were driven into erythroid differentiation as described in Caulier et al. [14]. Human CD34⁺ cells were incubated with IS from D4 to D14. Our data showed that IS decreased total cell number starting from D7 to D14 (**Figure 3A**). A significant increase of the percentage of apoptotic cells at D18 of incubation with IS (250 μ M) was observed when compared to control (50,23% vs 19,50%) (**Figure 3B**). To study the effect of IS on erythroid progenitors, we quantified BFU-E and CFU-E colonies by using flow cytometry. At D7 until D14, the percentage of BFU-E cells was markedly increased after stimulation with IS compared to control (14,94% vs 5,17% at D7, 10,06% vs 2,43% at D10, 3,94% vs 2,04% at D14, respectively) suggesting a blockage at the BFU-E stage (**Figure 3C**). Accordingly, the percentage of CFU-E cells was significantly decreased after stimulation with IS (250 μ M) compared to control (11,67% vs 21,75% at D7, 21,24% vs 42,46% at D10, 10,97% vs 23,37% at D14, respectively), confirming the blockage of the cells at the BFU-E stage (**Figure 3D**). To further characterize whether IS modifies the phenotype of CD34⁺ cells, we determined the expression of IL3 which is expressed in normal hematopoietic stem cells. IS increased the percentage of CD34⁺/CD123⁺ cells at D7 and at D14 (72,4% vs 25,3% at D7, 48,9% vs 27,48% at D14,

respectively) (**Figure 3E**) whereas decreased the percentage of CD235a⁺ cells compared to control condition (14,05% vs 27,07% at D10, 37,42% vs 55,15% at D14, respectively) (**Figure 3F**). To confirm that IS may be associated with early erythropoiesis we studied the expression of two transcription factors: GATA-1 and GATA-2 at D7. When treated with IS, the GATA-2/GATA-1 ratio was increased (**Figure 3G**). Then we performed MGG staining to evaluate whether IS maintained cells in an immature stage. The percentage of immature erythroid cells increased after stimulation with IS (72,5 % vs 57,75 %) (**Figure 3H**). Altogether our findings suggest that IS affects cell viability, delays the BFU-E to CFU-E transition and changes the phenotype during erythropoiesis in human primary CD34⁺ cells.

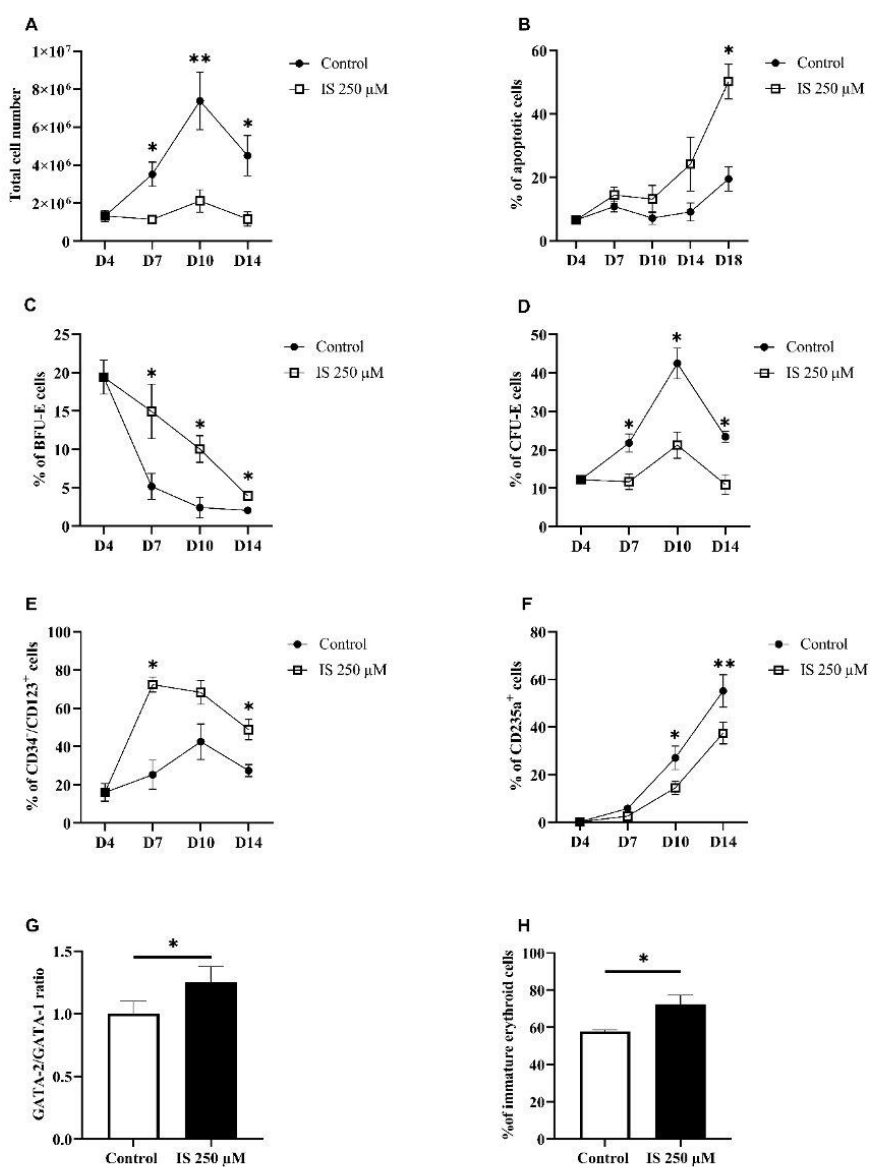


Figure 3. IS affects human CD34⁺ cells during *in vitro* erythropoiesis. (A) Enumeration of CD34⁺ cells stimulated with a combination of growth factors including hSCF, DXM, rhIL-3 and EPO at D4, D7, D10 and D14 in the presence or absence of IS at 250 μM (n=5). (B) Flow cytometric analysis of human CD34⁺ apoptotic cells treated with IS (250 μM) after D4, D7, D10, D14 and D18 (n=4). (C) Quantification of BFU-E colonies in human CD34⁺ treated with IS (250 μM) at D4, D7, D10 and D14 (n=4). (D) Quantification of CFU-E colonies in human CD34⁺

cells treated with IS (250 μ M) at D4, D7, D10 and D14 (n=4). (E) The percentage of CD34⁺/CD123⁺ cells was analyzed by flow cytometry in human CD34⁺ cells treated with IS (250 μ M) at D4, D7, D10 and D14 (n=4). (F) The percentage of CD235⁺ cells was analyzed by flow cytometry in the human CD34⁺ treated with IS (250 μ M) at D4, D7, D10 and D14 (n=4). (G) GATA2/GATA1 mRNA ratio in human CD34⁺ cells at D7 in the presence or absence of IS at 250 μ M (n=4). (H) Cytology count of immature erythroid cells in the presence or absence of IS at 250 μ M in Human CD34⁺ cells at D10 assessed by MGG staining (n=3). Values are indicated as mean $\pm$ SEM. The Mann-Whitney U test was used for statistical analysis. *p < 0.05, **p < 0.01. Abbreviations: IS, Indoxyl Sulfate; BFU-E, burst-forming unit-erythroid; CFU-E, colony-forming unit-erythroid; hSCF, human stem cell factor; DXM, dexamethasone; rhIL-3, recombinant human interleukin-3; EPO, Erythropoietin; MGG, May-Grünwald-Giemsa; D, Day.

We next analyzed the effects of IS on the erythropoiesis-related gene expression and on the EPO-EPO-Receptor (EPO-R) signaling pathway. Real-time RT-PCR analysis revealed a significant downregulation of GATA-1, GPA, CD71, Bcl-xL, EPO-R and EKLf in UT7/EPO cells treated with IS (**Figure 4A**). For the EPO-EPO-R signaling pathway, western blot analysis showed that the p-STAT5 a/b to STAT5 a/b ratio was significantly decreased after IS exposure as compared to control in the presence of EPO (**Figure 4B**). We tried to confirm the effect of IS on some of these results in erythroid progenitors in human primary CD34⁺ cells at D7. We observed a significant decrease in GPA, CD71, EPO-R, β -globin, STAT5a, EKLf, FOG 1, and JAK2 mRNA gene expression as well as an increase in PU.1 mRNA expression, which is involved in myeloid differentiation (**Figure 4C**).

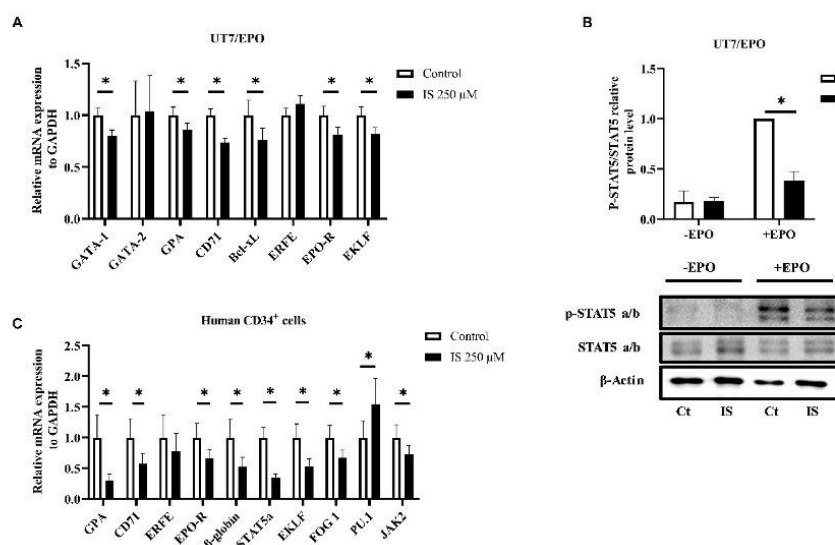


Figure 4. IS deregulates erythropoietic related genes and downregulates EPO-EPO-R signaling pathway. (A) Relative mRNA expression of erythropoietic related genes in UT7/EPO at 24h in the presence or absence of IS at 250 μ M (n=3). (B) UT7/EPO cells were deprived overnight and were pre-treated with or without IS (250 μ M) for

1h then restimulated with or without 10 UI/ml EPO for 10 min. The ratio of p-STAT5 a/b over total STAT5 a/b was quantified by Image Lab Software. Western blot images showing protein expression of p-STAT5 a/b, STAT5 a/b and β -Actin in UT7/EPO (n=3). (C) Relative mRNA expression to GAPDH of erythropoietic related genes in human CD34+ cells at D7 in the presence or absence of IS at 250 μ M (n=4). Values are indicated as mean $\pm$ SEM. The Mann-Whitney U test was used for statistical analysis. *p < 0.05. Abbreviations: EPO, Erythropoietin; EPO-R, EPO-Receptor; IS, Indoxyl Sulfate; GPA, Glycophorin A; ERFE, Erythroferrone; EKLF, erythroid-specific transcription factor; FOG-1, Friend Of GATA-1.

To further confirm our *in vitro* data, we performed two murine models of kidney damage, a model of acute and massive administration of IS with normal kidney function as well as a model of 5/6 Nx mice. As expected, IS-short term administration did not modify kidney function as indicated by creatinine and urea concentration (**Table 1**). However, induction of CKD in the 5/6 Nx mice model increased urea (105,76 mg/dL vs 61,07 mg/dL), creatinine (0,47 mg/dL vs 0,37 mg/dL), and blood urea nitrogen (BUN) concentrations (49,38 mg/dL vs 28,53 mg/dL) in the serum compared to control mice (**Table 1**). HGB concentration (12,22 g/dL vs 12,74 g/dL) and the percentage of Hematocrit (HCT) (36,35 % vs 37,85 %) were significantly decreased in 5/6 Nx mice (**Table 1**). In this model, the EPO seric level in this model was significantly increased compared to control mice (220,64 pg/mL vs 175,21 pg/mL). Also, IS levels in serum were significantly higher in 5/6 Nx mice compared with control mice (7680 ng/mL vs 5736,71 ng/mL equivalent to 30,56 μ M vs 22,82 μ M, respectively).

IS Mice	Control (n=3)	IS (400 mg/Kg) (n=5)	P
Creatinine (mg/dL)	0,35	0,38	0,3452
Urea (md/dL)	59,55	55,3	0,206
EPO (pg/mL)	125,1	178,54	0,21
IS (ng/mL)	2841,2	1974,8	0,51

5/6 Nx mice	Control (n=7)	5/6 Nx (n=8)	P
Creatinine (mg/dL)	0,37	0,47	0,0002
Urea (md/dL)	61,07	105,76	0,0002
BUN (mg/dL)	28,53	49,38	0,0002
RBC (10⁶/μL)	8,59	8,91	0,0637
WBC (10³/μL)	5,04	6,78	0,0103
HGB (g/dL)	12,74	12,22	0,0326
HCT (%)	37,85	36,35	0,0361
MCV (fL)	44,02	40,77	0,0002
MCH (pg)	14,82	13,72	0,0002
PLT (10³/uL)	542	949,75	0,0361
EPO (pg/mL)	175,21	220,64	0,02
IS (ng/mL)	5736,71	7680	0,03

Table 1. Blood and urinary parameters in IS mice and in 5/6 Nx model. In IS mice (400 mg/Kg), no significant difference was observed in serum creatinine levels and in serum urea levels compared to control mice (n=3/5). 5/6 Nx mice presented a significant increase of serum urea levels, of serum creatinine levels, and in serum BUN levels compared to control mice (n=7/8). There was no significant difference in RBC between 5/6 Nx mice and control mice (n=7/8). The concentration of HGB and the percentage of HCT was decreased significantly in 5/6 Nx mice compared to control mice (n=7/8). Also, EPO levels and IS levels in serum in this model were significantly increased compared to control mice (n=7/8). Values are indicated as mean +/- SEM. The Mann-Whitney U test was used for statistical analysis. Abbreviations: IS, Indoxyl Sulfate; EPO, erythropoietin; 5/6 Nx, 5/6 nephrectomy; BUN, Blood urea nitrogen; WBC, White Blood Cell, RBC, Red Blood Cell; HGB, Hemoglobin; HCT, Hematocrit; MCV, Mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin; PLT, Platelet.

To explore apoptosis and the erythroid progenitors, we isolated BM cells from mice of our experimental models. No significant change in the percentage of apoptotic cells in total BM was observed in IS mice compared to control mice (**Figure 5A**). In 5/6 Nx mice, the percentage of apoptotic cells in total BM was significantly increased compared to control mice at baseline (after sacrifice) (6,35% vs 5,22%) (**Figure 5B**). The subpopulation KSL⁺ represents the HPCs and HSCs from BM. In the IS mice model there was no significant change in the percentage of KSL⁺ cells as compared to control mice (**Figure 5C**). In the 5/6 Nx mice we observed an increase in the percentage of KSL⁺ compared to control mice at baseline (0,82% vs 0,62%) (**Figure 5D**). Taken together, our data suggest an increase of apoptosis in cells isolated from BM as well as a significant accumulation of KSL⁺ in 5/6 Nx mice that may be explained by a blockage of the HSCs and HPCs in the BM.

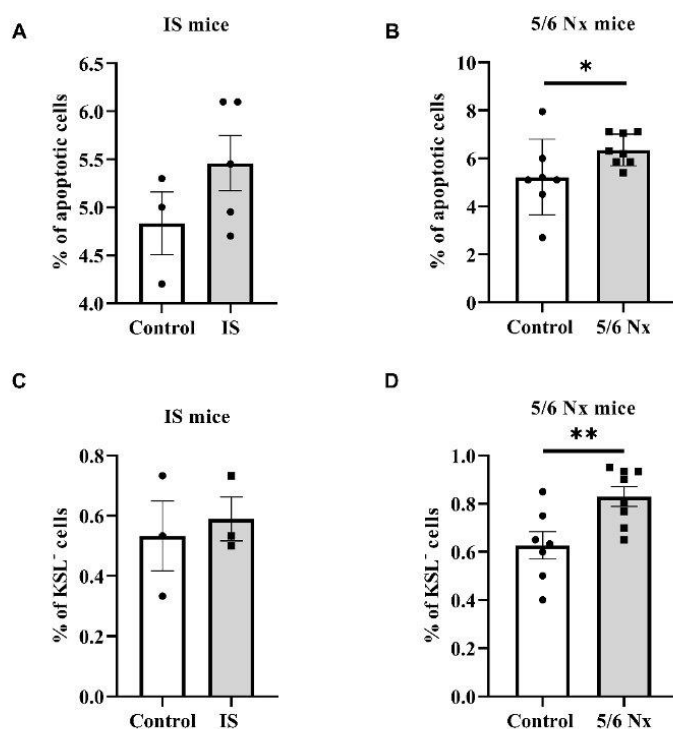


Figure 5. UT affect HSCs and HPCs toward the erythroid lineage in two mice models. (A) Flow cytometry analysis of apoptotic cells in total BM cells from control mice and IS mice (400 mg/Kg) at baseline (n=3/5). (B) Flow cytometry analysis of apoptotic cells in total BM cells from control mice and 5/6 Nx mice at baseline (n=7/8). The KSL⁺ sub-population of BM-Lin⁻ cells in BM represents the HPCs and HSCs. (C) Percentage of KSL⁺ in IS mice (400 mg/Kg) compared to control mice (n=3). (D) Percentage of KSL⁺ in 5/6 Nx mice compared to control mice (n=7/8). Values are indicated as mean $\pm$ SEM. The Mann-Whitney U test was used for statistical analysis. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Abbreviations: UT, Uremic toxins; BM, bone marrow; IS, Indoxyl Sulfate; 5/6 Nx, 5/6 nephrectomy; Lin⁻, lineage negative; KSL⁺, c-Kit⁺ Sca-1⁺ Lin⁻; HPCs, hematopoietic progenitor cells; HSCs, hematopoietic stem cells.

