



Influence des toxines urémiques sur la morbi-mortalité cardiovasculaire des patients en Maladie Rénale Chronique dans la cohorte CKD-REIN

Carolla El Chamieh

► To cite this version:

Carolla El Chamieh. Influence des toxines urémiques sur la morbi-mortalité cardiovasculaire des patients en Maladie Rénale Chronique dans la cohorte CKD-REIN. Santé publique et épidémiologie. Université Paris-Saclay, 2024. Français. NNT : 2024UPASR003 . tel-04625539

HAL Id: tel-04625539

<https://theses.hal.science/tel-04625539>

Submitted on 26 Jun 2024

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.

Influence des toxines urémiques sur la morbi-mortalité cardiovasculaire des patients en Maladie Rénale Chronique dans la cohorte CKD-REIN.

Influence of uremic toxins on cardiovascular morbidity and mortality in Chronic Kidney Disease patients in the CKD-REIN cohort

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°570, santé publique (EDSP)

Spécialité de doctorat : Épidémiologie

Graduate School : Santé Publique. Référent : Université de Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines

Thèse préparée dans l'unité de recherche **CESP** (Université Paris-Saclay, UVSQ,INSERM), sous la direction de **Ziad MASSY**, PU-PH, et la co-direction de **Sophie LIABEUF**, PU-PH.

Thèse soutenue à Villejuif, le 17 Juin 2024, par

Carolla El Chamieh

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Christophe SOULAGE

PU, CarMeN Lab, INSA-Lyon, INSERM,
INRA, University Claude Bernard Lyon 1

Président & Rapporteur

Stéphane BURTEY

PU-PH, C2VN, INSERM, INRAE, Aix-Marseille Université,AP-HM

Rapporteur et Examinateur

Marion PEPIN

MCU-PH,INSERM,CESP, Université Paris-Saclay,CHU Ambroise Paré

Examinateuse

Daniel TETA

PU-PH, Université de Lausanne,CHUV

Examinateur

Titre : Influence des toxines urémiques sur la morbi-mortalité cardiovasculaire des patients en Maladie Rénale Chronique dans la cohorte CKD-REIN.

Mots clés : épidémiologie; toxines urémiques; maladie rénale chronique; kynurénine; événements cardiovasculaires; inhibiteurs de pompe à protons.

Résumé : La maladie rénale chronique (MRC) est un problème majeur de santé publique, touchant plus que 10 % de la population adulte mondiale. Les patients avec une MRC ont un risque accru de morbi-mortalité cardiovasculaire, soulignant ainsi l'importance cruciale d'identifier des facteurs de risque associés. Les toxines urémiques (TUs) sont des molécules qui s'accumulent chez les patients avec une MRC, et qui ont été identifiées comme facteurs de risque cardiovasculaires spécifiques à la MRC. Une revue narrative, incluant toutes les études *in vitro*, *in vivo*, et observationnelles entre 2002 et 2022 sur le lien entre les TUs et le risque cardiovasculaire, a été réalisée au début de la thèse. Ceci nous a permis de conclure que la kynurénine, une TU liée aux protéines et dérivée du métabolisme du tryptophane, n'a jamais été étudiée chez les patients pré-dialysés. Ainsi le deuxième travail de thèse a permis d'évaluer l'association de la kynurénine avec les événements cardiovasculaires. En outre, il est essentiel de repérer les facteurs qui peuvent influencer les concentrations sériques en TUs, d'autant plus que les informations disponibles sur ce sujet sont limitées. Or les inhibiteurs de pompe à protons (IPPs), qui sont des médicaments fréquemment prescrits chez les patients avec une MRC, et certaines TUs sont éliminées par les transporteurs d'anions organiques au niveau des reins. L'hypothèse d'une potentielle interaction entre ces deux n'a jamais été évaluée dans la littérature. D'où l'intérêt du troisième travail de cette thèse qui a évalué l'association entre les IPPs et les TUs. Ces deux derniers travaux originaux ont été réalisés à partir des données de la cohorte CKD-REIN, qui est une large cohorte prospective représentative réalisée dans 40

consultations de néphrologie en France, incluant des patients avec une MRC modérée-à-avancée. Nous avons mis en évidence qu'un doublement des concentrations sériques de kynurénine libre était associée à une augmentation de 19% du rapport de risque instantané d'événement cardiovasculaire fatal ou non (466 événements, rapport de risque [IC 95 %] : 1,19 [1,03-1,39]), indépendamment du débit de filtration glomérulaire, de la concentration sérique de tryptophane libre ou d'autres TUs, des médicaments cardioprotecteurs et des facteurs de risque cardiovasculaires traditionnels. La kynurénine libre était particulièrement associée aux événements cardiovasculaires non-athéromateux (rapport de risque [IC 95 %] : 1,31 [1,09-1,6]). Cependant, nous n'avons pas retrouvé d'association significative entre la kynurénine libre et la mortalité toute cause (311 événements, rapport de risque [IC 95 %] : 1,18 [0,9-1,4]). Dans un échantillon tiré au hasard de CKD-REIN, 31 % des patients avaient des prescriptions d'IPPs à l'inclusion. Nous avons montré que les concentrations sériques de l'indoxylo sulfate libre et total, du p-crésyl glucuronide libre et total, et de la phénylacétylglutamine étaient significativement et indépendamment plus élevées chez les patients prenant des IPPs que chez ceux qui n'en prennent pas. Cette thèse souligne la nécessité de mener davantage de recherches pour comprendre les mécanismes sous-jacents de l'effet des TUs sur la santé cardiovasculaire chez les patients atteints de MRC et développer de nouveaux traitements et approches pour réduire leur impact sur la santé de ces patients.

Title : Influence of uremic toxins on cardiovascular morbidity and mortality in Chronic Kidney Disease patients in the CKD-REIN cohort.

Keywords : epidemiology; uremic toxins; chronic kidney disease; kynurenine; cardiovascular events; proton-pump inhibitors.