We evaluated the effect of UT on murine erythroid progenitors during *in vitro* erythropoiesis in cells extracted from BM. In the IS mice model, we found a significant decrease of the percentage of cultured BFU-E (0,13% vs 0,21%) 24h later (**Figure 6A**). In addition, these mice showed no change in the percentage of CFU-E and Pro-E compared to control mice (**Figure 6B,C**). However, we observed a significant decrease in the percentage of TER-119⁺ in IS mice compared to control mice (22,24% vs 26,82%) at baseline, suggesting that IS may affect terminally differentiated BM erythroid cells populations in this model (**Figure 6D**). In the 5/6 Nx model, a significant increase

in the percentage of BFU-E was observed at baseline (0,76% vs 0,44%) (**Figure 6E**) as well as a significant increase in the percentage of CFU-E at 24h (0,94% vs 0,31%) (**Figure 6F**). The percentage of Pro-E at baseline was significantly decreased in 5/6 Nx model (0,17% vs 0,32%) compared to control mice, whereas at 24h it was significantly increased (3,37% vs 1,53%) (**Figure 6G**). In 5/6 Nx model, the percentage of TER-119⁺ was significantly decreased at baseline (34,63% vs 42,29%) and at 24h (38,55% vs 54,29%) (**Figure 6H**) compared to control mice.

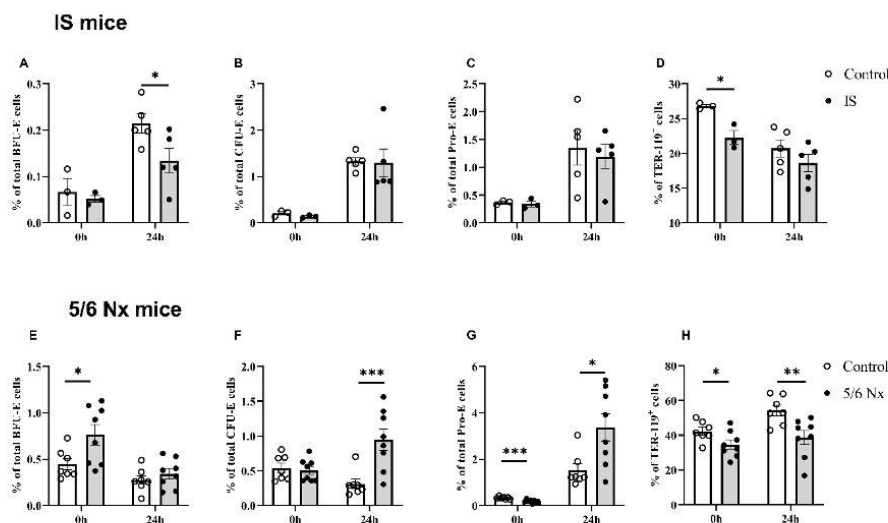


Figure 6. UT affects murine erythroid progenitors during *in vitro* erythropoiesis. The effect of UT on murine erythroid progenitors during *in vitro* erythropoiesis after cells were seeded using SFEM with cytokines (rmSCF and rhEPO). Murine BFU-E and CFU-E stages were characterized using respectively c-kit⁺/CD45⁺/Ter119⁺/CD71^{low} and c-kit⁺/CD45⁺/Ter119⁺/CD71^{high}. Murine Pro-E stage and terminally differentiated BM erythroid cells populations were characterized using respectively c-kit⁺/CD45⁺/Ter119^{med}/CD71^{high} and c-kit⁺/CD45⁺/Ter119^{high}/CD71⁺. (A) Percentage of BFU-E in IS mice (400 mg/Kg) compared to control mice (n=3/5). (B) Percentage of CFU-E in IS mice (400 mg/Kg) compared to control mice (n=3/5). (C) Percentage of Pro-E in IS mice (400 mg/Kg) compared to control mice (n=3/5). (D) Percentage of TER-119⁺ in IS mice (400 mg/Kg) compared to control mice (n=3/5). (E) Percentage of BFU-E in 5/6 Nx mice compared to control mice (n=7/8). (F) Percentage of CFU-E in 5/6 Nx mice compared to control mice (n=7/8). (G) Percentage of Pro-E in 5/6 Nx mice compared to control mice (n=7/8). (H) Percentage of TER-119⁺ in 5/6 Nx mice compared to control mice (n=7/8). Values are indicated as mean $\pm$ SEM. The Mann-Whitney U test was used for statistical analysis. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. Abbreviations: UT, Uremic toxins; IS, Indoxyl Sulfate; 5/6 Nx, 5/6 nephrectomy; SFEM, serum-free erythroid proliferation medium; BM, bone marrow; BFU-E, burst-forming unit-erythroid; CFU-E, colony-forming unit-erythroid; Pro-E, proerythroblast; rmSCF, recombinant murine stem cell factor; rhEPO, recombinant human erythropoietin; HSCs, hematopoietic stem cells.

4. Discussion

Our results show that IS affects erythropoietic cells at the progenitor stages of the RBC lineage, including the most precocious ones. Indeed, we demonstrated that IS affects cell viability and the differentiation of erythroid progenitors *in vitro* and *in vivo* inducing an alteration of erythropoiesis that may at least partly explain the genesis of anemia in CKD.

UT induce apoptosis in erythropoietic cell lines and human CD34⁺ cells during *in vitro* erythropoiesis

Performing flow cytometry technology, we studied UT impact, such as IS, on cell phenotype and apoptosis of erythropoietic cell lines. The UT7/EPO cell line was used as a model of EPO-driven proliferation whereas K562 and HEL were used as a model of differentiation. In the UT7/EPO cell line, the percentage of cells entering apoptosis doubled when cells were incubated with a clinically relevant dose of IS for 48h. The use of q-VD, an apoptosis inhibitor, confirmed that UT7/EPO cell death was due to apoptosis. Our findings further confirmed apoptosis by the increased proportion of Sub-G1 fraction in UT7/EPO cells treated with IS. IS has also been shown to increase apoptosis in other cell types such as osteoblasts [20], or kidney cells [21]. Our results are in line with a recent study that has shown that IS impairs *in vitro* erythropoiesis by triggering apoptosis [22]. In the comparable HEL cell line, the percentage of cells entering apoptosis increased at similar rates when the cells were incubated at 24h and 48h. On the other hand, in the K562 cell line, we observed a non-significant increase of apoptosis after 24h and 48h of treatment, due to anti-apoptotic Bcr-Abl oncogenic kinase already described [23]. Also, IS and PCS have been shown to accumulate in erythrocytes of hemodialyzed patients [24]. In our UT7/EPO model, PCS demonstrated no detectable effect. In addition, we found no additional effect of the two toxins on apoptosis, suggesting that IS is the main UT driver for CKD-induced anemia.

We next tried to confirm our results in a model of erythropoiesis, the human CD34⁺ primary cells driven towards the erythropoietic phenotype. Our CD34⁺ model confirmed the apoptotic effect of IS observed in cell lines as we found an increase in the percentage of cells in apoptosis (at D18). This suggests that cell death by apoptosis is combined with a decrease in cell proliferation. Additionally, the characterization of erythroid progenitors at different days of incubation suggests that IS may block the cells at the BFU-E stage. This may explain why we have observed at the same time an accumulation of BFU-E cells and a decrease of CFU-E cells. The same results were observed in the 5/6 Nx mice model as discussed later. These results suggest that IS induces a blockage of BFU-E cells as well as a decrease in cell proliferation leading to cell death by apoptosis. This is in concordance with the literature as BFU-E stage cells need EPO to proliferate [25], which may indicate that IS directly or indirectly inhibits EPO during the incubation time, as it has been reported UT7/EPO cells deprived of EPO die from apoptosis [26].

IS affects the phenotype in cell lines and induces a delay in human CD34⁺ cells during *in vitro* erythropoiesis

IS acts on the phenotype of HEL cells but especially on K562 cells when considering the expression of CD41a⁺. In normal condition, CD41a⁺ marker was not expressed in K562 cell line. This suggests that IS may induce changes

in the phenotype. We confirmed another change in the phenotype with the primary CD34⁺ cultures. We have examined the co-expression of CD123⁺ and CD34⁺ in primary human CD34⁺ cells because IL3-receptor (IL3-R) is supposed to be decreased during CD34⁺ cells differentiation [25]. As expected, IS induced a decrease of cells co-expressing CD34⁺/CD123⁺ suggesting that IS may induce a phenotypic switch towards the myeloid progenitors. Moreover, the low CD235a⁺ expression at terminal erythropoiesis observed in IS condition may result in a delay of erythroid differentiation after accumulation of BFU-E. Indeed, the increase of the GATA-2/GATA-1 ratio and the increase of immature erythroid cells with IS have confirmed that the cells are blocked at BFU-stage. Accordingly, GATA-2 is known to be expressed in HSCs, HPCs and BFU-E [27]. Taken together, our results suggest that IS induces a phenotype deviation, potentially leading to cellular apoptosis.

IS deregulates erythropoietic-related genes and downregulates the EPO-EPO-R signaling pathway

The increase of the GATA-2/GATA-1 ratio and the accumulation of immature erythroid cells with IS are in favor of genes associated with early erythropoiesis. Our hypothesis is that IS downregulated EPO-R signaling leading to deregulation of essential erythro-specific genes. Indeed, EPO-R mRNA expression is decreased in UT7/EPO with IS (250 μ M). A study on CKD rats has shown that kidney anemia is related to a decrease of EPO-R levels in BM [28]. Then, we focused our study on the central pathway of EPO-R signaling of the STAT-5 [29]. The role of STAT-5 in erythropoiesis regulation is important. It has been demonstrated that a knock-out of STAT-5 in mice fetuses induced fetal anemia and apoptosis on erythroid progenitors [30], [31]. In UT7/EPO, IS decreased EPO-R downstream activities of STAT-5 which may explain the apoptosis noted above.

The primary CD34⁺ model allowed us to look at the deregulated erythropoietic related genes by IS at an early stage of erythropoiesis since we confirmed an accumulation at the BFU-E stage. Most of the genes are known to be downregulated in anemia such as GPA (or TER-119), CD71, EKLF, GATA-1, GATA-2, β -Globin, and FOG 1 [32]–[36]. In the current study, we confirmed the deregulation of these genes in the human primary CD34⁺. The expression of erythro-specific genes (EPO-R, GPA, and β -globin) targeting GATA-1 were found to be decreased after IS treatment in primary cell culture. GATA-1 is important for the survival of erythroid progenitors by modulating several genes such as EKLF [37]. The latter is an essential erythroid-specific transcription factor that directly regulates the β -globin gene [38]. For example, homozygous EKLF^{-/-} mice during the embryonic stage of hematopoiesis develop fetal anemia [33]. Also, GATA-1 is known to be induced in the differentiation of BFU-E towards the CFU-E stage [39]. In our study, IS triggers the accumulation of BFU-E cells in CD34⁺ cells and 5/6 Nx mice in association with the downregulation of GATA-1. Accordingly, a study has shown that a down-modulation of GATA-1 is sufficient to convert BFU-E to CFU-GM (granulocyte-macrophage) progenitors and to enhance PU.1 expression [40]. Our study was limited to the effect of IS on erythroid differentiation. Nevertheless, our hypothesis, which needs to be confirmed by specific markers, speculates that there is a possible effect of IS on a phenotypic change in favor of a myeloid differentiation. We can thus hypothesize that IS prevents EPO from binding to its receptor altering the EPO-R signaling pathway thus by reducing the activation of the JAK-STAT pathway. In consequence, many genes are downregulated leading to a probable change of the cellular phenotype induced by IS. Thus, the cells do not have the adequate cytokines to grow potentially leading to death by apoptosis. Our results clearly demonstrate that IS prevents EPO-mediated erythropoiesis of BFU-E as an early event, by directly affecting erythroid cell development.

UT affects HSCs, HPCs and erythroid progenitors toward the erythroid lineage in two mice models

In our IS mice model, no changes in the urinary parameters were observed. The short-term exposure to IS confirms what was partly observed in CD34⁺ primary cultures where IS decreased the percentage of CD235a⁺ (terminal erythroid) cells. Kidney function in 5/6 Nx mice was compromised as shown by blood and urinary parameters. Moreover, this model allowed us to observe a beginning of anemia, one of the major complications observed on CKD. The hematological parameters suggested a development of anemia with a decrease of the HGB level and the HCT [41]. Cytometric analysis of different membrane markers confirmed this with the decrease of mature stage cells (TER-119⁺) as well as the decrease of Pro-E at baseline compared to the control group [41]. However, we observed an accumulation of cells at HSC and HPC stage after sacrifice.

In 5/6 Nx, the characterization of murine erythroid progenitors has shown an accumulation of cells at BFU-E stage as already found in primary human cells. Nevertheless, the serum EPO levels showed that 5/6 Nx mice had more EPO in their serum than control mice and despite this we still observed a blockage at the BFU-E stage. After the cells were grown for 24h in a medium supplemented with EPO and SCF, we noticed an increase of CFU-E cells due to the release of BFU-E cells. This could be a way to compensate the lack of EPO production in the kidney or a possible synergistic effect of both cytokines on the erythroid progenitor cells [42]. This release of BFU-E cells suggests that although serum EPO levels are high in 5/6 Nx mice compared to control mice, this is not sufficient to compensate the need for EPO to stimulate RBC production in the BM. Also, it is possible that UT prevent EPO from reaching the BM and thus from binding to its receptor as when cells were incubated, there were no UT in the medium besides EPO and SCF. A study demonstrated that the increase of EPO during CKD came from the liver to compensate the insufficient kidney EPO production from the kidneys [43]. The authors suggested that EPO synthesis from the liver cannot compensate fully for the deficient kidney EPO production. This is probably due to the maximal capacity of EPO production by the liver but also could be related to a shorter half-life of the produced EPO [43]. All these data suggest that IS inhibits the differentiation of BFU-E cells to CFU-E cells. This is may be related to a deficiency of EPO needs and/or related to a deregulation of EPO-R expression during the early stages of erythropoiesis. In consequence, all BFU-E cells would not reach the late stages of differentiation inducing a lack of mature erythroid differentiated cells.

The anemia in patients with CKD can be managed by the erythropoiesis-stimulating agents (ESA) [44]. One potential cause of ESA resistance is the accumulation of UT [45]. Despite ESA and iron supplementation, some patients with CKD do not achieve their target HGB levels. An alternative to correct the renal anemia are the hypoxia-inducible factor–prolyl hydroxylase inhibitors (HIF-PHIs) that reduce CKD progression [46]. Although ESA or HIF-PHIs improve the production of RBC, they do not improve RBC lifespan in patient with CKD [47]. A potential new therapeutic strategy is to target specifically IS from CKD patients using the oral absorbent AST-120. A study has shown that the association of AST-120 and ESA treatment have improved the hemoglobin levels [48] but without affecting the serum creatinine levels [49]. There is thus a need to develop more physiological and effective treatments for CKD-related anemia.

5. Conclusion

Anemia is a common feature of CKD that is associated with cardiovascular disease and poor clinical outcomes. Using a combination of *in vitro* and *in vivo* models, we suggest that IS is able to affect cell viability and cell differentiation in the erythroid lineage. The contribution of IS to the development of uremic anemia seems to be related to the erythroid progenitors, specifically at BFU-E stage, impairing differentiation into RBC and triggering apoptosis.

Acknowledgements:

The authors wish to acknowledge the Laboratory of Pharmacology-Toxicology in Hôpital Raymond-Poincaré, France for IS quantification by Isabelle Etting. We express our sincere thanks to Dr Thomas Boyer and to Cathy Gomila.

Statements & Declarations:

Funding

This work was supported by the Société Francophone de Néphrologie, Dialyse et Thérapeutique (SFNDT), by the Company Vifor Pharma and by the French Ministry of Research (MESRI) (E.H. PhD grant).

This research was funded by Instituto de Salud Carlos III (ISCIII, FIS-FEDER PI17/00130, PI20/00375) (Co-funded by European Regional Development Fund/European Social Fund “A way to make Europe”/“Investing in your future”), Consejería de Salud y Familias-FEDER, Junta de Andalucía (PIGE-0052-2020), and Spanish Society of Nephrology (SEN). The Spanish Ministry of Science and Innovation supported the salary of J.A.M. (RYC-2017-22369) (Co-funded by European Regional Development Fund/European Social Fund “A way to make Europe”/“Investing in your future”).