Abstract : Chronic kidney disease (CKD) is a major public health problem, affecting more than 10% of the worldwide adult population. Patients with CKD have an increased risk of cardiovascular morbidity and mortality, highlighting the importance of identifying associated risk factors. Uremic toxins (UTs) are molecules that accumulate in patients with CKD, and which have been identified as cardiovascular risk factors specific to CKD. A narrative review, including all *in vitro*, *in vivo*, and observational studies between 2002 and 2022 evaluating the link between UTs and cardiovascular risk, was carried out at the beginning of the thesis. This allowed us to conclude that kynurenine, a protein-bound UT derived from tryptophan metabolism, has never been studied in pre-dialysis patients. Thus the second objective of the thesis evaluated the association between kynurenine and cardiovascular events. Furthermore, it is crucial to identify factors that may influence serum concentrations of UTs, for which available information is limited. Proton pump inhibitors (PPIs), commonly prescribed for patients with CKD, and certain UTs are eliminated by the organic anion transporters in the kidneys. The hypothesis of a potential interaction between PPIs and UTs has never been assessed in the literature. Hence, our last objective was to evaluate their association. The last two objectives of the thesis were conducted using data from the CKD-REIN cohort, a large prospective cohort carried out in 40 nephrology clinics in France, including patients with moderate-to-advanced CKD. We found that a doubling of serum free kynurenine levels was

associated with an 19%-increased hazard of cardiovascular events (466 events, HR[95%CI]: 1.19 [1.03-1.39]), independently of glomerular filtration rate, serum free tryptophan level or other UTs, cardioprotective drugs and traditional cardiovascular risk factors. Serum free kynurenine was particularly associated with non-atheromatous cardiovascular events (HR[95%CI]: 1.31 [1.09-1.6]). However, we did not find a significant association between serum free kynurenine and all-cause mortality (311 events, HR[95%CI]: 1.18 [0.9-1.4]). In a randomly selected sub-cohort from the CKD-REIN cohort, 31% of patients had PPI prescriptions at baseline. We demonstrated that serum concentrations of free and total indoxylo sulfate, free and total p-cresyl glucuronide, and phenylacetylglutamine were significantly and independently higher in patients taking PPIs compared to those who were not. This thesis highlights the need for further research to understand the underlying mechanisms of the effect of UTs on cardiovascular health in patients with CKD and to develop new treatments and approaches to mitigate their impact on the health of these patients.

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier toutes les personnes qui m'ont soutenu pendant toute la durée de mon doctorat.

Je tiens tout d'abord à exprimer ma plus sincère reconnaissance à mes directeurs de thèse : les professeurs Ziad Massy et Sophie Liabeuf. Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordé pour mener ce projet de thèse, et puis surtout, votre bienveillance, votre exigence, votre expertise, et votre disponibilité depuis le début. Votre encadrement patient et enrichissant a permis l'amélioration de tous mes travaux. Je tiens aussi à vous remercier pour votre compréhension face à ma situation éloignée de ma famille et pour le soutien que vous m'avez accordé.

J'adresse mes plus chaleureux remerciements à tous les membres de l'équipe Rein-Coeur du Centre de recherche en épidémiologie et santé des populations à Villejuif. Je vous remercie Professeur Bénédicte Stengel, directrice de l'équipe, pour votre accueil chaleureux et pour tous les conseils et suivis qui ont constitué un support pour mon projet. Je tiens à remercier Natalia Alencar de Pinho pour sa gentillesse, ses conseils, et ses réponses à mes problématiques statistiques rencontrées durant ma thèse. Merci à Céline Lange pour sa collaboration et ses réponses très rapides à toutes mes demandes. Merci à Madonna Salib pour la bienveillance et la sympathie qu'elle a apportées. Merci à Marie Metzger et Oriane Lambert qui ont donné leurs avis dans quelques interrogations biostatistiques. Merci à Elodie Speyer pour l'accueil et le soutien fournis dès mon arrivée.

Je remercie tous les membres de mon jury, Monsieur le Pr Daniel Teta, Monsieur le Pr Stéphane Burtey, Monsieur le Pr Christophe Soulage, et Madame la Dr Marion Pépin qui me font l'honneur de juger mon travail.

Je remercie tous mes co-auteurs pour leurs lectures attentives, leurs critiques et commentaires qui ont permis l'amélioration de mes travaux.

Merci à Islam Amine Larabi et Jean-Claude Alvarez pour leur travail si précieux dans le dosage des toxines urémiques.

Enfin, ce travail n'aurait pu être mené sans la patience de ma famille et de mon fiancé qui sont la raison de me lever le matin à l'étranger, et ont été, au cours de cette thèse et ces années de distance, ma principale source de soutien et de courage. Merci de toujours m'avoir enseigné la persévérance et la détermination. Par-dessus tout, le plus grand soutien qu'ils m'ont donné, c'est la confiance qu'ils plaçaient en moi. La confiance en mes compétences, mes capacités à combattre toutes les difficultés dont faisait face mon pays, le Liban, et de se relever toute seule en suivant mes ambitions dans un nouveau pays, loin de tout mon entourage et de ma zone de confort. Je remercie infiniment celui qui a été à la fois mon ami, mon idole et mon fiancé. Il était présent pendant tous mes moments, de faiblesse et de force, il m'a encouragé et m'a incité à foncer dans ce projet de thèse. Il a su m'épauler pendant ces dernières années qui n'ont pas été facile. Le regard de fierté que je verrai dans les yeux de mes parents, ma sœur, ma nièce et mon fiancé, m'incitaient à tenir jusqu'au bout. Merci spécialement à ma nièce pour le bonheur et l'espoir qu'elle m'a toujours apportés. Merci à ma tante qui a su comprendre mes soucis rencontrés à l'étranger malgré sa douleur, et qui m'a rendu forte malgré sa faiblesse pour que je puisse à mon tour l'épauler jusqu'au bout et profiter de chaque moment avec elle ; je suis sûre que maintenant tu es fière de moi là-haut.

VALORISATIONS SCIENTIFIQUES

Articles publiés

El Chamieh C, Liabeuf S, Massy Z. Uremic Toxins and Cardiovascular Risk in Chronic Kidney Disease: What Have We Learned Recently beyond the Past Findings? *Toxins (Basel)*. 2022 Apr 14;14(4):280. doi: 10.3390/toxins14040280. PMID: 35448889; PMCID: PMC9028122. (**Annexe 1**)¹

El Chamieh C, Larabi IA, Alencar De Pinho N, Lambert O, Combe C, Fouque D, Frimat L, Jacquelinet C, Laville M, Laville SM, Lange C, Alvarez J-C, Massy ZA, Liabeuf S on behalf of the Chronic Kidney Disease-Renal Epidemiology and Information Network (CKD-REIN) Study Group. Study of the association between serum levels of kynurenine and cardiovascular outcomes and overall mortality in chronic kidney disease. *Clin Kidney J.* 2023 Sep 28;17(1):sfad248. doi: 10.1093/ckj/sfad248. PMID: 38186868; PMCID: PMC10768787. (**Annexe 2**)²