Competing Interests

ZAM reports grants for CKD-REIN and other research projects from Amgen, Baxter, Fresenius Medical Care, GlaxoSmithKline, Merck Sharp and Dohme-Chibret, Sanofi-Genzyme, Lilly, Otsuka and the French government, as well as fees and grants to charities from GlaxoSmithKline, Astra Zeneca, Boehringer Ingelheim, and Bayer; these sources of funding are not necessarily related to the content of the present manuscript. GC reports grants from Amgen, Vifor Pharma, GSK and Astellas (honorarium for consultancy and conferences). SRM reports a grant from Juan de la Cierva incorporation grant: IJC2018-035187-I. Other authors had nothing to disclose.

Author Contributions

EH, LG, HOH, JAM, VMLM and LM conceived and designed the study. EH, LS, MVM, JAM, CGC and MGH performed the experiments, analyzed and interpreted the data. Material preparation was performed by EH, JAM,

MVM, SRM, CGC, MGH, IAL, JCA and HOH. The first draft of the manuscript was written by EH, VMLM and LM. LG, HOH, ZAM, JAM and GC commented and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval

Human hematopoietic cells were obtained from mobilized peripheral blood after patients' informed consent according to Helsinki protocol. This study followed French legislation in terms of non-interventional research. All animal experiments were performed in accordance with the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and were approved by the local Institutional Animal Care and Use Committee of Cordoba University (17/03/2022/041).

Data availability statement.

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

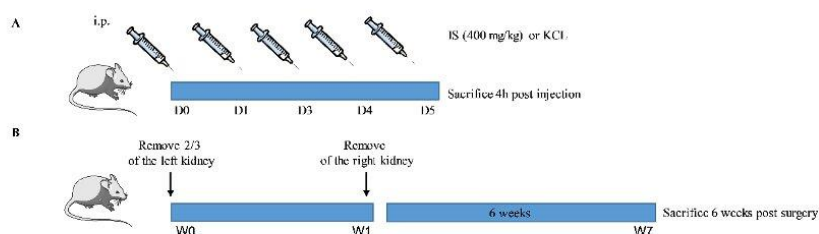
References

- [1] S. Liabeuf, T. B. Drüeke, et Z. A. Massy, « Protein-Bound Uremic Toxins: New Insight from Clinical Studies », *Toxins*, vol. 3, n° 7, p. 911-919, juill. 2011, doi: 10.3390/toxins3070911.
- [2] A. K. Agarwal, « Practical Approach to the Diagnosis and Treatment of Anemia Associated With CKD in Elderly », *Journal of the American Medical Directors Association*, vol. 7, n° 9, p. S7-S12, nov. 2006, doi: 10.1016/j.jamda.2006.09.005.
- [3] T. Addi, L. Dou, et S. Burtsey, « Tryptophan-Derived Uremic Toxins and Thrombosis in Chronic Kidney Disease », *Toxins (Basel)*, vol. 10, n° 10, Art. n° 10, 12 2018, doi: 10.3390/toxins10100412.
- [4] F. C. Barreto *et al.*, « Serum indoxyl sulfate is associated with vascular disease and mortality in chronic kidney disease patients », *Clin J Am Soc Nephrol*, vol. 4, n° 10, p. 1551-1558, oct. 2009, doi: 10.2215/CJN.03980609.
- [5] E. Hamza, L. Metzinger, et V. Metzinger-Le Meuth, « Uremic Toxins Affect Erythropoiesis during the Course of Chronic Kidney Disease: A Review », *Cells*, vol. 9, n° 9, Art. n° 9, sept. 2020, doi: 10.3390/cells9092039.
- [6] V. Cernaro *et al.*, « Erythropoiesis and chronic kidney disease-related anemia: From physiology to new therapeutic advancements », *Med Res Rev*, vol. 39, n° 2, p. 427-460, mars 2019, doi: 10.1002/med.21527.
- [7] A. Carmona, F. Guerrero, P. Buendia, T. Obrero, P. Aljama, et J. Carracedo, « Microvesicles Derived from Indoxyl Sulfate Treated Endothelial Cells Induce Endothelial Progenitor Cells Dysfunction », *Frontiers in Physiology*, vol. 8, 2017, Consulté le: 18 février 2022. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2017.00666>
- [8] J. L. Babitt et H. Y. Lin, « Mechanisms of anemia in CKD », *J Am Soc Nephrol*, vol. 23, n° 10, p. 1631-1634, oct. 2012, doi: 10.1681/ASN.2011111078.
- [9] G. Lano, S. Burtsey, et M. Sallée, « Indoxyl Sulfate, a Uremic Endotheliotoxin », *Toxins (Basel)*, vol. 12, n° 4, p. E229, avr. 2020, doi: 10.3390/toxins12040229.
- [10] F. C. Barreto *et al.*, « Serum indoxyl sulfate is associated with vascular disease and mortality in chronic kidney disease patients », *Clin J Am Soc Nephrol*, vol. 4, n° 10, Art. n° 10, oct. 2009, doi: 10.2215/CJN.03980609.
- [11] G. Dias *et al.*, « Indoxyl Sulfate, a Uremic Toxin, Stimulates Reactive Oxygen Species Production and Erythrocyte Cell Death Supposedly by an Organic Anion Transporter 2 (OAT2) and NADPH Oxidase Activity-Dependent Pathways », *Toxins*, vol. 10, n° 7, p. 280, juill. 2018, doi: 10.3390/toxins10070280.
- [12] V. Janzen *et al.*, « Hematopoietic stem cell responsiveness to exogenous signals is limited by caspase-3 », *Cell Stem Cell*, vol. 2, n° 6, p. 584-594, juin 2008, doi: 10.1016/j.stem.2008.03.012.
- [13] R. Vanholder *et al.*, « Review on uremic toxins: Classification, concentration, and interindividual variability », *Kidney International*, vol. 63, n° 5, p. 1934-1943, mai 2003, doi: 10.1046/j.1523-1755.2003.00924.x.
- [14] A. Caulier *et al.*, « PIEZO1 activation delays erythroid differentiation of normal and hereditary xerocytosis-derived human progenitor cells », *Haematologica*, vol. 105, n° 3, p. 610-622, mars 2020, doi: 10.3324/haematol.2019.218503.
- [15] M.-C. Giarratana *et al.*, « Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells », *Nat Biotechnol*, vol. 23, n° 1, Art. n° 1, janv. 2005, doi: 10.1038/nbt1047.
- [16] L. Dou *et al.*, « Aryl hydrocarbon receptor is activated in patients and mice with chronic kidney disease », *Kidney International*, vol. 93, n° 4, p. 986-999, avr. 2018, doi: 10.1016/j.kint.2017.11.010.
- [17] X. Wang, M. A. Chaudhry, Y. Nie, Z. Xie, J. I. Shapiro, et J. Liu, « A Mouse 5/6th Nephrectomy Model That Induces Experimental Uremic Cardiomyopathy », *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, n° 129, p. e55825, nov. 2017, doi: 10.3791/55825.

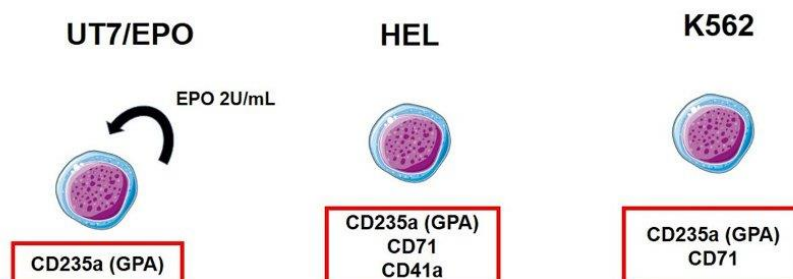
- [18] D. N. Haylock *et al.*, « Hemopoietic Stem Cells with Higher Hemopoietic Potential Reside at the Bone Marrow Endosteum », *STEM CELLS*, vol. 25, n° 4, p. 1062-1069, 2007, doi: 10.1634/stemcells.2006-0528.
- [19] H. Dolznig *et al.*, « Erythroid progenitor renewal versus differentiation: genetic evidence for cell autonomous, essential functions of EpoR, Stat5 and the GR », *Oncogene*, vol. 25, n° 20, p. 2890-2900, mai 2006, doi: 10.1038/sj.onc.1209308.
- [20] Y.-H. Kim, K.-A. Kwak, H.-W. Gil, H.-Y. Song, et S.-Y. Hong, « Indoxyl sulfate promotes apoptosis in cultured osteoblast cells », *BMC Pharmacol Toxicol*, vol. 14, p. 60, déc. 2013, doi: 10.1186/2050-6511-14-60.
- [21] R. J. Ellis *et al.*, « Indoxyl Sulfate Induces Apoptosis and Hypertrophy in Human Kidney Proximal Tubular Cells », *Toxicol Pathol*, vol. 46, n° 4, p. 449-459, juin 2018, doi: 10.1177/0192623318768171.
- [22] T. Duangchan *et al.*, « Indoxyl sulfate impairs in vitro erythropoiesis by triggering apoptosis and senescence », *Exp Biol Med (Maywood)*, p. 15353702221097320, mai 2022, doi: 10.1177/15353702221097320.
- [23] M.-J. Kim *et al.*, « Sensitization of human K562 leukemic cells to TRAIL-induced apoptosis by inhibiting the DNA-PKcs/Akt-mediated cell survival pathway », *Biochem Pharmacol*, vol. 78, n° 6, p. 573-582, sept. 2009, doi: 10.1016/j.bcp.2009.05.016.
- [24] O. Deltombe, G. Glorieux, S. Marzouki, R. Masereeuw, D. Schneditz, et S. Eloot, « Selective Transport of Protein-Bound Uremic Toxins in Erythrocytes », *Toxins (Basel)*, vol. 11, n° 7, p. E385, juill. 2019, doi: 10.3390/toxins11070385.
- [25] J. Li *et al.*, « Isolation and transcriptome analyses of human erythroid progenitors: BFU-E and CFU-E », *Blood*, vol. 124, n° 24, p. 3636-3645, déc. 2014, doi: 10.1182/blood-2014-07-588806.
- [26] M. Mori *et al.*, « Activation of extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 induces Bcl-xL up-regulation via inhibition of caspase activities in erythropoietin signaling », *J Cell Physiol*, vol. 195, n° 2, p. 290-297, mai 2003, doi: 10.1002/jcp.10245.
- [27] T. Moriguchi et M. Yamamoto, « A regulatory network governing Gata1 and Gata2 gene transcription orchestrates erythroid lineage differentiation », *Int J Hematol*, vol. 100, n° 5, p. 417-424, nov. 2014, doi: 10.1007/s12185-014-1568-0.
- [28] D. Landau, L. London, I. Bandach, et Y. Segev, « The hypoxia inducible factor/erythropoietin (EPO)/EPO receptor pathway is disturbed in a rat model of chronic kidney disease related anemia », *PLoS One*, vol. 13, n° 5, p. e0196684, 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0196684.
- [29] M. A. Kerenyi *et al.*, « Stat5 regulates cellular iron uptake of erythroid cells via IRP-2 and TfR-1 », *Blood*, vol. 112, n° 9, p. 3878-3888, nov. 2008, doi: 10.1182/blood-2008-02-138339.
- [30] M. Socolovsky, A. E. Fallon, S. Wang, C. Brugnara, et H. F. Lodish, « Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a^{-/-}5b^{-/-} mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction », *Cell*, vol. 98, n° 2, p. 181-191, juill. 1999, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81013-2.
- [31] M. Socolovsky, H. Nam, M. D. Fleming, V. H. Haase, C. Brugnara, et H. F. Lodish, « Ineffective erythropoiesis in Stat5a^{-/-}5b^{-/-} mice due to decreased survival of early erythroblasts », *Blood*, vol. 98, n° 12, p. 3261-3273, déc. 2001, doi: 10.1182/blood.v98.12.3261.
- [32] M. H. Baron, A. Vacaru, et J. Nieves, « Erythroid development in the mammalian embryo », *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, vol. 51, n° 4, p. 213-219, déc. 2013, doi: 10.1016/j.bcmd.2013.07.006.
- [33] B. Nuez, D. Michalovich, A. Bygrave, R. Ploemacher, et F. Grosveld, « Defective haematopoiesis in fetal liver resulting from inactivation of the EKLf gene », *Nature*, vol. 375, n° 6529, p. 316-318, mai 1995, doi: 10.1038/375316a0.
- [34] T. Fujiwara, « GATA Transcription Factors: Basic Principles and Related Human Disorders », *Tohoku J Exp Med*, vol. 242, n° 2, p. 83-91, juin 2017, doi: 10.1620/tjem.242.83.
- [35] A. Cao et P. Moi, « Regulation of the Globin Genes », *Pediatr Res*, vol. 51, n° 4, Art. n° 4, avr. 2002, doi: 10.1203/00006450-200204000-00003.
- [36] T. Nakanishi, T. Kimura, et T. Kuragano, « The Hpcidin-Anemia Axis: Pathogenesis of Anemia in Chronic Kidney Disease », *Contrib Nephrol*, vol. 198, p. 124-134, 2019, doi: 10.1159/000496636.

- [37] « Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1 | Nature ». <https://www.nature.com/articles/349257a0> (consulté le 6 juin 2022).
- [38] A. W. DeVilbiss, N. Tanimura, S. C. McIver, K. R. Katsumura, K. D. Johnson, et E. H. Bresnick, « Chapter Seven - Navigating Transcriptional Coregulator Ensembles to Establish Genetic Networks: A GATA Factor Perspective », in *Current Topics in Developmental Biology*, vol. 118, E. H. Bresnick, Éd. Academic Press, 2016, p. 205-244. doi: 10.1016/bs.ctdb.2016.01.003.
- [39] X. Gao *et al.*, « TGF- β inhibitors stimulate red blood cell production by enhancing self-renewal of BFU-E erythroid progenitors », *Blood*, vol. 128, n° 23, p. 2637-2641, déc. 2016, doi: 10.1182/blood-2016-05-718320.
- [40] A. T. J. Wierenga, E. Vellenga, et J. J. Schuringa, « Down-regulation of GATA1 uncouples STAT5-induced erythroid differentiation from stem/progenitor cell proliferation », *Blood*, vol. 115, n° 22, p. 4367-4376, juin 2010, doi: 10.1182/blood-2009-10-250894.
- [41] « Inhibition of fibroblast growth factor 23 (FGF23) signaling rescues renal anemia - Agoro - 2018 - The FASEB Journal - Wiley Online Library ». <https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1096/fj.201700667R> (consulté le 3 juin 2022).
- [42] J. Wang *et al.*, « Synergistic effect of cytokines EPO, IL-3 and SCF on the proliferation, differentiation and apoptosis of erythroid progenitor cells », *Clin Hemorheol Microcirc*, vol. 37, n° 4, p. 291-299, 2007.
- [43] S. de Seigneux, A.-K. M. Lundby, L. Berchtold, A. H. Berg, P. Saudan, et C. Lundby, « Increased Synthesis of Liver Erythropoietin with CKD », *J Am Soc Nephrol*, vol. 27, n° 8, p. 2265-2269, août 2016, doi: 10.1681/ASN.2015050508.
- [44] D. W. Coyne, « Use of Epoetin in Chronic Renal Failure », *JAMA*, vol. 297, n° 15, p. 1713-1716, avr. 2007, doi: 10.1001/jama.297.15.1713.
- [45] F. Locatelli et R. Minutolo, « Intestinal adsorption of uraemic toxins: a new strategy for anaemia management? », *Nephrology Dialysis Transplantation*, vol. 29, n° 9, p. 1620-1624, sept. 2014, doi: 10.1093/ndt/gfu102.
- [46] Z. A. Massy et T. B. Drueke, « The evolving science of anemia management in chronic kidney disease », *Kidney International Supplements*, vol. 11, n° 1, p. 1-2, avr. 2021, doi: 10.1016/j.kisu.2020.11.002.
- [47] T. B. Drüeke et Z. A. Massy, « Role of proteinuria in the anemia of chronic kidney disease », *Kidney International*, vol. 100, n° 6, p. 1160-1162, déc. 2021, doi: 10.1016/j.kint.2021.09.016.
- [48] I.-W. Wu, K.-H. Hsu, C.-Y. Sun, C.-J. Tsai, M.-S. Wu, et C.-C. Lee, « Oral adsorbent AST-120 potentiates the effect of erythropoietin-stimulating agents on Stage 5 chronic kidney disease patients: a randomized crossover study », *Nephrology Dialysis Transplantation*, vol. 29, n° 9, p. 1719-1727, sept. 2014, doi: 10.1093/ndt/gfu061.
- [49] G. Schulman, R. Agarwal, M. Acharya, T. Berl, S. Blumenthal, et N. Kopyt, « A Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Dose-Ranging Study of AST-120 (Kremezin) in Patients With Moderate to Severe CKD », *American Journal of Kidney Diseases*, vol. 47, n° 4, p. 565-577, avr. 2006, doi: 10.1053/j.ajkd.2005.12.036.

Supplemental material



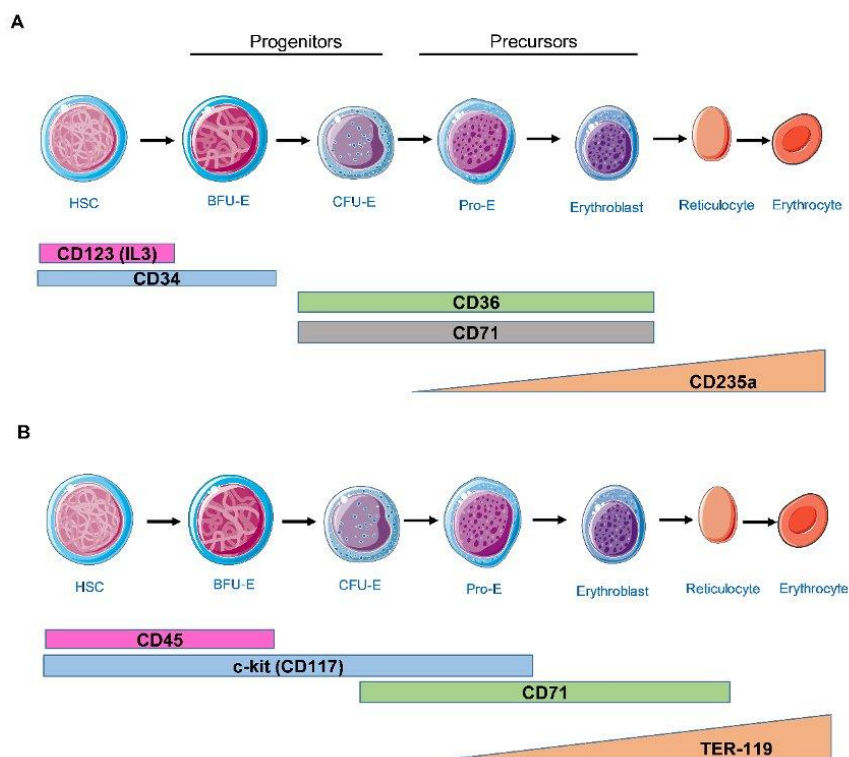
Supplemental Figure 1. Animal models. (A) To study short-term exposure to IS, male mice (ten-week-old) were injected i.p. daily with IS (400 mg/kg for 5 days) or KCl as control. The control mice (n=3) received daily KCl injections at the same volume as the experimental IS-treated mice (n=5) for 5 days. Mice were sacrificed 4h after the last injection of IS. (B) To model CKD, male C57BL/6 mice underwent 5/6 Nx by a two-step surgery with minor modifications (n=8). In step one of the surgery, 2/3 of the left kidney (the upper and lower poles) were ligated. In step two of the surgery, which was performed one week later, the right kidney was removed. Six weeks after induction of CKD in mice, all mice were sacrificed at 16-weeks of age. The control mice (n=7) are healthy mice which had no surgery. Abbreviations: IS, Indoxyl Sulfate; KCl, potassium chloride; i.p., intraperitoneal; 5/6 Nx, 5/6 Nephrectomy; CKD, chronic kidney disease; D, day ; W, week; h, hours.



Supplemental Figure 2. Cellular membrane markers of UT7/EPO, HEL and K562 cell lines.

UT7/EPO cell line was cultured in an EPO-containing medium and express high CD235a (GPA). HEL cell line highly express high levels of CD235a, CD71 and CD41a. K562 cell line express high levels of CD235a and CD71.

Abbreviation: EPO, Erythropoietin.



Supplemental Figure 3. Overview of erythropoiesis. Stages of erythropoiesis and cluster of differentiation are indicated. (A) Human BFU-E and CFU-E stages were characterized respectively with CD123⁺/GPA⁻/CD34⁺/CD36⁻/CD71^{low} and CD123⁺/GPA⁻/CD34⁺/CD36⁺/CD71^{high}. (B) Murine BFU-E and CFU-E stages were characterized respectively using c-kit⁺/CD45⁺/Ter119⁻/CD71^{low} and using c-kit⁺/CD45⁺/Ter119⁻/CD71^{high} (Miltenyi). Murine proerythroblasts (Pro-E) stage and terminally differentiated erythroid cells were characterized using respectively c-kit⁺/CD45⁺/Ter119^{med}/CD71^{high} and c-kit⁺/CD45⁺/Ter119^{high}/CD71⁻. Abbreviations : HSC, hematopoietic stem cell; BFU-E, burst-forming unit-erythroid; CFU-E, colony-forming unit-erythroid; Pro-E, proerythroblasts.

Supplemental table 1. Characteristics and references of antibodies used for flow cytometry.

Target molecule	Host species	Clone	Dilution	Conjugated	Source
CD235a (GPA)	Anti-Human	REA175	1:200	APC	Miltenyi Biotec
CD71	Anti-Human	REA902	1:200	FITC	Miltenyi Biotec
CD41a	Anti-Human	AC136	1:100	APC	Miltenyi Biotec
CD36	Anti-Human	REA760	1:200	VioBlue	Miltenyi Biotec
CD123	Anti-Human	REA918	1:200	PerCP-Vio700	Miltenyi Biotec
CD34	Anti-Human	REA1164	1:200	PE	Miltenyi Biotec
DAPI			2:100	VioBlue	PanReac AppliChem
Annexin V			2:100	APC	BD Biosciences
7AAD			2:100	PerCP	BD Biosciences
CD71	Anti-Mouse	REA627	1:200	APC	Miltenyi Biotec
TER-119	Anti-Mouse	REA847	1:200	FITC	Miltenyi Biotec
CD45	Anti-Mouse	30F11	1:200	PerCP	Miltenyi Biotec
CD117	Anti-Mouse	REA791	1:200	PE	Miltenyi Biotec
Mouse HSC Isolation Kit	Anti-Mouse				BD Biosciences

Supplemental table 2. List of primers used for RT-qPCR.

EPO-R	Forward	5'-ATCCTGACGCTCTCCCTCAT-3'
	Reverse	5'-AGAGCGAGTTTGAAGGCCTC -3'
GAPDH	Forward	5'-TCGGAGTCAACGGATTTGGTCG -3'
	Reverse	5'-AGGGCATCCTGGGCTACACTGA -3'
GPA	Forward	5'-GGGGTGATGGCTGTTAT -3'
	Reverse	5'-CCTCACCTGACACAGACGTG -3'
GATA-1	Forward	5'-AGCAGCTTCCCTCCACTGCTG-3'
	Reverse	5'-CCTCACCTGACACAGACGTG -3'
GATA-2	Forward	5'-TACAGCAGCGGACTCTTCC-3'
	Reverse	5'-CTCGTTCCTGTTCAGAAGGC-3'
β-Globin	Forward	5'-CAACGTGCTGGTCTGTGTG -3'
	Reverse	5'-CACTAAGCTCGCTTTCTTGCTG -3'
STAT5A	Forward	5'-CTGGACTTTTCTGAAGGGGCT -3'

	Reverse	5'-AGAATAGCCGGGGGAATGTG -3'
Bcl-xL	Forward	5'-TCGGATCGCAGCTTGGATGG-3'
	Reverse	5'-GAAGCGTTCCTGGCCCTTC-3'
HPRT	Forward	5'- TGTAATCCAGCAGGTCAGCA -3'
	Reverse	5'- ACCCTTCCAAATCCTCAGC -3'
JAK2	Forward	5'-AGAGTCTTTCTTTGAAGCAGC -3'
	Reverse	5'- CCAGAATATTCTCGTCTCCAC-3'
FOG 1	Forward	5'-CCAGGCGGAAACAGAGCAAC -3'
	Reverse	5'- GAGTTAACATCTGCGCTGGGA-3'
PU.1	Forward	5'-CCCCTCCATCAGAAGACCTG -3'
	Reverse	5'-GAAGTTGTTCTCGGCGAAGC -3'
ERFE	Forward	5'-TGCTCATCTGCATCCAGTCC -3'
	Reverse	5'- TTGTCCAAGAACACGGAGGTC -3'
CD71	Forward	5'-TCTGGAATCCCAGCAGTTTCTT -3'
	Reverse	5'-ATCACGAACTGACCAGCGAC -3'
EKLF	Forward	5'-TGACTTCCTCAAGTGGTGGC -3'
	Reverse	5'-GGTGAGGAGGAGATCCAGGT -3'

Supplemental table 3. Characteristics and references of antibodies used for Western Blot.

Antibody	Manufacturer	Dilution	Host/Clonality
p-stat5 (Tyr694)	Cell Signaling	1 :1000	Rabbit/ Polyclonal
stat5	BD Biosciences	1 :1000	Mouse/8 9/STAT5
beta Actin	Abcam	1 :1000	Rabbit/polyclonal
Caspase 3 cleaved	Cell Signaling	1 :1000	Rabbit/SAIE
Bcl-xL	Cell Signaling	1 :1000	Rabbit/27625

VIII. Bibliographie

- [1] F. Stam, C. van Guldener, C. G. Schalkwijk, P. M. ter Wee, A. J. M. Donker, and C. D. A. Stehouwer, "Impaired renal function is associated with markers of endothelial dysfunction and increased inflammatory activity," *Nephrol. Dial. Transplant.*, vol. 18, no. 5, pp. 892–898, May 2003, doi: 10.1093/ndt/gfg080.
- [2] L. Dou *et al.*, "The uremic solute indoxyl sulfate induces oxidative stress in endothelial cells," *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 5, no. 6, pp. 1302–1308, 2007, doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02540.x.
- [3] I. C. Macdougall, "Role of uremic toxins in exacerbating anemia in renal failure," *Kidney Int. Suppl.*, vol. 78, pp. S67–72, Feb. 2001, doi: 10.1046/j.1523-1755.2001.59780067.x.
- [4] P. J. Ratcliffe, "Molecular biology of erythropoietin," *Kidney International*, vol. 44, no. 4, pp. 887–904, Oct. 1993, doi: 10.1038/ki.1993.327.
- [5] B. Stengel *et al.*, "The French Chronic Kidney Disease-Renal Epidemiology and Information Network (CKD-REIN) cohort study," *Nephrology Dialysis Transplantation*, vol. 29, no. 8, pp. 1500–1507, Aug. 2014, doi: 10.1093/ndt/gft388.
- [6] Z. Wagner *et al.*, "Serum carboxymethyllysine predicts mortality in hemodialysis patients," *Am. J. Kidney Dis.*, vol. 47, no. 2, pp. 294–300, Feb. 2006, doi: 10.1053/j.ajkd.2005.10.010.
- [7] S. Liabeuf *et al.*, "Free p-cresylsulphate is a predictor of mortality in patients at different stages of chronic kidney disease," *Nephrol. Dial. Transplant.*, vol. 25, no. 4, pp. 1183–1191, Apr. 2010, doi: 10.1093/ndt/gfp592.
- [8] G. A. Block, P. S. Klassen, J. M. Lazarus, N. Ofsthun, E. G. Lowrie, and G. M. Chertow, "Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 15, no. 8, pp. 2208–2218, Aug. 2004, doi: 10.1097/01.ASN.0000133041.27682.A2.
- [9] B. Bammens, P. Evenepoel, H. Keuleers, K. Verbeke, and Y. Vanrenterghem, "Free serum concentrations of the protein-bound retention solute p-cresol predict mortality in hemodialysis patients," *Kidney Int.*, vol. 69, no. 6, pp. 1081–1087, Mar. 2006, doi: 10.1038/sj.ki.5000115.
- [10] A. K. Cheung *et al.*, "Serum beta-2 microglobulin levels predict mortality in dialysis patients: results of the HEMO study," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 17, no. 2, pp. 546–555, Feb. 2006, doi: 10.1681/ASN.2005020132.
- [11] R. Vanholder *et al.*, "Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability," *Kidney Int.*, vol. 63, no. 5, pp. 1934–1943, May 2003, doi: 10.1046/j.1523-1755.2003.00924.x.
- [12] F. Duranton *et al.*, "Normal and pathologic concentrations of uremic toxins," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 23, no. 7, pp. 1258–1270, Jul. 2012, doi: 10.1681/ASN.2011121175.
- [13] B. Wengle and K. Hellström, "Volatile Phenols in Serum of Uraemic Patients," *Clinical Science*, vol. 43, no. 4, pp. 493–498, Oct. 1972, doi: 10.1042/cs0430493.
- [14] T. Niwa and M. Ise, "Indoxyl sulfate, a circulating uremic toxin, stimulates the progression of glomerular sclerosis," *J. Lab. Clin. Med.*, vol. 124, no. 1, pp. 96–104, Jul. 1994, doi: 10.5555/uri:pii:0022214394901600.

- [15] M. Hida, Y. Aiba, S. Sawamura, N. Suzuki, T. Satoh, and Y. Koga, "Inhibition of the Accumulation of Uremic Toxins in the Blood and Their Precursors in the Feces after Oral Administration of *Lebenin*, a Lactic Acid Bacteria Preparation, to Uremic Patients Undergoing Hemodialysis," *Nephron*, vol. 74, no. 2, pp. 349–355, 1996, doi: 10.1159/000189334.
- [16] A. Kabanda, M. Jadoul, J. M. Pochet, R. Lauwerys, C. van Ypersele de Strihou, and A. Bernard, "Determinants of the serum concentrations of low molecular weight proteins in patients on maintenance hemodialysis," *Kidney International*, vol. 45, no. 6, pp. 1689–1696, Jun. 1994, doi: 10.1038/ki.1994.221.
- [17] G. Stein *et al.*, "Influence of dialysis modalities on serum AGE levels in end-stage renal disease patients," *Nephrol Dial Transplant*, vol. 16, no. 5, pp. 999–1008, May 2001, doi: 10.1093/ndt/16.5.999.
- [18] R. C. Vanholder and S. M. Ringoir, "Adequacy of dialysis: A critical analysis," *Kidney International*, vol. 42, no. 3, pp. 540–558, Sep. 1992, doi: 10.1038/ki.1992.318.
- [19] W. F. Owen, N. L. Lew, Y. Liu, E. G. Lowrie, and J. M. Lazarus, "The Urea Reduction Ratio and Serum Albumin Concentration as Predictors of Mortality in Patients Undergoing Hemodialysis," *New England Journal of Medicine*, vol. 329, no. 14, pp. 1001–1006, Sep. 1993, doi: 10.1056/NEJM199309303291404.
- [20] A. Dhondt, R. Vanholder, W. Van Biesen, and N. Lameire, "The removal of uremic toxins," *Kidney Int. Suppl.*, vol. 76, pp. S47–59, Aug. 2000, doi: 10.1046/j.1523-1755.2000.07606.x.
- [21] G. Lesaffer, R. De Smet, N. Lameire, A. Dhondt, P. Duym, and R. Vanholder, "Intradialytic removal of protein-bound uraemic toxins: role of solute characteristics and of dialyser membrane," *Nephrol. Dial. Transplant.*, vol. 15, no. 1, pp. 50–57, Jan. 2000, doi: 10.1093/ndt/15.1.50.
- [22] S. Liabeuf, T. B. Drüeke, and Z. A. Massy, "Protein-Bound Uremic Toxins: New Insight from Clinical Studies," *Toxins*, vol. 3, no. 7, Art. no. 7, Jul. 2011, doi: 10.3390/toxins3070911.
- [23] C.-K. Chiang, T. Tanaka, R. Inagi, T. Fujita, and M. Nangaku, "Indoxyl sulfate, a representative uremic toxin, suppresses erythropoietin production in a HIF-dependent manner," *Lab. Invest.*, vol. 91, no. 11, pp. 1564–1571, Nov. 2011, doi: 10.1038/labinvest.2011.114.
- [24] C.-K. Chiang, T. Tanaka, and M. Nangaku, "Dysregulated Oxygen Metabolism of the Kidney by Uremic Toxins: Review," *Journal of Renal Nutrition*, vol. 22, no. 1, pp. 77–80, Jan. 2012, doi: 10.1053/j.jrn.2011.10.028.
- [25] R. Vanholder, S. Van Laecke, and G. Glorieux, "What is new in uremic toxicity?," *Pediatr Nephrol*, vol. 23, no. 8, pp. 1211–1221, Aug. 2008, doi: 10.1007/s00467-008-0762-9.
- [26] T. Niwa, "Uremic toxicity of indoxyl sulfate," *Nagoya J Med Sci*, vol. 72, no. 1–2, pp. 1–11, Feb. 2010.
- [27] B. K. I. Meijers and P. Evenepoel, "The gut–kidney axis: indoxyl sulfate, p-cresyl sulfate and CKD progression," *Nephrology Dialysis Transplantation*, vol. 26, no. 3, pp. 759–761, Mar. 2011, doi: 10.1093/ndt/gfq818.
- [28] R. VANHOLDER and R. DE SMET, "Pathophysiologic Effects of Uremic Retention Solutes," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 10, no. 8, p. 1815, Aug. 1999.
- [29] R. Vanholder *et al.*, "Warning: the unfortunate end of p-cresol as a uraemic toxin," *Nephrol Dial Transplant*, vol. 26, no. 5, pp. 1464–1467, May 2011, doi: 10.1093/ndt/gfr056.
- [30] L. Viaene, P. Annaert, H. de Loor, R. Poesen, P. Evenepoel, and B. Meijers, "Albumin is the main plasma binding protein for indoxyl sulfate and p -cresyl sulfate: ALBUMIN