El Chamieh C, Larabi IA, Laville SM, Jacquelinet C, Combe C, Fouque D, Laville M, Frimat L, Pecoits-Filho R, Lange C, Stengel B, Alencar De Pinho N, Alvarez JC, Massy ZA, Liabeuf S; Chronic Kidney Disease-Renal Epidemiology and Information Network (CKD-REIN) Study Group. Proton-Pump Inhibitors and Serum Concentrations of Uremic Toxins in Patients with Chronic Kidney Disease. *Toxins (Basel)*. 2023 Apr 7;15(4):276. doi: 10.3390/toxins15040276. PMID: 37104214; PMCID: PMC10143607. (**Annexe 3**)³

Communications orales

El Chamieh C, Larabi IA, Laville SM, Jacquelinet C, Combe C, Fouque D, Laville M, Frimat L, Pecoits-Filho R, Lange C, Stengel B, Alencar De Pinho N, Alvarez JC, Massy ZA, Liabeuf S; Chronic Kidney Disease-Renal Epidemiology and Information Network (CKD-REIN) Study Group. Proton-Pump Inhibitors and Serum Concentrations of Uremic Toxins in Patients with Chronic Kidney Disease. *Toxins (Basel)*. 2023 Apr 7;15(4):276. doi: 10.3390/toxins15040276. PMID: 37104214; PMCID: PMC10143607. -Communication orale au séminaire de l'équipe « épidémiologie clinique » du CESP-INSERM U1018 en décembre 2022, Villejuif, France.

-Communication orale au congrès européen de néphrologie (ERA), Juin 2023, Milan-Italie.

Communications affichées

El Chamieh C, Larabi IA, Alencar De Pinho N, Lambert O, Combe C, Fouque D, Frimat L, Jacquelinet C, Laville M, Laville SM, Lange C, Alvarez J-C, Massy ZA, Liabeuf S on behalf of the Chronic Kidney Disease-Renal Epidemiology and Information Network (CKD-REIN) Study Group. Study of the association between serum levels of kynurenine and cardiovascular outcomes and overall mortality in chronic kidney disease. *Clin Kidney J.* 2023 Sep 28;17(1):sfad248. doi: 10.1093/ckj/sfad248. PMID: 38186868; PMCID: PMC10768787.

-Communication affichée au congrès de l'American Society of Nephrology, Novembre 2023, Philadelphie - Etats-Unis.

Table des matières

Remerciements	3
Valorisations scientifiques	4
Liste des figures	7
Liste des tableaux	9
Liste des abréviations.....	10
1 Chapitre 1 : Introduction	12
1.1 Généralités sur la maladie rénale chronique	12
1.1.1 Définition, stades de la maladie rénale chronique et étiologies	12
1.1.2 Épidémiologie de la maladie rénale chronique	16
1.1.3 Complications de la maladie rénale chronique	21
1.2 Généralités sur les toxines urémiques.....	29
1.2.1 Définition et classification des toxines urémiques	29
1.2.2 Toxines urémiques d'origine exogène.....	33
1.2.3 Toxines urémiques d'origine intestinal	35
1.2.4 Facteurs modulant les concentrations sériques en toxines urémiques	43
1.3 Polypharmacie chez les patients en maladie rénale chronique.....	44
1.4 CKD-REIN : cohorte de patients atteints de maladie rénale chronique.....	48
1.5 Les objectifs	50
2 Chapitre 2 : Effet des toxines urémiques sur le risque cardiovasculaire	52
2.1 Résumé.....	52
2.2 Introduction	52
2.3 Méthodes.....	54
2.4 Résultats	55
2.4.1 Maladies cardiovasculaires.....	55
2.4.2 Toxines urémiques et risque de maladies cardiovasculaires	56
2.5 Conclusion.....	69
3 Chapitre 3: Kynurénine et risque d'évènements cardiovasculaires	70
3.1 Résumé.....	70
3.2 Introduction	71
3.3 Méthodes.....	72
3.3.1 Population.....	72
3.3.2 Collection des données	74
3.3.3 Quantification des toxines urémiques et du tryptophane	76
3.3.4 Evaluation des évènements d'intérêts	77
3.3.5 Analyse statistique.....	79
3.4 Résultats.....	86
3.4.1 Caractéristiques des patients à l'inclusion.....	86
3.4.2 Evènements cardiovasculaires fatals ou non fatals	94
3.4.3 Analyse par sous-groupes des évènements athéromateux et non-athéromateux ...	96
3.4.4 Mortalité toute cause	98
3.4.5 Analyse par sous-groupes de mortalité cardiovasculaire et non cardiovasculaire....	99
3.5 Discussion.....	101
4 Chapitre 4: Inhibiteurs de pompe à protons et toxines urémiques.....	108
4.1 Résumé.....	108
4.2 Introduction	109
4.3 Méthodes.....	110
4.3.1 Population.....	110
4.3.2 Collection des données	111
4.3.3 Prescription de médicaments.....	111
4.3.4 Quantification des toxines urémiques	112
4.3.5 Analyse statistique.....	112
4.4 Résultats...	113

4.4.1	Caractéristiques des patients à l'inclusion.....	113
4.4.2	Analyses univariées	117
4.4.3	Analyses multiples.....	119
4.5	Discussion.....	120
5	Discussion générale et conclusion	126
5.1	Principaux résultats	126
5.2	Forces et limites	128
5.3	Implication et Perspectives	131
5.4	Conclusion.....	138
Bibliographie		141
Annexe.....		171

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Stades de la maladie rénale chronique selon les catégories de débit de filtration glomérulaire et d'albuminurie.

Figure 2 : Prévalence de la maladie rénale chronique stade 3 non diagnostiquée selon le pays, (A) globalement et (B) par sexe.

Figure 3 : Nombre (A) et taux (B) de l'espérance de vie corrigée de l'incapacité pour la maladie rénale chronique selon la cause en 1990 et 2017.

Figure 4 : Risques relatifs de mortalité toute cause et de mortalité cardiovasculaire selon le débit de filtration glomérulaire et l'albuminurie dans des cohortes en population générale.

Figure 5 : Modèle conceptuel de la maladie rénale chronique.

Figure 6 : Mortalité cardiovasculaire dans la population générale et chez les patients dialysés.

Figure 7 : Athérosclérose dans les patients atteints de maladie rénale chronique et dans les individus avec une fonction rénale normale.