- IS MAIN CARRIER OF INDOXYL SULFATE AND *p*-CRESYL SULFATE,” *Biopharm. Drug Dispos.*, vol. 34, no. 3, pp. 165–175, Apr. 2013, doi: 10.1002/bdd.1834.
- [31] C.-J. Lin *et al.*, “p-cresylsulfate and indoxyl sulfate level at different stages of chronic kidney disease,” *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, vol. 25, no. 3, pp. 191–197, 2011, doi: 10.1002/jcla.20456.
 - [32] A. K. Bello *et al.*, “Complications of chronic kidney disease: current state, knowledge gaps, and strategy for action,” *Kidney Int Suppl (2011)*, vol. 7, no. 2, pp. 122–129, Oct. 2017, doi: 10.1016/j.kisu.2017.07.007.
 - [33] “The 3 Most Common Causes of Chronic Kidney Disease,” *Verywell Health*. <https://www.verywellhealth.com/common-causes-of-chronic-kidney-disease-2085786> (accessed Feb. 22, 2020).
 - [34] R. Kazancioğlu, “Risk factors for chronic kidney disease: an update,” *Kidney Int Suppl (2011)*, vol. 3, no. 4, pp. 368–371, Dec. 2013, doi: 10.1038/kisup.2013.79.
 - [35] R. Thomas, A. Kanso, and J. R. Sedor, “Chronic Kidney Disease and Its Complications,” *Primary Care: Clinics in Office Practice*, vol. 35, no. 2, pp. 329–344, Jun. 2008, doi: 10.1016/j.pop.2008.01.008.
 - [36] A. Khanna and W. B. White, “The Management of Hyperkalemia in Patients with Cardiovascular Disease,” *The American Journal of Medicine*, vol. 122, no. 3, pp. 215–221, Mar. 2009, doi: 10.1016/j.amjmed.2008.10.028.
 - [37] C.-Y. Hsu, C. E. McCulloch, and G. C. Curhan, “Epidemiology of Anemia Associated with Chronic Renal Insufficiency among Adults in the United States: Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey,” *J Am Soc Nephrol*, p. 7, 2002.
 - [38] W. McClellan *et al.*, “The prevalence of anemia in patients with chronic kidney disease,” *Curr Med Res Opin*, vol. 20, no. 9, pp. 1501–1510, Sep. 2004, doi: 10.1185/030079904X2763.
 - [39] K. V. Patel, “Epidemiology of Anemia in Older Adults,” *Semin Hematol*, vol. 45, no. 4, pp. 210–217, Oct. 2008, doi: 10.1053/j.seminhematol.2008.06.006.
 - [40] D. E. Weiner *et al.*, “Effects of anemia and left ventricular hypertrophy on cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 16, no. 6, pp. 1803–1810, Jun. 2005, doi: 10.1681/ASN.2004070597.
 - [41] Sarnak Mark J. *et al.*, “Kidney Disease as a Risk Factor for Development of Cardiovascular Disease,” *Hypertension*, vol. 42, no. 5, pp. 1050–1065, Nov. 2003, doi: 10.1161/01.HYP.0000102971.85504.7c.
 - [42] A. Cases, E. Coll, and S. Collado, “Anemia en la insuficiencia renal crónica y sus implicaciones cardiovasculares,” *Medicina Clínica*, vol. 132, pp. 38–42, May 2009, doi: 10.1016/S0025-7753(09)70961-3.
 - [43] A. K. Agarwal, “Practical Approach to the Diagnosis and Treatment of Anemia Associated With CKD in Elderly,” *Journal of the American Medical Directors Association*, vol. 7, no. 9, pp. S7–S12, Nov. 2006, doi: 10.1016/j.jamda.2006.09.005.
 - [44] M. Nangaku and K.-U. Eckardt, “Pathogenesis of renal anemia,” *Semin. Nephrol.*, vol. 26, no. 4, pp. 261–268, Jul. 2006, doi: 10.1016/j.semnephrol.2006.06.001.
 - [45] M. S. E. Ahmed, M. Abed, J. Voelkl, and F. Lang, “Triggering of suicidal erythrocyte death by uremic toxin indoxyl sulfate,” *BMC Nephrol*, vol. 14, p. 244, Nov. 2013, doi: 10.1186/1471-2369-14-244.
 - [46] Y. Adelibieke, H. Shimizu, S. Saito, R. Mironova, and T. Niwa, “Indoxyl sulfate counteracts endothelial effects of erythropoietin through suppression of Akt phosphorylation,” *Circ. J.*, vol. 77, no. 5, pp. 1326–1336, 2013, doi: 10.1253/circj.cj-12-0884.

- [47] L. F. Congote, G. Sadvakassova, M. C. Dobocan, M. R. DiFalco, and Q. Li, "Erythropoietin-dependent endothelial proteins: Potential use against erythropoietin resistance," *Cytokine*, vol. 51, no. 2, pp. 113–118, Aug. 2010, doi: 10.1016/j.cyto.2010.03.020.
- [48] L. F. Congote, M. R. DiFalco, and B. F. Gibbs, "Thrombospondin 1, produced by endothelial cells under the action of erythropoietin, stimulates thymidine incorporation into erythroid cells and counteracts the inhibitory action of insulin-like growth factor binding protein 3," *Cytokine*, vol. 30, no. 5, pp. 248–253, Jun. 2005, doi: 10.1016/j.cyto.2005.01.017.
- [49] H. Asai, J. Hirata, A. Hirano, K. Hirai, S. Seki, and M. Watanabe-Akanuma, "Activation of aryl hydrocarbon receptor mediates suppression of hypoxia-inducible factor-dependent erythropoietin expression by indoxyl sulfate," *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 310, no. 2, pp. C142–C150, Nov. 2015, doi: 10.1152/ajpcell.00172.2015.
- [50] C. Gao *et al.*, "Indolic uremic solutes enhance procoagulant activity of red blood cells through phosphatidylserine exposure and microparticle release," *Toxins (Basel)*, vol. 7, no. 11, pp. 4390–4403, Oct. 2015, doi: 10.3390/toxins7114390.
- [51] S.-H. Lee, X. W. Meng, K. S. Flatten, D. A. Loegering, and S. H. Kaufmann, "Phosphatidylserine exposure during apoptosis reflects bidirectional trafficking between plasma membrane and cytoplasm," *Cell Death Differ*, vol. 20, no. 1, pp. 64–76, Jan. 2013, doi: 10.1038/cdd.2012.93.
- [52] C.-J. Wu *et al.*, "Correction: The role of indoxyl sulfate in renal anemia in patients with chronic kidney disease," *Oncotarget*, vol. 10, no. 20, p. 2006, Mar. 2019, doi: 10.18632/oncotarget.26782.
- [53] S. Bataille *et al.*, "Indole 3-acetic acid, indoxyl sulfate and paracresyl-sulfate do not influence anemia parameters in hemodialysis patients," *BMC Nephrol*, vol. 18, no. 1, p. 251, Jul. 2017, doi: 10.1186/s12882-017-0668-5.
- [54] G. F. Dias *et al.*, "Indoxyl Sulfate, a Uremic Toxin, Stimulates Reactive Oxygen Species Production and Erythrocyte Cell Death Supposedly by an Organic Anion Transporter 2 (OAT2) and NADPH Oxidase Activity-Dependent Pathways," *Toxins*, vol. 10, no. 7, Art. no. 7, Jul. 2018, doi: 10.3390/toxins10070280.
- [55] K. Yoshida, T. Yoneda, S. Kimura, K. Fujimoto, E. Okajima, and Y. Hirao, "Polyamines as an Inhibitor on Erythropoiesis of Hemodialysis Patients by In Vitro Bioassay Using the Fetal Mouse Liver Assay," *Therapher Dial*, vol. 10, no. 3, pp. 267–272, Jun. 2006, doi: 10.1111/j.1744-9987.2006.00370.x.
- [56] D. Kushner *et al.*, "Polyamines in the anemia of end-stage renal disease," *Kidney International*, vol. 39, no. 4, pp. 725–732, Apr. 1991, doi: 10.1038/ki.1991.88.
- [57] H. W. Radtke *et al.*, "Identification of Spermine as an Inhibitor of Erythropoiesis in Patients with Chronic Renal Failure," *J. Clin. Invest.*, vol. 67, no. 6, pp. 1623–1629, Jun. 1981, doi: 10.1172/JCI110197.
- [58] M. S. E. Ahmed, H. Langer, M. Abed, J. Voelkl, and F. Lang, "The Uremic Toxin Acrolein Promotes Suicidal Erythrocyte Death," *Kidney Blood Press Res*, vol. 37, no. 2–3, pp. 158–167, 2013, doi: 10.1159/000350141.
- [59] M. H. Freedman, D. C. Cattran, and F. Saunders, "Anemia of Chronic Renal Failure: Inhibition of Erythropoiesis by Uremic Serum," *Nephron*, vol. 35, no. 1, pp. 15–19, 1983, doi: 10.1159/000183038.
- [60] T. Duangchan *et al.*, "Indoxyl sulfate impairs in vitro erythropoiesis by triggering apoptosis and senescence," *Exp Biol Med (Maywood)*, p. 15353702221097320, May 2022, doi: 10.1177/15353702221097320.

- [61] H.-C. Yang, Y. Zuo, and A. B. Fogo, "Models of chronic kidney disease," *Drug Discovery Today: Disease Models*, vol. 7, no. 1, pp. 13–19, Mar. 2010, doi: 10.1016/j.ddmod.2010.08.002.
- [62] P. S. Reddy *et al.*, "Mapping similarities in mTOR pathway perturbations in mouse lupus nephritis models and human lupus nephritis," *Arthritis Research & Therapy*, vol. 10, no. 6, p. R127, Nov. 2008, doi: 10.1186/ar2541.
- [63] A. Yabuki, S. Tanaka, M. Matsumoto, and S. Suzuki, "Morphometric Study of Gender Differences with Regard to Age-Related Changes in the C57BL/6 Mouse Kidney," p. 6.
- [64] X. Wang, M. A. Chaudhry, Y. Nie, Z. Xie, J. I. Shapiro, and J. Liu, "A Mouse 5/6th Nephrectomy Model That Induces Experimental Uremic Cardiomyopathy," *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, no. 129, p. e55825, Nov. 2017, doi: 10.3791/55825.
- [65] P. Rosenstiel, A. Gharavi, V. D'Agati, and P. Klotman, "Transgenic and Infectious Animal Models of HIV- Associated Nephropathy," *J Am Soc Nephrol*, p. 9.
- [66] Q. Wang *et al.*, "Blood pressure, cardiac, and renal responses to salt and deoxycorticosterone acetate in mice: role of Renin genes," *J Am Soc Nephrol*, vol. 13, no. 6, pp. 1509–1516, Jun. 2002, doi: 10.1097/01.asn.0000017902.77985.84.
- [67] M. Rabe and F. Schaefer, "Non-Transgenic Mouse Models of Kidney Disease," *NEF*, vol. 133, no. 1, pp. 53–61, 2016, doi: 10.1159/000445171.
- [68] H. Hu, G. Wang, F. Batteux, and C. Nicco, "Gender differences in the susceptibility to renal ischemia-reperfusion injury in BALB/c mice," *Tohoku J Exp Med*, vol. 218, no. 4, pp. 325–329, Aug. 2009, doi: 10.1620/tjem.218.325.
- [69] S. B. Gurley, S. E. Clare, K. P. Snow, A. Hu, T. W. Meyer, and T. M. Coffman, "Impact of genetic background on nephropathy in diabetic mice," *Am J Physiol Renal Physiol*, vol. 290, no. 1, pp. F214–222, Jan. 2006, doi: 10.1152/ajprenal.00204.2005.
- [70] D. A. Ishola *et al.*, "In mice, proteinuria and renal inflammatory responses to albumin overload are strain-dependent," *Nephrol Dial Transplant*, vol. 21, no. 3, pp. 591–597, Mar. 2006, doi: 10.1093/ndt/gfi303.
- [71] P. D. Sánchez-González, F. J. López-Hernández, J. M. López-Novoa, and A. I. Morales, "An integrative view of the pathophysiological events leading to cisplatin nephrotoxicity," *Crit Rev Toxicol*, vol. 41, no. 10, pp. 803–821, Nov. 2011, doi: 10.3109/10408444.2011.602662.
- [72] R. Torres *et al.*, "Three-Dimensional Morphology by Multiphoton Microscopy with Clearing in a Model of Cisplatin-Induced CKD," *J Am Soc Nephrol*, vol. 27, no. 4, pp. 1102–1112, Apr. 2016, doi: 10.1681/ASN.2015010079.
- [73] T. Jia *et al.*, "A novel model of adenine-induced tubulointerstitial nephropathy in mice," *BMC Nephrol*, vol. 14, p. 116, May 2013, doi: 10.1186/1471-2369-14-116.
- [74] A. C. Santana *et al.*, "Thalidomide suppresses inflammation in adenine-induced CKD with uraemia in mice," *Nephrol Dial Transplant*, vol. 28, no. 5, pp. 1140–1149, May 2013, doi: 10.1093/ndt/gfs569.
- [75] B. H. Ali *et al.*, "New model for adenine-induced chronic renal failure in mice, and the effect of gum acacia treatment thereon: comparison with rats," *J Pharmacol Toxicol Methods*, vol. 68, no. 3, pp. 384–393, Dec. 2013, doi: 10.1016/j.vascn.2013.05.001.
- [76] M. Mori-Kawabe, Y. Yasuda, M. Ito, and S. Matsuo, "Reduction of NO-mediated Relaxing Effects in the Thoracic Aorta in an Experimental Chronic Kidney Disease Mouse Model," *J Atheroscler Thromb*, vol. 22, no. 8, pp. 845–853, Aug. 2015, doi: 10.5551/jat.28191.
- [77] A. Leelahavanichkul *et al.*, "Angiotensin II overcomes strain-dependent resistance of rapid CKD progression in a new remnant kidney mouse model," *Kidney Int*, vol. 78, no. 11, pp. 1136–1153, Dec. 2010, doi: 10.1038/ki.2010.287.

- [78] A. A. Eddy, J. M. López-Guisa, D. M. Okamura, and I. Yamaguchi, “Investigating mechanisms of chronic kidney disease in mouse models,” *Pediatr Nephrol*, vol. 27, no. 8, pp. 1233–1247, Aug. 2012, doi: 10.1007/s00467-011-1938-2.
- [79] A. L. Cochrane *et al.*, “Renal structural and functional repair in a mouse model of reversal of ureteral obstruction,” *J Am Soc Nephrol*, vol. 16, no. 12, pp. 3623–3630, Dec. 2005, doi: 10.1681/ASN.2004090771.
- [80] T. T. Tapmeier, K. L. Brown, Z. Tang, S. H. Sacks, N. S. Sheerin, and W. Wong, “Reimplantation of the ureter after unilateral ureteral obstruction provides a model that allows functional evaluation,” *Kidney Int*, vol. 73, no. 7, pp. 885–889, Apr. 2008, doi: 10.1038/sj.ki.5002797.
- [81] T. S. Puri *et al.*, “Chronic kidney disease induced in mice by reversible unilateral ureteral obstruction is dependent on genetic background,” *Am J Physiol Renal Physiol*, vol. 298, no. 4, pp. F1024–1032, Apr. 2010, doi: 10.1152/ajprenal.00384.2009.
- [82] E. Dzierzak and S. Philipsen, “Erythropoiesis: Development and Differentiation,” *Cold Spring Harb Perspect Med*, vol. 3, no. 4, p. a011601, Jan. 2013, doi: 10.1101/cshperspect.a011601.
- [83] E. Hamza, L. Metzinger, and V. Metzinger-Le Meuth, “Uremic Toxins Affect Erythropoiesis during the Course of Chronic Kidney Disease: A Review,” *Cells*, vol. 9, no. 9, Art. no. 9, Sep. 2020, doi: 10.3390/cells9092039.
- [84] B. Clarke, D. Nathan, B. Alter, B. Forget, D. Hillman, and D. Housman, “Hemoglobin synthesis in human BFU-E and CFU-E-derived erythroid colonies,” *Blood*, vol. 54, no. 4, pp. 805–817, Oct. 1979, doi: 10.1182/blood.V54.4.805.805.
- [85] S. Huang *et al.*, “Correlation Between IL-3 Receptor Expression and Growth Potential of Human CD34+ Hematopoietic Cells from Different Tissues,” *STEM CELLS*, vol. 17, no. 5, pp. 265–272, 1999, doi: 10.1002/stem.170265.
- [86] H. Wu, X. Liu, R. Jaenisch, and H. F. Lodish, “Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor,” *Cell*, vol. 83, no. 1, pp. 59–67, Oct. 1995.
- [87] J. Li *et al.*, “Isolation and transcriptome analyses of human erythroid progenitors: BFU-E and CFU-E,” *Blood*, vol. 124, no. 24, pp. 3636–3645, Dec. 2014, doi: 10.1182/blood-2014-07-588806.
- [88] J. R. Wangen, L. Eidenschink Brodersen, T. T. Stolk, D. A. Wells, and M. R. Loken, “Assessment of normal erythropoiesis by flow cytometry: important considerations for specimen preparation,” *International Journal of Laboratory Hematology*, vol. 36, no. 2, pp. 184–196, 2014, doi: 10.1111/ijlh.12151.
- [89] M. Stumpf *et al.*, “The mediator complex functions as a coactivator for GATA-1 in erythropoiesis via subunit Med1/TRAP220,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 103, no. 49, pp. 18504–18509, Dec. 2006, doi: 10.1073/pnas.0604494103.
- [90] J. Flygare, V. R. Estrada, C. Shin, S. Gupta, and H. F. Lodish, “HIF1 α synergizes with glucocorticoids to promote BFU-E progenitor self-renewal,” *Blood*, vol. 117, no. 12, pp. 3435–3444, Mar. 2011, doi: 10.1182/blood-2010-07-295550.
- [91] M. Koulis, R. Pop, E. Porpiglia, J. R. Shearstone, D. Hidalgo, and M. Socolovsky, “Identification and Analysis of Mouse Erythroid Progenitors using the CD71/TER119 Flow-cytometric Assay,” *J Vis Exp*, no. 54, p. 2809, Aug. 2011, doi: 10.3791/2809.
- [92] C. S. Lin, S. K. Lim, V. D’Agati, and F. Costantini, “Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis,” *Genes & Development*, vol. 10, no. 2, pp. 154–164, Jan. 1996, doi: 10.1101/gad.10.2.154.

- [93] J. W. Fisher, "Erythropoietin: Physiology and Pharmacology Update <sup/>," *Exp Biol Med (Maywood)*, vol. 228, no. 1, pp. 1–14, Jan. 2003, doi: 10.1177/153537020322800101.
- [94] M. P. Menon, J. Fang, and D. M. Wojchowski, "Core erythropoietin receptor signals for late erythroblast development," *Blood*, vol. 107, no. 7, pp. 2662–2672, Apr. 2006, doi: 10.1182/blood-2005-02-0684.
- [95] T. D. Richmond, M. Chohan, and D. L. Barber, "Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin," *Trends in Cell Biology*, vol. 15, no. 3, pp. 146–155, Mar. 2005, doi: 10.1016/j.tcb.2005.01.007.
- [96] D. M. Wojchowski, R. C. Gregory, C. P. Miller, A. K. Pandit, and T. J. Pircher, "Signal Transduction in the Erythropoietin Receptor System," *Experimental Cell Research*, vol. 253, no. 1, pp. 143–156, Nov. 1999, doi: 10.1006/excr.1999.4673.
- [97] S. Elliott and A. Sinclair, "The effect of erythropoietin on normal and neoplastic cells," *Biologics : targets & therapy*, vol. 6, pp. 163–89, Jun. 2012, doi: 10.2147/BTT.S32281.
- [98] "JAK-STAT and AKT pathway-coupled genes in erythroid progenitor cells through ontogeny | Journal of Translational Medicine | Full Text." <https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1479-5876-10-116> (accessed Sep. 14, 2022).
- [99] B. A. Witthuhn *et al.*, "JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin," *Cell*, vol. 74, no. 2, pp. 227–236, Jul. 1993, doi: 10.1016/0092-8674(93)90414-1.
- [100] M. Socolovsky, A. E. Fallon, S. Wang, C. Brugnara, and H. F. Lodish, "Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a-/-5b-/- mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction," *Cell*, vol. 98, no. 2, pp. 181–191, Jul. 1999, doi: 10.1016/s0092-8674(00)81013-2.
- [101] H. Dolznig *et al.*, "Erythroid progenitor renewal versus differentiation: genetic evidence for cell autonomous, essential functions of EpoR, Stat5 and the GR," *Oncogene*, vol. 25, no. 20, pp. 2890–2900, May 2006, doi: 10.1038/sj.onc.1209308.
- [102] K. Hafid-Medheb, Y. Augery-Bourget, M.-N. Minatchy, N. Hanania, and J. Robert-Lézénès, "Bcl-XL is required for heme synthesis during the chemical induction of erythroid differentiation of murine erythroleukemia cells independently of its antiapoptotic function," *Blood*, vol. 101, no. 7, pp. 2575–2583, Apr. 2003, doi: 10.1182/blood-2002-02-0478.
- [103] T. Gregory, C. Yu, A. Ma, S. H. Orkin, G. A. Blobel, and M. J. Weiss, "GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-xL expression," *Blood*, vol. 94, no. 1, pp. 87–96, Jul. 1999.
- [104] M. A. Kerenyi *et al.*, "Stat5 regulates cellular iron uptake of erythroid cells via IRP-2 and TfR-1," *Blood*, vol. 112, no. 9, pp. 3878–3888, Nov. 2008, doi: 10.1182/blood-2008-02-138339.
- [105] D. Bouscary *et al.*, "Critical role for PI 3-kinase in the control of erythropoietin-induced erythroid progenitor proliferation," *Blood*, vol. 101, no. 9, pp. 3436–3443, May 2003, doi: 10.1182/blood-2002-07-2332.
- [106] Y. Haseyama *et al.*, "Phosphatidylinositol 3-Kinase Is Involved in the Protection of Primary Cultured Human Erythroid Precursor Cells From Apoptosis," *Blood*, vol. 94, no. 5, pp. 1568–1577, Sep. 1999, doi: 10.1182/blood.V94.5.1568.
- [107] H. Huddleston *et al.*, "Functional p85 α gene is required for normal murine fetal erythropoiesis," *Blood*, vol. 102, no. 1, pp. 142–145, Jun. 2003, doi: 10.1182/blood-2002-10-3245.

- [108] E. A. Sivertsen *et al.*, “PI3K/Akt-dependent Epo-induced signalling and target genes in human early erythroid progenitor cells,” *British Journal of Haematology*, vol. 135, no. 1, pp. 117–128, 2006, doi: 10.1111/j.1365-2141.2006.06252.x.
- [109] W. Zhao, C. Kitidis, M. D. Fleming, H. F. Lodish, and S. Ghaffari, “Erythropoietin stimulates phosphorylation and activation of GATA-1 via the PI3-kinase/AKT signaling pathway,” *Blood*, vol. 107, no. 3, pp. 907–915, Feb. 2006, doi: 10.1182/blood-2005-06-2516.
- [110] T. Moriguchi and M. Yamamoto, “A regulatory network governing Gata1 and Gata2 gene transcription orchestrates erythroid lineage differentiation,” *Int J Hematol*, vol. 100, no. 5, pp. 417–424, Nov. 2014, doi: 10.1007/s12185-014-1568-0.
- [111] M. Suzuki *et al.*, “GATA factor switching from GATA2 to GATA1 contributes to erythroid differentiation,” *Genes to Cells*, vol. 18, no. 11, pp. 921–933, 2013, doi: 10.1111/gtc.12086.
- [112] W. F. Khalaf, H. White, M. J. Wenning, A. Orazi, R. Kapur, and D. A. Ingram, “K-Ras is essential for normal fetal liver erythropoiesis,” *Blood*, vol. 105, no. 9, pp. 3538–3541, May 2005, doi: 10.1182/blood-2004-05-2021.
- [113] L. Johnson *et al.*, “K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras,” *Genes Dev*, vol. 11, no. 19, pp. 2468–2481, Oct. 1997, doi: 10.1101/gad.11.19.2468.
- [114] A. Turjanski, J. Vaqué, and J. S. Gutkind, “MAP kinases and the control of nuclear events,” *Oncogene*, vol. 26, pp. 3240–53, Jun. 2007, doi: 10.1038/sj.onc.1210415.
- [115] X. Sui, S. B. Krantz, M. You, and Z. Zhao, “Synergistic activation of MAP kinase (ERK1/2) by erythropoietin and stem cell factor is essential for expanded erythropoiesis,” *Blood*, vol. 92, no. 4, pp. 1142–1149, Aug. 1998.
- [116] S. Dazy, F. Damiola, N. Parisey, H. Beug, and O. Gandrillon, “The MEK-1/ERKs signalling pathway is differentially involved in the self-renewal of early and late avian erythroid progenitor cells,” *Oncogene*, vol. 22, no. 58, pp. 9205–9216, Dec. 2003, doi: 10.1038/sj.onc.1207049.
- [117] Y. Zermati *et al.*, “Caspase Activation Is Required for Terminal Erythroid Differentiation,” *J Exp Med*, vol. 193, no. 2, pp. 247–254, Jan. 2001.
- [118] J.-A. Ribeil *et al.*, “Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1,” *Nature*, vol. 445, pp. 102–5, Feb. 2007, doi: 10.1038/nature05378.
- [119] L. Gutiérrez *et al.*, “Ablation of Gata1 in adult mice results in aplastic crisis, revealing its essential role in steady-state and stress erythropoiesis,” *Blood*, vol. 111, no. 8, pp. 4375–4385, Apr. 2008, doi: 10.1182/blood-2007-09-115121.
- [120] “An erythrocyte-specific DNA-binding factor recognizes a regulatory sequence common to all chicken globin genes.” <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.85.16.5976> (accessed Jul. 19, 2022).
- [121] D. I. Martin and S. H. Orkin, “Transcriptional activation and DNA binding by the erythroid factor GF-1/NF-E1/Eryf 1,” *Genes Dev*, vol. 4, no. 11, pp. 1886–1898, Nov. 1990, doi: 10.1101/gad.4.11.1886.
- [122] V. Mignotte, L. Wall, E. deBoer, F. Grosveld, and P.-H. Romeo, “Two tissue-specific factors bind the erythroid promoter of the human porphobilinogen deaminase gene,” *Nucleic Acids Research*, vol. 17, no. 1, pp. 37–54, Jan. 1989, doi: 10.1093/nar/17.1.37.
- [123] M. J. Koury, S. T. Sawyer, and S. J. Brandt, “New insights into erythropoiesis,” *Curr Opin Hematol*, vol. 9, no. 2, pp. 93–100, Mar. 2002, doi: 10.1097/00062752-200203000-00002.
- [124] “Martin DI, Zon LI, Mutter G, Orkin SH. Expression of an erythroid transcription factor in megakaryocytic and mast cell lineages. *Nature*. 1990 Mar 29; 344(6265):444-

- 7.," *HSCRB*. <https://hscrb.harvard.edu/publication/martin-di-zon-li-mutter-g-orkin-sh-expression-of-an-erythroid-transcription-factor-in-megakaryocytic-and-mast-cell-lineages-nature-1990-mar-29-3446265444-7/> (accessed Jul. 19, 2022).
- [125] G. Courtois *et al.*, "L'érythropoïèse tardive : une mort avortée ?," *Hématologie*, vol. 13, no. 6, pp. 400–408, Dec. 2007, doi: 10.1684/hma.2007.0190.
- [126] "Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1 | Nature." <https://www.nature.com/articles/349257a0> (accessed Jun. 06, 2022).
- [127] Y. Fujiwara, C. P. Browne, K. Cunniff, S. C. Goff, and S. H. Orkin, "Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 93, no. 22, pp. 12355–12358, Oct. 1996, doi: 10.1073/pnas.93.22.12355.
- [128] M. A. McDevitt, R. A. Shivdasani, Y. Fujiwara, H. Yang, and S. H. Orkin, "A 'knockdown' mutation created by cis-element gene targeting reveals the dependence of erythroid cell maturation on the level of transcription factor GATA-1," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 94, no. 13, pp. 6781–6785, Jun. 1997, doi: 10.1073/pnas.94.13.6781.
- [129] S. Takahashi *et al.*, "Arrest in primitive erythroid cell development caused by promoter-specific disruption of the GATA-1 gene," *J Biol Chem*, vol. 272, no. 19, pp. 12611–12615, May 1997, doi: 10.1074/jbc.272.19.12611.
- [130] M. Rylski *et al.*, "GATA-1-mediated proliferation arrest during erythroid maturation," *Mol Cell Biol*, vol. 23, no. 14, pp. 5031–5042, Jul. 2003, doi: 10.1128/MCB.23.14.5031-5042.2003.
- [131] A. B. Cantor and S. H. Orkin, "Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners," *Oncogene*, vol. 21, no. 21, pp. 3368–3376, May 2002, doi: 10.1038/sj.onc.1205326.
- [132] A. P. Tsang *et al.*, "FOG, a Multitype Zinc Finger Protein, Acts as a Cofactor for Transcription Factor GATA-1 in Erythroid and Megakaryocytic Differentiation," *Cell*, vol. 90, no. 1, pp. 109–119, Jul. 1997, doi: 10.1016/S0092-8674(00)80318-9.
- [133] G. L. Wang and G. L. Semenza, "Purification and Characterization of Hypoxia-inducible Factor 1," *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 3, pp. 1230–1237, Jan. 1995, doi: 10.1074/jbc.270.3.1230.
- [134] M. Scortegagna *et al.*, "HIF-2 α regulates murine hematopoietic development in an erythropoietin-dependent manner," *Blood*, vol. 105, no. 8, pp. 3133–3140, Apr. 2005, doi: 10.1182/blood-2004-05-1695.
- [135] M. J. Percy *et al.*, "A Gain-of-Function Mutation in the *HIF2A* Gene in Familial Erythrocytosis," *N Engl J Med*, vol. 358, no. 2, pp. 162–168, Jan. 2008, doi: 10.1056/NEJMoa073123.
- [136] R. van Wijk *et al.*, "Erythrocytosis associated with a novel missense mutation in the HIF2A gene," *Haematologica*, vol. 95, no. 5, pp. 829–832, May 2010, doi: 10.3324/haematol.2009.017582.
- [137] A. Paliege *et al.*, "Hypoxia-inducible factor-2 α -expressing interstitial fibroblasts are the only renal cells that express erythropoietin under hypoxia-inducible factor stabilization," *Kidney International*, vol. 77, no. 4, pp. 312–318, Feb. 2010, doi: 10.1038/ki.2009.460.
- [138] M. J. Koury and V. H. Haase, "Anaemia in kidney disease: harnessing hypoxia responses for therapy," *Nat Rev Nephrol*, vol. 11, no. 7, pp. 394–410, Jul. 2015, doi: 10.1038/nrneph.2015.82.
- [139] V. H. Haase, "HIF-prolyl hydroxylases as therapeutic targets in erythropoiesis and iron metabolism," *Hemodialysis International*, vol. 21, no. S1, pp. S110–S124, 2017, doi: 10.1111/hdi.12567.

- [140] I. Mimura and M. Nangaku, "The suffocating kidney: tubulointerstitial hypoxia in end-stage renal disease," *Nat Rev Nephrol*, vol. 6, no. 11, pp. 667–678, Nov. 2010, doi: 10.1038/nrneph.2010.124.
- [141] T. Tanaka and M. Nangaku, "The role of hypoxia, increased oxygen consumption, and hypoxia-inducible factor-1 alpha in progression of chronic kidney disease:," *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, vol. 19, no. 1, pp. 43–50, Jan. 2010, doi: 10.1097/MNH.0b013e3283328eed.
- [142] W. G. Kaelin and P. J. Ratcliffe, "Oxygen Sensing by Metazoans: The Central Role of the HIF Hydroxylase Pathway," *Molecular Cell*, vol. 30, no. 4, pp. 393–402, May 2008, doi: 10.1016/j.molcel.2008.04.009.
- [143] W. M. Bernhardt *et al.*, "Inhibition of Prolyl Hydroxylases Increases Erythropoietin Production in ESRD," *J Am Soc Nephrol*, vol. 21, no. 12, pp. 2151–2156, Dec. 2010, doi: 10.1681/ASN.2010010116.
- [144] A. A. Joharapurkar, V. B. Pandya, V. J. Patel, R. C. Desai, and M. R. Jain, "Prolyl Hydroxylase Inhibitors: A Breakthrough in the Therapy of Anemia Associated with Chronic Diseases," *J. Med. Chem.*, vol. 61, no. 16, pp. 6964–6982, Aug. 2018, doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b01686.
- [145] K. Franke *et al.*, "HIF-1 α is a protective factor in conditional PHD2-deficient mice suffering from severe HIF-2 α -induced excessive erythropoiesis," *Blood*, vol. 121, no. 8, pp. 1436–1445, Feb. 2013, doi: 10.1182/blood-2012-08-449181.
- [146] M. Scortegagna, M. A. Morris, Y. Oktay, M. Bennett, and J. A. Garcia, "The HIF family member EPAS1/HIF-2 α is required for normal hematopoiesis in mice," *Blood*, vol. 102, no. 5, pp. 1634–1640, Sep. 2003, doi: 10.1182/blood-2003-02-0448.
- [147] P. P. Kapitsinou *et al.*, "Hepatic HIF-2 regulates erythropoietic responses to hypoxia in renal anemia," *Blood*, vol. 116, no. 16, pp. 3039–3048, Oct. 2010, doi: 10.1182/blood-2010-02-270322.
- [148] T. Tanaka, J. Yamaguchi, Y. Higashijima, and M. Nangaku, "Indoxyl sulfate signals for rapid mRNA stabilization of Cbp/p300-interacting transactivator with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain 2 (CITED2) and suppresses the expression of hypoxia-inducible genes in experimental CKD and uremia," *FASEB J.*, vol. 27, no. 10, pp. 4059–4075, Oct. 2013, doi: 10.1096/fj.13-231837.
- [149] B. Gondouin *et al.*, "Indolic uremic solutes increase tissue factor production in endothelial cells by the aryl hydrocarbon receptor pathway," *Kidney Int.*, vol. 84, no. 4, pp. 733–744, Oct. 2013, doi: 10.1038/ki.2013.133.
- [150] U. Testa, "Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis," *Leukemia*, vol. 18, no. 7, Art. no. 7, Jul. 2004, doi: 10.1038/sj.leu.2403383.
- [151] W. Jelkmann, "Erythropoietin after a century of research: younger than ever," *European Journal of Haematology*, vol. 78, no. 3, pp. 183–205, 2007, doi: 10.1111/j.1600-0609.2007.00818.x.
- [152] G. Rishi and V. N. Subramaniam, "The relationship between systemic iron homeostasis and erythropoiesis," *Biosci Rep*, vol. 37, no. 6, Nov. 2017, doi: 10.1042/BSR20170195.
- [153] A. Kim and E. Nemeth, "New insights into iron regulation and erythropoiesis:," *Current Opinion in Hematology*, vol. 22, no. 3, pp. 199–205, May 2015, doi: 10.1097/MOH.0000000000000132.
- [154] F. Lang, E. Gulbins, P. A. Lang, D. Zappulla, and M. Föller, "Ceramide in Suicidal Death of Erythrocytes," *Cell Physiol Biochem*, vol. 26, no. 1, pp. 21–28, 2010, doi: 10.1159/000315102.
- [155] C. H. Park, E. V. Valore, A. J. Waring, and T. Ganz, "Hepcidin, a Urinary Antimicrobial Peptide Synthesized in the Liver," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 11, pp. 7806–7810, Mar. 2001, doi: 10.1074/jbc.M008922200.