Figure 8 : Altération du microbiote intestinal durant la maladie rénale chronique et production de toxines urémiques.

Figure 9 : Voies métaboliques du tryptophane.

Figure 10 : Voie de l'AhR et toxicité endothéliale.

Figure 11 : Métabolisme et excrétion de l'indoxylo sulfate, p-cresyl sulfate, acide hippurique et TMAO.

Figure 12 : Emplacement des transporteurs d'anions organiques au niveau des reins.

Figure 13 : Compétition entre les médicaments et les toxines urémiques au niveau des transporteurs d'anions organiques des reins.

Figure 14 : Description schématique des effets des toxines urémiques sur les maladies cardiovasculaires dans la maladie rénale chronique.

Figure 15 : Diagramme de flux de l'étude.

Figure 16 : Graphe acyclique dirigé identifiant les facteurs d'ajustements minimaux suffisants pour estimer l'effet de la kynurénine sur les évènements cardiovasculaires, qu'ils soient athéromateux ou non, fatals ou non.

Figure 17 : Graphe acyclique dirigé identifiant les facteurs d'ajustements minimaux suffisants pour estimer l'effet de la kynurénine sur la mortalité toute cause/cardiovasculaire/non cardiovasculaire.

Figure 18 : Distribution de la kynurénine selon les stades de la maladie rénale chronique.

Figure 19 : Distribution du rapport kynurénine libre/totale selon les stades de la maladie rénale chronique.

Figure 20 : Distribution du tryptophane selon les stades de la maladie rénale chronique.

Figure 21 : Distribution du rapport kynurénine/tryptophane libre selon les stades de la maladie rénale chronique.

Figure 22 : Hazard Ratio des évènements cardiovasculaires associé à un doublement des concentrations sériques de kynurénine libre (mg/L).

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Causes de l'anémie en situation de maladie rénale chronique.

Tableau 2 : Classification des principales toxines urémiques.

Tableau 3 : Concentrations normales des principales toxines urémiques.

Tableau 4 : Affinité des toxines urémiques pour l'OAT1 et l'OAT3.

Tableau 5: Caractéristiques de la population étudiée selon les tertiles de la kynurénine sérique libre.

Tableau 6: Hazard Ratio des évènements cardiovasculaires athéromateux associé à un doublement des concentrations sériques de kynurénine libre (mg/L).

Tableau 7 : Hazard Ratio des évènements cardiovasculaires non-athéromateux associé à un doublement des concentrations sériques de kynurénine libre (mg/L).

Tableau 8 : Hazard Ratio de la mortalité toute cause associé à un doublement des concentrations sériques de kynurénine libre (mg/L).

Tableau 9 : Hazard Ratio de la mortalité non cardiovasculaire associé à un doublement des concentrations sériques de kynurénine libre (mg/L).

Tableau 10 : Hazard Ratio de la mortalité cardiovasculaire associé à un doublement des concentrations sériques de kynurénine libre (mg/L).

Tableau 11 : Types des inhibiteurs de pompe à protons, affinité aux OAT1/OAT3, et liaison aux protéines plasmatiques.

Tableau 12 : Caractéristiques à l'inclusion de la population étudiée selon l'utilisation ou pas des inhibiteurs de pompe à protons.

Tableau 13 : Description des types de prescription d'IPP.

Tableau 14 : Concentrations sériques médianes des toxines urémiques selon l'utilisation des inhibiteurs de pompe à protons à l'inclusion.

Tableau 15 : Coefficients bruts et ajustés des concentrations des toxines urémiques log-normalisées associées aux inhibiteurs de la pompe à protons.

LISTE DES ABBREVIATIONS

ACR	Ratio albuminurie/creatininurie
AhR	Aryl hydrocarbon Receptor
AVC	Accidents vasculaires cérébraux
CE	Cellule endothéliale
CKD-EPI	Chronic Kidney Disease-Epidemiology Collaboration
CKD-REIN	Chronic Kidney Disease–Réseau Épidémiologie et Information en Néphrologie
CMPF	Acide 3-carboxy-4-éthyl-5-propyl-2-furanpropanoïque
CRP	C-Reactive Protein
DAG	Directed acyclic graph
DFGe	Débit de filtration glomérulaire estimé
EUTox	European Uremic Toxin Work Group
FGF-23	Fibroblast growth factor 23
HA	Acide hippurique
HDL	High-density lipoprotein
HR	Hazard Ratio
HTA	Hypertension artérielle
IAA	Acide indole-3-acétique
IC	Intervalle de confiance
IDM	Infarctus du myocarde
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygénase
IMC	Indice de masse corporel
INSERM	Institut national de la santé et de la recherche médicale

IPP	Inhibiteurs de pompe à protons
IS	Indoxyl sulfate
KA	Acide kynurénique
KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcomes
MCV	Maladies cardiovasculaires
MRC	Maladie rénale chronique
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
OAT	Organic anion transporter
PAG	Phénylacétylglutamine
PCS	p-crésyl sulfate
PCG	p-cresyl glucuronide
Registre REIN	Registre Réseau Epidémiologie et Information en Néphrologie
TDO	Tryptophane 2,3-dioxygénase
TMAO	Trimethylamine-N-oxide
TUs	Toxines urémiques

1 CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1.1 GÉNÉRALITÉS SUR LA MALADIE RÉNALE CHRONIQUE

1.1.1 Définition, stades de la maladie rénale chronique et étiologies

L'organisation internationale *Kidney Disease: Improving Global Outcomes* (KDIGO) a élaboré des consignes et des recommandations promulguant des définitions, des évaluations, et des classifications des maladies touchant le rein, entre autre la maladie rénale chronique (MRC). En juin 2019, KDIGO a convoqué des participants internationaux, experts en santé rénale, à une conférence de consensus dans le but d'uniformiser la nomenclature qui décrit la MRC à être utilisée par tous les journaux internationaux⁴.