- [156] T. Ganz, “Molecular Control of Iron Transport,” *JASN*, vol. 18, no. 2, pp. 394–400, Feb. 2007, doi: 10.1681/ASN.2006070802.
- [157] T. Ganz and E. Nemeth, “Hepcidin and Disorders of Iron Metabolism,” *Annu. Rev. Med.*, vol. 62, no. 1, pp. 347–360, Jan. 2011, doi: 10.1146/annurev-med-050109-142444.
- [158] N. Tomosugi *et al.*, “Detection of serum hepcidin in renal failure and inflammation by using ProteinChip System,” *Blood*, vol. 108, no. 4, pp. 1381–1387, Aug. 2006, doi: 10.1182/blood-2005-10-4043.
- [159] J. S. Troutt, A. M. Butterfield, and R. J. Konrad, “Hepcidin-25 Concentrations Are Markedly Increased in Patients With Chronic Kidney Disease and Are Inversely Correlated With Estimated Glomerular Filtration Rates,” *J Clin Lab Anal*, vol. 27, no. 6, pp. 504–510, Nov. 2013, doi: 10.1002/jcla.21634.
- [160] A. K. Singh, “Erythropoiesis,” in *Textbook of Nephro-Endocrinology*, Elsevier, 2018, pp. 207–215. doi: 10.1016/B978-0-12-803247-3.00012-X.
- [161] L. Kautz, G. Jung, E. V. Valore, S. Rivella, E. Nemeth, and T. Ganz, “IDENTIFICATION OF ERYTHROFERRONE AS AN ERYTHROID REGULATOR OF IRON METABOLISM,” *Nat Genet*, vol. 46, no. 7, pp. 678–684, Jul. 2014, doi: 10.1038/ng.2996.
- [162] R. F. Paulson, L. Shi, and D.-C. Wu, “Stress erythropoiesis: new signals and new stress progenitor cells:,” *Current Opinion in Hematology*, vol. 18, no. 3, pp. 139–145, May 2011, doi: 10.1097/MOH.0b013e32834521c8.
- [163] R. Coffey and T. Ganz, “Erythroferrone: An Erythroid Regulator of Hepcidin and Iron Metabolism,” *Hemasphere*, vol. 2, no. 2, Mar. 2018, doi: 10.1097/HS9.0000000000000035.
- [164] H. Hamano *et al.*, “The uremic toxin indoxyl sulfate interferes with iron metabolism by regulating hepcidin in chronic kidney disease,” *Nephrol Dial Transplant*, vol. 33, no. 4, pp. 586–597, Apr. 2018, doi: 10.1093/ndt/gfx252.
- [165] D. W. Coyne, “Use of Epoetin in Chronic Renal Failure,” *JAMA*, vol. 297, no. 15, p. 1713, Apr. 2007, doi: 10.1001/jama.297.15.1713.
- [166] J. W. Eschbach, J. C. Egrie, M. R. Downing, J. K. Browne, and J. W. Adamson, “Correction of the Anemia of End-Stage Renal Disease with Recombinant Human Erythropoietin,” *N Engl J Med*, vol. 316, no. 2, pp. 73–78, Jan. 1987, doi: 10.1056/NEJM198701083160203.
- [167] J. W. Eschbach, “Recombinant Human Erythropoietin in Anemic Patients with End-Stage Renal Disease: Results of a Phase III Multicenter Clinical Trial,” *Ann Intern Med*, vol. 111, no. 12, p. 992, Dec. 1989, doi: 10.7326/0003-4819-111-12-992.
- [168] “KDOQI Clinical Practice Guideline and Clinical Practice Recommendations for Anemia in Chronic Kidney Disease: 2007 Update of Hemoglobin Target,” *American Journal of Kidney Diseases*, vol. 50, no. 3, pp. 471–530, Sep. 2007, doi: 10.1053/j.ajkd.2007.06.008.
- [169] “Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Anemia Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Anemia in Chronic Kidney Disease,” p. 64, 2012.
- [170] A. K. Singh, H. Barnhart, and D. Reddan, “Correction of Anemia with Epoetin Alfa in Chronic Kidney Disease,” *The New England Journal of Medicine*, p. 14, 2006, doi: 10.1056/NEJMoa065485.
- [171] T. B. Drüeke *et al.*, “Normalization of hemoglobin level in patients with chronic kidney disease and anemia,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 355, no. 20, pp. 2071–2084, Nov. 2006, doi: 10.1056/NEJMoa062276.

- [172] S. Fishbane, "Upper Limit of Serum Ferritin: Misinterpretation of the 2006 KDOQI Anemia Guidelines: UPPER LIMIT OF SERUM FERRITIN: MISINTERPRETATION OF GUIDELINES," *Seminars in Dialysis*, vol. 21, no. 3, pp. 217–220, Feb. 2008, doi: 10.1111/j.1525-139X.2007.00420.x.
- [173] K. Kalantar-Zadeh *et al.*, "Predictors of Hyporesponsiveness to Erythropoiesis-Stimulating Agents in Hemodialysis Patients," *American Journal of Kidney Diseases*, vol. 53, no. 5, pp. 823–834, May 2009, doi: 10.1053/j.ajkd.2008.12.040.
- [174] A. Besarab and D. W. Coyne, "Iron supplementation to treat anemia in patients with chronic kidney disease," *Nat Rev Nephrol*, vol. 6, no. 12, pp. 699–710, Dec. 2010, doi: 10.1038/nrneph.2010.139.
- [175] A. Besarab, J. W. Kaiser, and S. Frinak, "A study of parenteral iron regimens in hemodialysis patients," *American Journal of Kidney Diseases*, vol. 34, no. 1, pp. 21–28, Jul. 1999, doi: 10.1016/S0272-6386(99)70103-4.
- [176] A. Besarab *et al.*, "Optimization of Epoetin Therapy with Intravenous Iron Therapy in Hemodialysis Patients," *J Am Soc Nephrol*, p. 9, 2000.
- [177] S. D. Roger, "Practical considerations for iron therapy in the management of anaemia in patients with chronic kidney disease," *Clin Kidney J*, vol. 10, no. Suppl 1, pp. i9–i15, Dec. 2017, doi: 10.1093/ckj/sfx100.
- [178] I. C. Macdougall and K.-U. Eckardt, "Novel strategies for stimulating erythropoiesis and potential new treatments for anaemia," *The Lancet*, vol. 368, no. 9539, pp. 947–953, Sep. 2006, doi: 10.1016/S0140-6736(06)69120-4.
- [179] M. M. Hsieh *et al.*, "HIF–prolyl hydroxylase inhibition results in endogenous erythropoietin induction, erythrocytosis, and modest fetal hemoglobin expression in rhesus macaques," *Blood*, vol. 110, no. 6, pp. 2140–2147, Sep. 2007, doi: 10.1182/blood-2007-02-073254.
- [180] N. Gupta and J. B. Wish, "Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylase Inhibitors: A Potential New Treatment for Anemia in Patients With CKD," *American Journal of Kidney Diseases*, vol. 69, no. 6, pp. 815–826, Jun. 2017, doi: 10.1053/j.ajkd.2016.12.011.
- [181] N. Chen *et al.*, "Roxadustat Treatment for Anemia in Patients Undergoing Long-Term Dialysis," *New England Journal of Medicine*, vol. 381, no. 11, pp. 1011–1022, Sep. 2019, doi: 10.1056/NEJMoa1901713.
- [182] N. Chen *et al.*, "Roxadustat for Anemia in Patients with Kidney Disease Not Receiving Dialysis," *N Engl J Med*, vol. 381, no. 11, pp. 1001–1010, Sep. 2019, doi: 10.1056/NEJMoa1813599.
- [183] M. Sugahara, T. Tanaka, and M. Nangaku, "Prolyl hydroxylase domain inhibitors as a novel therapeutic approach against anemia in chronic kidney disease," *Kidney International*, vol. 92, no. 2, pp. 306–312, Aug. 2017, doi: 10.1016/j.kint.2017.02.035.
- [184] T. Niwa, Y. Emoto, K. Maeda, Y. Uehara, Y. Nobuo, and M. Shibata, "Oral Sorbent Suppresses Accumulation of Albumin-Bound Indoxyl Sulphate in Serum of Haemodialysis Patients," *Nephrology Dialysis Transplantation*, vol. 6, no. 2, pp. 105–109, Jan. 1991, doi: 10.1093/ndt/6.2.105.
- [185] T. Niwa *et al.*, "Inhibitory Effect of Oral Sorbent on Accumulation of Albumin-Bound Indoxyl Sulfate in Serum of Experimental Uremic Rats," *Nephron*, vol. 57, no. 1, pp. 84–88, 1991, doi: 10.1159/000186222.
- [186] T. Niwa *et al.*, "Suppressed Serum and Urine Levels of Indoxyl Sulfate by Oral Sorbent in Experimental Uremic Rats," *Am J Nephrol*, vol. 12, no. 4, pp. 201–206, 1992, doi: 10.1159/000168447.
- [187] T. Miyazaki, I. Aoyama, M. Ise, H. Seo, and T. Niwa, "An oral sorbent reduces overload of indoxyl sulphate and gene expression of TGF- β 1 in uraemic rat kidneys,"

- Nephrol Dial Transplant*, vol. 15, no. 11, pp. 1773–1781, Nov. 2000, doi: 10.1093/ndt/15.11.1773.
- [188] I.-W. Wu, K.-H. Hsu, C.-Y. Sun, C.-J. Tsai, M.-S. Wu, and C.-C. Lee, “Oral adsorbent AST-120 potentiates the effect of erythropoietin-stimulating agents on Stage 5 chronic kidney disease patients: a randomized crossover study,” *Nephrology Dialysis Transplantation*, vol. 29, no. 9, pp. 1719–1727, Sep. 2014, doi: 10.1093/ndt/gfu061.
- [189] S. Hombach and M. Kretz, “Non-coding RNAs: Classification, Biology and Functioning,” *Adv Exp Med Biol*, vol. 937, pp. 3–17, 2016, doi: 10.1007/978-3-319-42059-2_1.
- [190] L. Ma, V. B. Bajic, and Z. Zhang, “On the classification of long non-coding RNAs,” *RNA Biology*, vol. 10, no. 6, pp. 924–933, Jun. 2013, doi: 10.4161/rna.24604.
- [191] J. A. Moreno *et al.*, “Non-Coding RNAs in Kidney Diseases: The Long and Short of Them,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 11, Art. no. 11, Jan. 2021, doi: 10.3390/ijms22116077.
- [192] R. C. Lee, R. L. Feinbaum, and V. Ambros, “The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*,” *Cell*, vol. 75, no. 5, pp. 843–854, Dec. 1993.
- [193] A. Kozomara, M. Birgaoanu, and S. Griffiths-Jones, “miRBase: from microRNA sequences to function,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 47, no. D1, pp. D155–D162, Jan. 2019, doi: 10.1093/nar/gky1141.
- [194] H. Jung and Y. Suh, “Regulation of IGF -1 signaling by microRNAs,” *Frontiers in genetics*, vol. 5, p. 472, Jan. 2014, doi: 10.3389/fgene.2014.00472.
- [195] C. Van der Hauwaert, G. Savary, M.-F. Hennino, N. Pottier, F. Glowacki, and C. Cauffiez, “Implication des microARN dans la fibrose rénale,” *Néphrologie & Thérapeutique*, vol. 11, no. 6, pp. 474–482, Nov. 2015, doi: 10.1016/j.nephro.2015.03.007.
- [196] C. Catalanotto, C. Cogoni, and G. Zardo, “MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions,” *Int J Mol Sci*, vol. 17, no. 10, Art. no. 10, Oct. 2016, doi: 10.3390/ijms17101712.
- [197] O. Fourninier *et al.*, “Serum levels of miR-126 and miR-223 and outcomes in chronic kidney disease patients,” *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, p. 4477, Mar. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-41101-8.
- [198] K. Bhatt, Q.-S. Mi, and Z. Dong, “microRNAs in kidneys: biogenesis, regulation, and pathophysiological roles,” *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 300, no. 3, pp. F602–610, Mar. 2011, doi: 10.1152/ajprenal.00727.2010.
- [199] M. Ishida and F. M. Selaru, “miRNA-Based Therapeutic Strategies,” *Curr Pathobiol Rep*, vol. 1, no. 1, pp. 63–70, Mar. 2013, doi: 10.1007/s40139-012-0004-5.
- [200] R. Khurana *et al.*, “Identification of urinary exosomal noncoding RNAs as novel biomarkers in chronic kidney disease,” *RNA*, vol. 23, no. 2, pp. 142–152, Feb. 2017, doi: 10.1261/rna.058834.116.
- [201] N. Li, Y. Cui, M. Yin, and F. Liu, “Screening potential prognostic biomarkers of long non-coding RNAs for predicting the risk of chronic kidney disease,” *Braz J Med Biol Res*, vol. 52, no. 11, p. e8333, 2019, doi: 10.1590/1414-431x20198333.
- [202] C.-F. Lai, Y.-T. Chen, J. Gu, J. M. Nerbonne, C.-H. Lin, and K.-C. Yang, “Circulating long noncoding RNA DKFZP434I0714 predicts adverse cardiovascular outcomes in patients with end-stage renal disease,” *International Journal of Cardiology*, vol. 277, pp. 212–219, Feb. 2019, doi: 10.1016/j.ijcard.2018.08.013.
- [203] R. Khurana *et al.*, “Identification of urinary exosomal noncoding RNAs as novel biomarkers in chronic kidney disease,” *RNA*, vol. 23, no. 2, pp. 142–152, Feb. 2017, doi: 10.1261/rna.058834.116.

- [204] N. Li, Y. Cui, M. Yin, and F. Liu, "Screening potential prognostic biomarkers of long non-coding RNAs for predicting the risk of chronic kidney disease," *Braz J Med Biol Res*, vol. 52, no. 11, p. e8333, 2019, doi: 10.1590/1414-431x20198333.
- [205] C.-F. Lai, Y.-T. Chen, J. Gu, J. M. Nerbonne, C.-H. Lin, and K.-C. Yang, "Circulating long noncoding RNA DKFZP434I0714 predicts adverse cardiovascular outcomes in patients with end-stage renal disease," *International Journal of Cardiology*, vol. 277, pp. 212–219, Feb. 2019, doi: 10.1016/j.ijcard.2018.08.013.
- [206] A. Arbiol-Roca *et al.*, "Association of ANRIL gene polymorphisms with major adverse cardiovascular events in hemodialysis patients," *Clinica Chimica Acta*, vol. 466, pp. 61–67, Mar. 2017, doi: 10.1016/j.cca.2016.12.029.
- [207] H. Wu, C.-F. Lai, M. Chang-Panesso, and B. D. Humphreys, "Proximal Tubule Translational Profiling during Kidney Fibrosis Reveals Proinflammatory and Long Noncoding RNA Expression Patterns with Sexual Dimorphism," *JASN*, vol. 31, no. 1, pp. 23–38, Jan. 2020, doi: 10.1681/ASN.2019040337.
- [208] X. Meng, D. J. Nikolic-Paterson, and H. Y. Lan, "TGF- β : the master regulator of fibrosis," *Nat Rev Nephrol*, vol. 12, no. 6, pp. 325–338, Jun. 2016, doi: 10.1038/nrneph.2016.48.
- [209] X. M. Meng *et al.*, "Smad2 Protects against TGF- β /Smad3-Mediated Renal Fibrosis," *J Am Soc Nephrol*, vol. 21, no. 9, pp. 1477–1487, Sep. 2010, doi: 10.1681/ASN.2009121244.
- [210] Q. Zhou, A. C. K. Chung, X. R. Huang, Y. Dong, X. Yu, and H. Y. Lan, "Identification of Novel Long Noncoding RNAs Associated with TGF- β /Smad3-Mediated Renal Inflammation and Fibrosis by RNA Sequencing," *The American Journal of Pathology*, vol. 184, no. 2, pp. 409–417, Feb. 2014, doi: 10.1016/j.ajpath.2013.10.007.
- [211] Y. Pu, H. Zhao, X. Wu, M. Mei, and B. Shen, "The long noncoding RNA Ptprd-IR is a novel molecular target for TGF- β 1-mediated nephritis," *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 122, p. 105742, May 2020, doi: 10.1016/j.biocel.2020.105742.
- [212] R. Liu *et al.*, "A five-microRNA signature identified from genome-wide serum microRNA expression profiling serves as a fingerprint for gastric cancer diagnosis," *Eur J Cancer*, vol. 47, no. 5, pp. 784–791, Mar. 2011, doi: 10.1016/j.ejca.2010.10.025.
- [213] A. Lenglet *et al.*, "Efficacy and safety of nicotinamide in haemodialysis patients: the NICOREN study," *Nephrology Dialysis Transplantation*, vol. 32, no. 5, pp. 870–879, May 2017, doi: 10.1093/ndt/gfw042.
- [214] R. Gavish *et al.*, "Response to erythropoietin in pediatric patients with chronic kidney disease: insights from an in vitro bioassay," *Pediatr Nephrol*, vol. 33, no. 11, pp. 2123–2129, Nov. 2018, doi: 10.1007/s00467-018-4016-1.
- [215] J.-M. Chillon *et al.*, "Pathophysiological mechanisms and consequences of cardiovascular calcifications: Role of uremic toxicity," *Annales Pharmaceutiques Françaises*, vol. 67, no. 4, pp. 234–240, Jul. 2009, doi: 10.1016/j.pharma.2009.04.001.
- [216] N. Komatsu *et al.*, "Establishment and characterization of a human leukemic cell line with megakaryocytic features: dependency on granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin 3, or erythropoietin for growth and survival," *Cancer Res.*, vol. 51, no. 1, pp. 341–348, Jan. 1991.
- [217] N. Komatsu *et al.*, "Establishment and characterization of an erythropoietin-dependent subline, UT-7/Epo, derived from human leukemia cell line, UT-7," *Blood*, vol. 82, no. 2, pp. 456–464, Jul. 1993.
- [218] A. Caulier *et al.*, "PIEZO1 activation delays erythroid differentiation of normal and hereditary xerocytosis-derived human progenitor cells," *Haematologica*, vol. 105, no. 3, pp. 610–622, Mar. 2020, doi: 10.3324/haematol.2019.218503.

- [219] E. Klein *et al.*, “Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia,” *Int J Cancer*, vol. 18, no. 4, pp. 421–431, Oct. 1976, doi: 10.1002/ijc.2910180405.
- [220] T. Papayannopoulou, B. Nakamoto, T. Yokochi, A. Chait, and R. Kannagi, “Human erythroleukemia cell line (HEL) undergoes a drastic macrophage-like shift with TPA,” *Blood*, vol. 62, no. 4, pp. 832–845, Oct. 1983.
- [221] A. Tabilio *et al.*, “Expression of platelet membrane glycoproteins and alpha-granule proteins by a human erythroleukemia cell line (HEL),” *EMBO J*, vol. 3, no. 2, pp. 453–459, Feb. 1984, doi: 10.1002/j.1460-2075.1984.tb01827.x.
- [222] M.-C. Giarratana *et al.*, “Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells,” *Nat Biotechnol*, vol. 23, no. 1, Art. no. 1, Jan. 2005, doi: 10.1038/nbt1047.
- [223] L. Dou *et al.*, “Aryl hydrocarbon receptor is activated in patients and mice with chronic kidney disease,” *Kidney International*, vol. 93, no. 4, pp. 986–999, Apr. 2018, doi: 10.1016/j.kint.2017.11.010.
- [224] D. N. Haylock *et al.*, “Hemopoietic Stem Cells with Higher Hemopoietic Potential Reside at the Bone Marrow Endosteum,” *STEM CELLS*, vol. 25, no. 4, pp. 1062–1069, 2007, doi: 10.1634/stemcells.2006-0528.
- [225] Y.-T. Lin *et al.*, “Indoxyl Sulfate Induces Apoptosis Through Oxidative Stress and Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway Inhibition in Human Astrocytes,” *J Clin Med*, vol. 8, no. 2, p. E191, Feb. 2019, doi: 10.3390/jcm8020191.
- [226] Y.-H. Kim, K.-A. Kwak, H.-W. Gil, H.-Y. Song, and S.-Y. Hong, “Indoxyl sulfate promotes apoptosis in cultured osteoblast cells,” *BMC Pharmacol Toxicol*, vol. 14, p. 60, Dec. 2013, doi: 10.1186/2050-6511-14-60.
- [227] R. J. Ellis *et al.*, “Indoxyl Sulfate Induces Apoptosis and Hypertrophy in Human Kidney Proximal Tubular Cells,” *Toxicol Pathol*, vol. 46, no. 4, pp. 449–459, Jun. 2018, doi: 10.1177/0192623318768171.
- [228] M.-J. Kim *et al.*, “Sensitization of human K562 leukemic cells to TRAIL-induced apoptosis by inhibiting the DNA-PKcs/Akt-mediated cell survival pathway,” *Biochem Pharmacol*, vol. 78, no. 6, pp. 573–582, Sep. 2009, doi: 10.1016/j.bcp.2009.05.016.
- [229] O. Deltombe, G. Glorieux, S. Marzouki, R. Masereeuw, D. Schneditz, and S. Eloot, “Selective Transport of Protein-Bound Uremic Toxins in Erythrocytes,” *Toxins (Basel)*, vol. 11, no. 7, p. E385, Jul. 2019, doi: 10.3390/toxins11070385.
- [230] M. Mori *et al.*, “Activation of extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 induces Bcl-xL up-regulation via inhibition of caspase activities in erythropoietin signaling,” *J Cell Physiol*, vol. 195, no. 2, pp. 290–297, May 2003, doi: 10.1002/jcp.10245.
- [231] M. H. Baron, A. Vacaru, and J. Nieves, “Erythroid development in the mammalian embryo,” *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, vol. 51, no. 4, pp. 213–219, Dec. 2013, doi: 10.1016/j.bcmed.2013.07.006.
- [232] B. Nuez, D. Michalovich, A. Bygrave, R. Ploemacher, and F. Grosveld, “Defective haematopoiesis in fetal liver resulting from inactivation of the EKLF gene,” *Nature*, vol. 375, no. 6529, pp. 316–318, May 1995, doi: 10.1038/375316a0.
- [233] T. Fujiwara, “GATA Transcription Factors: Basic Principles and Related Human Disorders,” *Tohoku J Exp Med*, vol. 242, no. 2, pp. 83–91, Jun. 2017, doi: 10.1620/tjem.242.83.
- [234] A. Cao and P. Moi, “Regulation of the Globin Genes,” *Pediatr Res*, vol. 51, no. 4, Art. no. 4, Apr. 2002, doi: 10.1203/00006450-200204000-00003.

- [235] T. Nakanishi, T. Kimura, and T. Kuragano, “The Heparin-Anemia Axis: Pathogenesis of Anemia in Chronic Kidney Disease,” *Contrib Nephrol*, vol. 198, pp. 124–134, 2019, doi: 10.1159/000496636.
- [236] X. Gao *et al.*, “TGF- β inhibitors stimulate red blood cell production by enhancing self-renewal of BFU-E erythroid progenitors,” *Blood*, vol. 128, no. 23, pp. 2637–2641, Dec. 2016, doi: 10.1182/blood-2016-05-718320.
- [237] A. T. J. Wierenga, E. Vellenga, and J. J. Schuringa, “Down-regulation of GATA1 uncouples STAT5-induced erythroid differentiation from stem/progenitor cell proliferation,” *Blood*, vol. 115, no. 22, pp. 4367–4376, Jun. 2010, doi: 10.1182/blood-2009-10-250894.
- [238] “MicroRNAs 223-3p and 93-5p in patients with chronic kidney disease before and after renal transplantation - PubMed.” <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27866993/> (accessed Aug. 14, 2022).
- [239] F. Taïbi *et al.*, “Possible involvement of microRNAs in vascular damage in experimental chronic kidney disease,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1842, no. 1, pp. 88–98, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.bbdis.2013.10.005.
- [240] V. Metzinger-Le Meuth, O. Fourdinier, N. Charnaux, Z. A. Massy, and L. Metzinger, “The expanding roles of microRNAs in kidney pathophysiology,” *Nephrol. Dial. Transplant.*, vol. 34, no. 1, pp. 7–15, 01 2019, doi: 10.1093/ndt/gfy140.
- [241] B. Franczyk, A. Gluba-Brzózka, R. Olszewski, M. Parolczyk, M. Rysz-Górczyńska, and J. Rysz, “miRNA biomarkers in renal disease,” *Int Urol Nephrol*, vol. 54, no. 3, pp. 575–588, Mar. 2022, doi: 10.1007/s11255-021-02922-7.
- [242] V. P. Roberto, D. M. Tiago, K. Gautvik, and M. L. Cancela, “Evidence for the conservation of miR-223 in zebrafish (*Danio rerio*): Implications for function,” *Gene*, vol. 566, no. 1, pp. 54–62, Jul. 2015, doi: 10.1016/j.gene.2015.04.022.
- [243] L. Vian *et al.*, “Transcriptional fine-tuning of microRNA-223 levels directs lineage choice of human hematopoietic progenitors,” *Cell Death Differ*, vol. 21, no. 2, pp. 290–301, Feb. 2014, doi: 10.1038/cdd.2013.145.
- [244] N. Felli *et al.*, “MicroRNA 223-dependent expression of LMO2 regulates normal erythropoiesis,” *1*, vol. 94, no. 4, Art. no. 4, Apr. 2009, doi: 10.3324/haematol.2008.002345.
- [245] N. Felli *et al.*, “MicroRNA 223-dependent expression of LMO2 regulates normal erythropoiesis,” *Haematologica*, vol. 94, no. 4, pp. 479–486, Apr. 2009, doi: 10.3324/haematol.2008.002345.
- [246] D. Landau, L. London, I. Bandach, and Y. Segev, “The hypoxia inducible factor/erythropoietin (EPO)/EPO receptor pathway is disturbed in a rat model of chronic kidney disease related anemia,” *PLoS One*, vol. 13, no. 5, p. e0196684, 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0196684.
- [247] M. Socolovsky, H. Nam, M. D. Fleming, V. H. Haase, C. Brugnara, and H. F. Lodish, “Ineffective erythropoiesis in Stat5a(-/-)5b(-/-) mice due to decreased survival of early erythroblasts,” *Blood*, vol. 98, no. 12, pp. 3261–3273, Dec. 2001, doi: 10.1182/blood.v98.12.3261.
- [248] J. Zhang and H. F. Lodish, “Constitutive activation of the MEK/ERK pathway mediates all effects of oncogenic H-ras expression in primary erythroid progenitors,” *Blood*, vol. 104, no. 6, pp. 1679–1687, Sep. 2004, doi: 10.1182/blood-2004-04-1362.
- [249] Y. Cakir and S. W. Ballinger, “Reactive Species-Mediated Regulation of Cell Signaling and the Cell Cycle: The Role of MAPK,” *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 7, no. 5–6, pp. 726–740, May 2005, doi: 10.1089/ars.2005.7.726.
- [250] M. Iiyama, K. Kakihana, T. Kurosu, and O. Miura, “Reactive oxygen species generated by hematopoietic cytokines play roles in activation of receptor-mediated signaling and

- in cell cycle progression,” *Cellular Signalling*, vol. 18, no. 2, pp. 174–182, Feb. 2006, doi: 10.1016/j.cellsig.2005.04.002.
- [251] “Inhibition of fibroblast growth factor 23 (FGF23) signaling rescues renal anemia - Agoro - 2018 - The FASEB Journal - Wiley Online Library.” <https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1096/fj.201700667R> (accessed Jun. 03, 2022).
- [252] G. R. Estrela *et al.*, “Chronic Kidney Disease Induced by Cisplatin, Folic Acid and Renal Ischemia Reperfusion Induces Anemia and Promotes GATA-2 Activation in Mice,” *Biomedicines*, vol. 9, no. 7, Art. no. 7, Jul. 2021, doi: 10.3390/biomedicines9070769.
- [253] J. Wang *et al.*, “Synergistic effect of cytokines EPO, IL-3 and SCF on the proliferation, differentiation and apoptosis of erythroid progenitor cells,” *Clin Hemorheol Microcirc*, vol. 37, no. 4, pp. 291–299, 2007.
- [254] S. de Seigneux, A.-K. M. Lundby, L. Berchtold, A. H. Berg, P. Saudan, and C. Lundby, “Increased Synthesis of Liver Erythropoietin with CKD,” *J Am Soc Nephrol*, vol. 27, no. 8, pp. 2265–2269, Aug. 2016, doi: 10.1681/ASN.2015050508.
- [255] F. Locatelli and R. Minutolo, “Intestinal adsorption of uraemic toxins: a new strategy for anaemia management?,” *Nephrology Dialysis Transplantation*, vol. 29, no. 9, pp. 1620–1624, Sep. 2014, doi: 10.1093/ndt/gfu102.
- [256] Z. A. Massy and T. B. Drueke, “The evolving science of anemia management in chronic kidney disease,” *Kidney International Supplements*, vol. 11, no. 1, pp. 1–2, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.kisu.2020.11.002.
- [257] T. B. Drueke and Z. A. Massy, “Role of proteinuria in the anemia of chronic kidney disease,” *Kidney International*, vol. 100, no. 6, pp. 1160–1162, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.kint.2021.09.016.
- [258] G. Schulman, R. Agarwal, M. Acharya, T. Berl, S. Blumenthal, and N. Kopyt, “A Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Dose-Ranging Study of AST-120 (Kremezin) in Patients With Moderate to Severe CKD,” *American Journal of Kidney Diseases*, vol. 47, no. 4, pp. 565–577, Apr. 2006, doi: 10.1053/j.ajkd.2005.12.036.

Résumé

L'insuffisance rénale chronique (IRC) est un problème de santé mondial caractérisé par une détérioration progressive de la fonction rénale. Elle est associée à des taux sériques élevés de toxines urémiques, tel que l'indoxyl sulfate (IS), qui peut induire plusieurs complications urémiques. L'anémie est l'une des principales complications chez les patients atteints d'IRC qui contribue aux maladies cardiovasculaires et augmente la morbi-mortalité chez ces patients. En utilisant des modèles cellulaires et précliniques, nous avons étudié les effets cellulaires et moléculaires de l'IS sur la prolifération et la différenciation des cellules érythroïdes. Tout d'abord, nous avons examiné l'effet de l'IS à des concentrations retrouvées chez ces patients (jusqu'à 250 μ M) sur la lignée cellulaire UT7/EPO. L'IS à 250 μ M a augmenté l'apoptose des cellules UT7/EPO à 48h par rapport à la condition contrôle. Ensuite, dans des cellules primaires humaines CD34⁺ traitées par l'IS et dans un modèle de souris néphrectomisées 5/6 (5/6 Nx), un blocage au stade burst-forming unit-erythroid (BFU-E) de l'érythropoïèse a été observé. Enfin, l'IS dérégule un certain nombre de gènes liés à l'érythropoïèse, tels que GATA-1, le récepteur de l'érythropoïétine (EPO-R) et la β -globine. Nos résultats suggèrent que l'IS pourrait affecter la viabilité cellulaire et la différenciation des progéniteurs érythroïdes altérant ainsi l'érythropoïèse et contribuant au développement de l'anémie dans l'IRC.

Mots clés : Indoxyl sulfate, érythropoïèse, maladie rénale chronique, progéniteurs érythroïdes, anémie, apoptose.

Abstract

Chronic kidney disease (CKD) is a global health condition characterized by a progressive deterioration of kidney function. It is associated with high serum levels of uremic toxins, such as Indoxyl Sulfate (IS), which may participate in the genesis of several uremic complications. Anemia is one of the major complications in CKD patients that contribute to cardiovascular disease and increase morbi-mortality in these patients. Using cellular and pre-clinical models, we studied cellular and molecular effects of IS on the growth and differentiation of erythroid cells. First, we examined the effect of clinically relevant concentrations of IS (up to 250 μ M) in the UT7/EPO cell line. IS at 250 μ M increased apoptosis of UT7/EPO cells at 48h compared to the control condition. Then, in IS-treated human primary CD34⁺ cells and in a 5/6 nephrectomized (5/6 Nx) mice model, a blockage at the burst-forming unit-erythroid (BFU-E) stage of erythropoiesis was also observed. Finally, IS deregulates a number of erythropoietic related genes such as GATA-1, Erythropoietin-Receptor (EPO-R), and β -globin. Our findings suggest that IS could affect cell viability and differentiation of erythroid progenitors by altering erythropoiesis and contributing to the development of anemia in CKD.

Keywords: Indoxyl sulfate, erythropoiesis, chronic kidney disease, erythroid progenitors, anemia, apoptosis.