La MRC est ainsi définie par des anomalies de la structure ou de la fonction rénale pour plus que 3 mois, impliquant une baisse progressive et irréversible des capacités de filtration des reins et empêchant donc une filtration optimale des molécules sanguins. Le débit de filtration glomérulaire estimé (DFGe) est le volume de plasma filtré par le rein par unité de temps, et sa valeur s'avère un marqueur de la fonction rénale puisque le DFGe est corrélé au nombre de néphrons fonctionnels. En d'autres termes, la MRC correspond à une réduction du DFGe en-dessous de 60 mL/min/1,73m² et/ou de la présence d'un ou plus des marqueurs d'atteinte rénale : les marqueurs biologiques comme l'albuminurie, la protéinurie, l'hématurie après élimination de cause urologique (globules rouges > 10/mm³ ou 10 000/ml), les électrolytes et autres anomalies dues à des troubles tubulaires, la leucocyturie en l'absence d'infection (globules blancs > 10/mm³ ou 10 000/ml), les anomalies des sédiments urinaires, les anomalies détectées par histologie, les marqueurs morphologiques visibles lors d'une échographie rénale (taille et forme des reins, asymétrie de taille, contours bosselés), pour une durée supérieure à trois mois⁴. Cette diminution du DFGe entraîne l'accumulation des solutés dans le plasma, notamment les toxines urémiques (TUs).

Les stades de la MRC sont classifiés selon le niveau de DFGe (G1-G5), et le niveau d'albuminurie (A1-A3), pour atteindre le stade terminal durant lequel une mise en place d'un traitement de suppléance par dialyse ou par transplantation sera requise⁴ (**Figure 1**). Le

ratio de l'albuminurie sur la créatininurie (ACR) est couramment utilisé pour décrire le niveau d'albuminurie et représente un marqueur de risque cardiovasculaire et pronostique ; il sert à évaluer le risque d'évolution de la MRC⁴.

Stades de la MRC selon le DFGe (mL/min/1.73m ²)	Catégories d'albuminurie			
	A1	A2	A3	
	Normale à légèrement augmentée	Modérément augmentée	Augmentation importante	
1	Normal ou élevé ≥ 90	<30 mg/g <3 mg/mmol	30 – 300 mg/g 3 – 30 mg/mmol	>300 mg/g >30 mg/mmol
2	Légèrement diminué $60 – 89$			
3A	Légèrement à modérément diminué $45 – 59$			
3B	Modérément à sévèrement augmenté $30 – 44$			
4	Diminution importante $15 – 29$			
5	Défaillance rénale <15			

Vert : faible risque de progression (en l'absence d'autres marqueurs d'atteinte rénale, pas de MRC); Jaune : Risque modéré de progression ; Orange : Risque élevé de progression ; Rouge : Risque très élevé de progression. Traduit de KDIGO, 2012⁵

Figure 1 : Stades de la maladie rénale chronique selon les catégories de débit de filtration glomérulaire et d'albuminurie.

Différentes équations sont présentes pour permettre l'estimation du DFG, dont celle qui a été le plus fréquemment recommandée⁶ et utilisée qui est l'équation *Chronic Kidney Disease-Epidemiology Collaboration* (CKD-EPI, 2009) utilisant la créatinine sérique dosée⁷. Cette dernière résulte d'un produit du catabolisme de la phosphocréatine présente dans les muscles, qui sera physiologiquement excrétée par les reins par filtration glomérulaire dans les urines. L'équation CKD-EPI prend en compte aussi l'origine ethnique du patient, son âge, et son sexe. Néanmoins, cette équation doit être utilisée avec précaution dans certaines populations, dont : les patients de type non caucasien, ceux âgés de plus de 75 ans, les

patients de poids ou de masse musculaire extrême (élevée ou faible), les patients dénutris ou ayant une alimentation pauvre en protéines animales, en les confrontant avec la clinique et avec le résultat des autres examens^{6,8}. En plus, les formules CKD-EPI utilisant la cystatine C, seule ou en combinaison avec la créatinine, ont récemment été montrées plus performantes que les formules contenant de la créatinine seule dans l'estimation du DFG⁹. La cystatine C est considérée comme un marqueur sanguin plus sensible de la fonction rénale que la créatinine. Elle est libérée par chaque cellule du corps, est librement filtrée au niveau du glomérule et n'est pas influencée par la masse musculaire, l'âge, le sexe, ou les origines ethniques. Sachant que la mesure de la cystatine C est plus coûteuse que celle de la créatinine, elle n'a pas été largement adoptée dans la pratique clinique, probablement en raison de l'incertitude autour de la valeur ajoutée d'un biomarqueur plus coûteux. Sauf que des études récentes sont de plus en plus effectuées afin d'évaluer la place de la cystatine C dans une meilleure estimation du DFG. Ainsi, il a été conclu que le DFGe calculé à partir de la cystatine C seule est plus informatif sur le plan clinique pour prédire les maladies cardiovasculaires (MCV) et la mortalité¹⁰. En 2021, une étude propose de nouvelles équations du DFGe tout en omettant la race¹¹, et conclue que l'équation incluant la créatinine et la cystatine C ensemble, donne une estimation plus précise que celles avec la créatinine ou la cystatine C seules. Cependant, cette étude a été critiquée pour son application chez les patients Européens¹² par une étude plus récente.

Malgré l'importance du dépistage de la MRC afin de limiter sa progression et ses éventuelles complications, il reste difficile de retrouver sa date d'apparition ou sa cause direct. C'est une maladie silencieuse, d'évolution progressive et irréversible, dont les symptômes ne sont perceptibles qu'à un stade déjà avancé¹³.

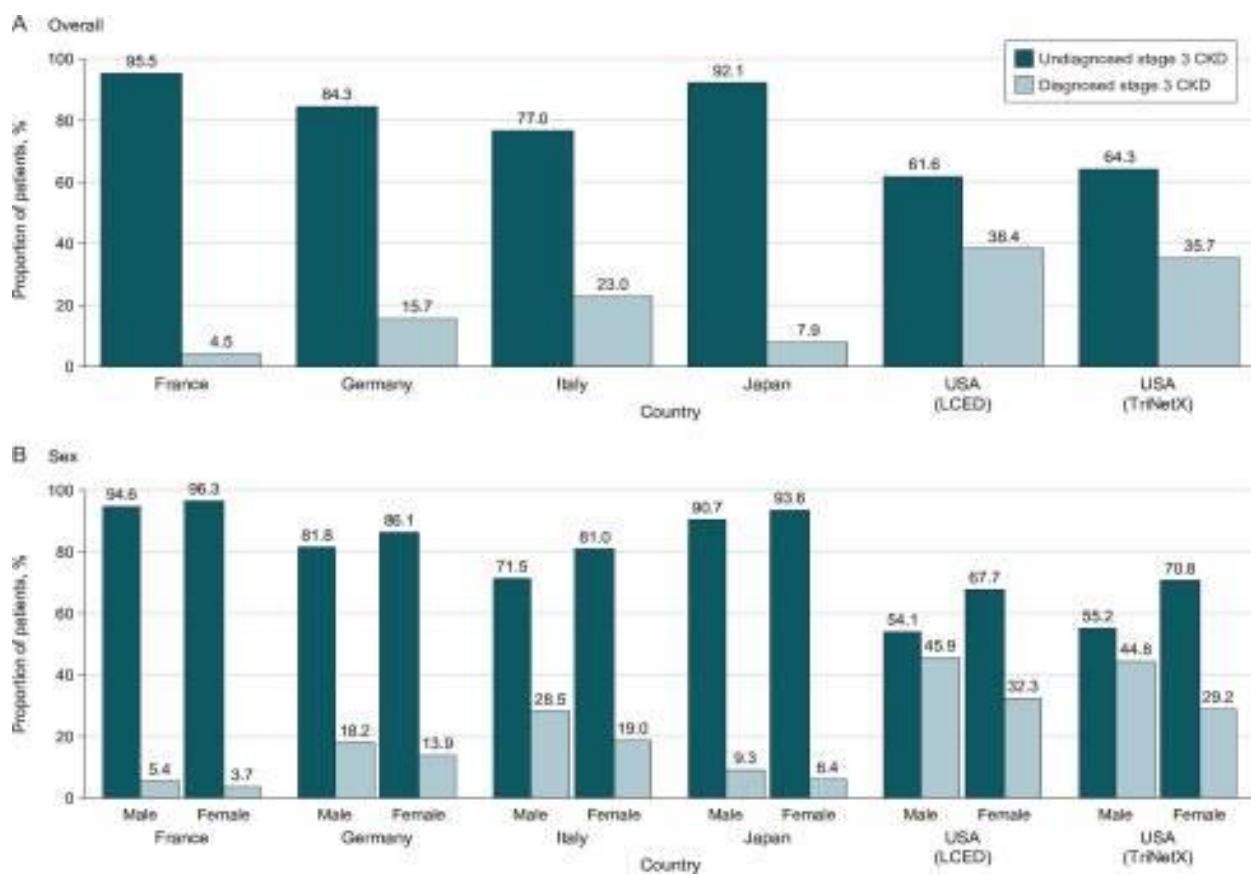
Il existe de multiples étiologies potentielles de MRC, dont le diabète et l'hypertension artérielle (HTA), qui représentent les deux principales causes à l'échelle mondiale¹⁴. Ces derniers sont responsables de lésions des artères qui détruisent les glomérules rénaux. En France, ces deux maladies sont responsables de près d'un cas sur deux de MRC¹³. L'âge (supérieur à 60 ans), l'obésité, les MCV, les épisodes d'insuffisance rénale aiguë, les antécédents familiaux de MRC, un petit poids de naissance et/ou une prématurité sont aussi

associés à une augmentation de risque de MRC^{13,15}. Il est important de noter qu'il existe un déclin naturel de la fonction rénale à partir de 40 ans qui est indépendant de toute maladie rénale. D'autres facteurs environnementaux peuvent être responsables d'une détérioration rénale aboutissant à la MRC, entre autres, le tabac, l'alcool, la sédentarité, une prise de médicament toxique pour le rein comme les anti-inflammatoires, ou l'exposition à des substances toxiques notamment les produits de contraste iodés, la radiothérapie ciblée sur les reins, ou les métaux lourds professionnels en particulier le plomb et le mercure¹³. Ces derniers ainsi que d'autres causes infectieuses (traitements antirétroviraux, hépatites B et C...) touchent surtout les pays en voie de développement¹⁵. Il existe aussi des causes génétiques de MRC, qui peuvent apparaître dès la naissance suite à des anomalies congénitales, ou plus tard dans la vie ; par exemple suite à une polykystose rénale autosomique dominante¹⁵. Certaines maladies seront elles-mêmes responsables d'une atteinte rénale : des maladies inflammatoires d'origine auto-immune comme le lupus et la polyarthrite rhumatoïde, des pyélonéphrites à répétition, une glomérulonéphrite, ou un obstacle chronique dans les voies urinaires suite à une lithiase rénale ou suite à une malformation des voies urinaires¹³.

Les étiologies possibles de MRC sont donc variées, il est important d'effectuer des dépistages chez les patients à risque afin d'améliorer la prise en charge et surtout, limiter la progression de la maladie.

1.1.2 Épidémiologie de la maladie rénale chronique

Comme précédemment évoqué, la MRC est une maladie silencieuse, ce qui explique la complexité d'estimer la prévalence pour les stades précoces. La prévalence des patients non diagnostiqués au stade 3 de la MRC est de 95,5% en France et de 61,6% aux Etats-Unis¹⁶ (**Figure 2**). Ceci a été associé au sexe féminin sans histoire médicale de diabète ou d'HTA¹⁶.



D'après Tangri et al., 2023¹⁶.

Figure 2 : Prévalence de la maladie rénale chronique stade 3 non diagnostiquée selon le pays, (A) globalement et (B) par sexe.

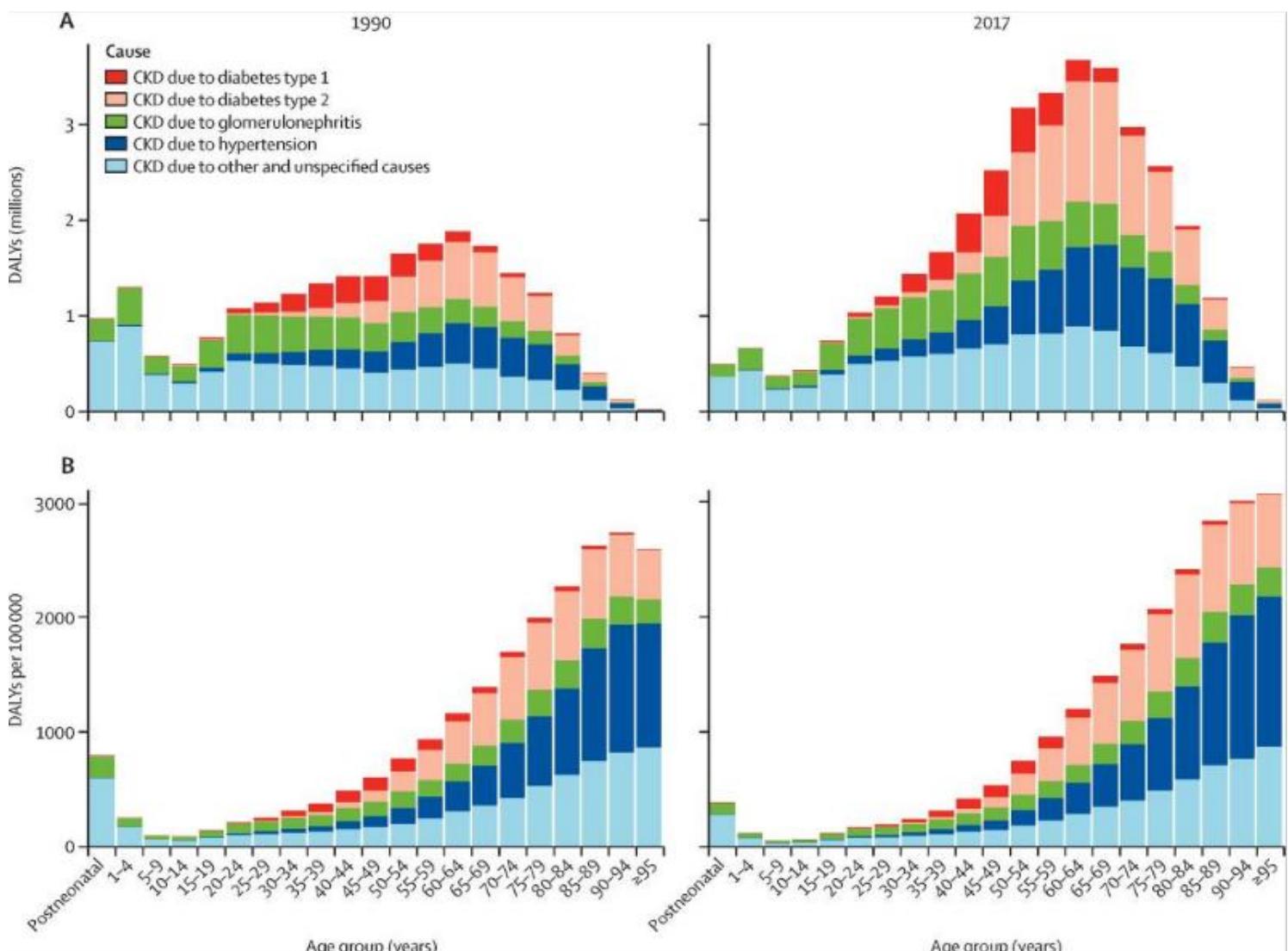
De plus, la prévalence et l'incidence de la MRC diffèrent selon les pays^{15,17}, l'ethnicité et les déterminants sociaux intra-pays et l'accès aux soins de santé¹⁵. Malgré tout, selon les derniers rapports en 2022, la prévalence mondiale de la MRC ne cesse de croître durant les dernières années, pour représenter une prévalence supérieure à 10 % de la population mondiale¹⁸, touchant plus que 850 millions de personnes¹⁹⁻²² majoritairement au stade 3^{15,17}.

Une première estimation de MRC en France était fournie par l'étude MONA LISA, avec une prévalence de 8,2 % parmi les sujets entre 35 à 75 ans, qui reste quand même une prévalence sous-estimée à cause des biais de sélection²³. Ensuite, une cohorte française des Trois-Cités incluant 8705 participants âgés de 65 ans et plus, de Bordeaux, Dijon, et Montpellier, estime une prévalence de MRC de 12,9% dans cette population²⁴. Entre 2014 et 2016, l'étude Esteban réalisée en France métropolitaine incluant des participants entre 18 et 74 ans, estime une prévalence de MRC stades 3 à 5 sans traitement de suppléance rénale entre 1,5 et 2,1 %²⁵. D'après le ministère de la santé et de la prévention en France, les derniers chiffres évoquent que la MRC touche 1/10 de cette population en 2022 en devenant l'une des principales causes de décès en France²⁶⁻²⁸. Selon le centre de contrôle des maladies et de prévention (CDC) en 2023, la MRC est encore plus fréquente aux Etats-Unis avec une prévalence de 14%, soit 1 adulte sur 7 touché²⁹.

La prévalence de MRC, stades G1-G5, augmente avec l'âge pour être plus élevée chez les patients âgés de 65 ans ou plus²⁹⁻³¹. Une méta-analyse représentant près de 50 % de la population mondiale adulte de plus de 20 ans, a estimé que la prévalence mondiale de MRC standardisée sur l'âge est plus élevée chez les femmes que chez les hommes (10,4% [Intervalle de confiance à 95% (IC95%) : 9,3-11,9] vs 11,8 % [11,2-12,6] respectivement)³¹. Néanmoins, les hommes et les femmes avaient des prévalences similaires avant 50 ans, âge au-delà duquel la prévalence chez les femmes étaient plus élevées que chez les hommes, et cette différence entre les sexes continue à augmenter avec l'âge^{29,31}.

Le diabète et l'HTA sont les facteurs de risque les plus prévalents de la MRC et de sa progression. L'HTA était le principal facteur de risque de MRC en Asie de l'Est, en Europe de l'Est, en Amérique latine tropicale et en Afrique subsaharienne occidentale, alors que le diabète représentait la plus grande proportion dans toutes les autres régions³⁰. Ces deux maladies sont responsables de près d'un cas sur deux de MRC et de progression vers le stade terminal en France¹². Plus généralement, la MRC due au diabète représentait la plus grande contribution mondiale en nombre absolu de l'espérance de vie corrigée de l'incapacité de toute cause de MRC en 2017, estimé à 30,7 %, avec le diabète de type 2 entraînant 8,1 millions espérance de vie corrigée de l'incapacité (**Figure 3A**)³⁰. Ce dernier

était la seule cause de MRC à montrer une augmentation significative du taux de l'espérance de vie corrigée de l'incapacité standardisé sur l'âge, en s'élevant de 9,5 % entre 1990 et 2017 (**Figure 3B**).



DALY : disability-adjusted life-year. CKD : chronic kidney disease.

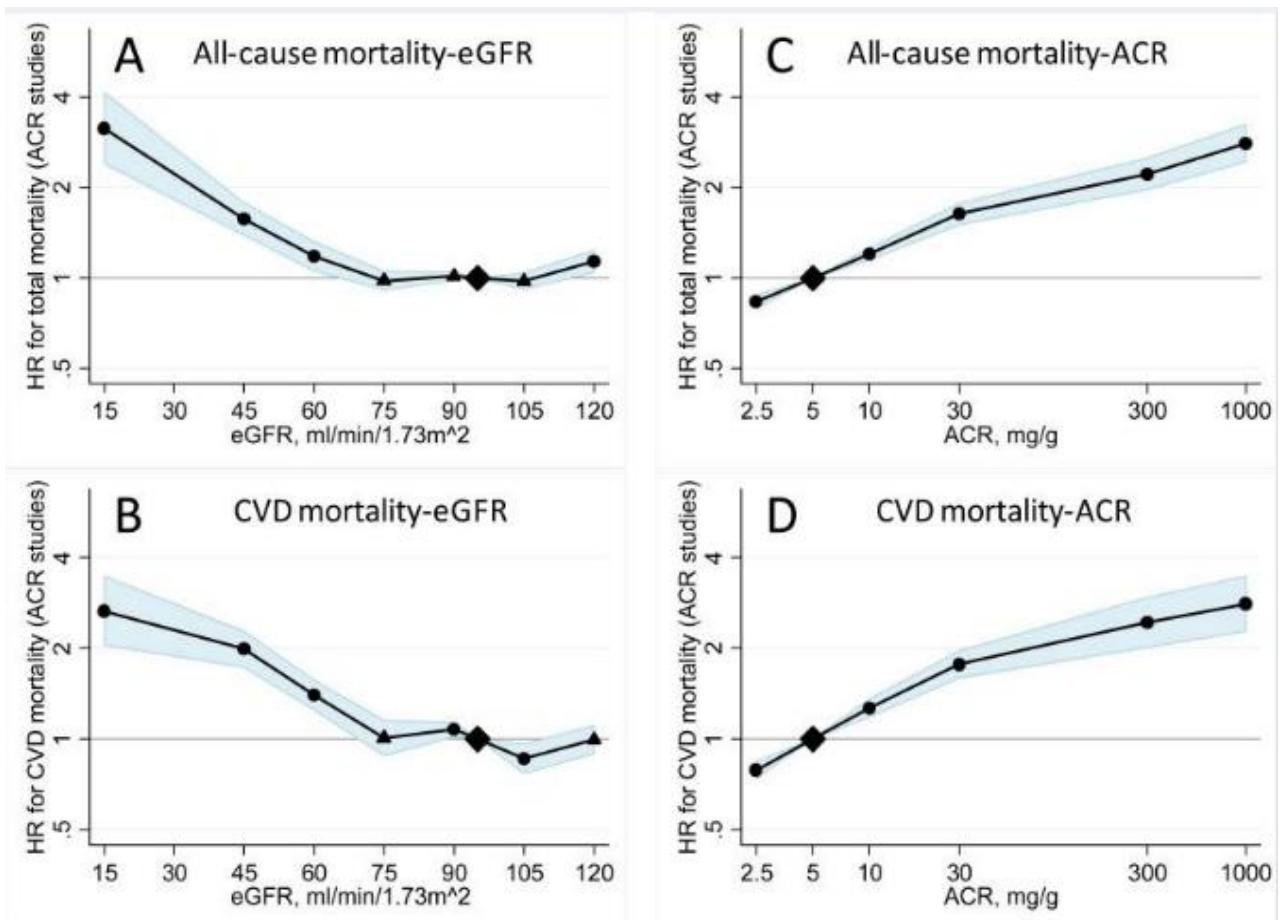
D'après « The global burden of Chronic Kidney Disease Collaboration », 2020³⁰

Figure 3 : Nombre (A) et taux (B) de l'espérance de vie corrigée de l'incapacité pour la maladie rénale chronique selon la cause en 1990 et 2017.

Un article récemment publié effectue une synthèse sur les rapports annuels (20 ans) du registre Réseau Epidémiologie et Information en Néphrologie (REIN) qui est le registre national en France de l'incidence de la maladie rénale chronique stade 5 traitée par suppléance ainsi que le suivi de la survie des patients après initiation de ces traitements³². Le taux d'incidence de défaillance rénale est de 166 par million d'habitants en 2020, traités

par dialyse (56%) ou par greffe (44%)^{32,33}. Même si le risque d'atteindre ce stade est aux alentours de 1,4%, ce qui est relativement faible, mais ce dernier est caractérisé par un taux de mortalité très élevé (10,6%). En Europe, l'incidence de défaillance rénale s'est élevée de 1,1 % par an entre 2001 et 2008, pour qu'une baisse d'incidence soit ensuite observée entre 2008 et 2011 (-2,2 % par an) principalement chez les patients entre 45 à 74 ans. Malgré l'augmentation d'incidence des personnes diabétiques de 3,6 % par an en France entre 2012 et 2018, l'incidence standardisée sur l'âge et le sexe de défaillance rénale était stable. Ce taux diminue de 5,8 % par an depuis 2018, partiellement lié à la baisse d'incidence chez les personnes non diabétiques (-6,9 % par an) et les personnes de plus de 85 ans (-6,6 % par an). Les patients âgés de 65-74 ans représentent en nombre absolu la plus grande augmentation d'incidence jusqu'en 2019 (+5,8 % par an). La moitié des cas incidents de démarrage du traitement (par dialyse ou greffe préemptive) sont âgés de 70 ans³².

La MRC est l'une des principales causes non transmissibles de décès mondial avec son rang qui ne cesse de croître, par la part du vieillissement de la population et d'un fardeau croissant de facteurs de risque de MRC³⁰. Alors que la MRC était au 36e rang de cause d'années potentielles de vie perdues (calculée à partir du nombre de décès attribuables à la MRC et de l'espérance de vie des individus de divers groupes d'âge au moment de leur décès) en 1990, le taux de décès lié à cette maladie a augmenté de 41,5% jusqu'en 2017 la plaçant ainsi à la 12^e place des causes de décès mondiales avec près de 1 230 168 décès enregistrés, dont 960 000 étaient directement liés à la maladie. Selon les prédictions, la MRC deviendra la 5^e cause d'années potentielles de vie perdues d'ici 2040^{21,34}. Le taux de mortalité est nettement plus élevé chez les patients dialysés que ceux ayant subi une greffe rénale. En 2016, 125 patients dialysés sur 1000 sont décédés entre 60 et 69 ans, contre 26 sur 1000 patients transplantés du même âge³². Le risque de mortalité toute cause et de mortalité cardiovasculaire augmente plus le DFGe diminue et l'ACR augmente (**Figure 4**).



Tous les hazards ratios sont ajustés sur l'âge, le sexe, la race, les antécédents cardiovasculaires, la pression artérielle systolique, le diabète, le tabagisme et le cholestérol total. La référence du DFG était 95 ml/min/1,73 m² et de l'ACR de 5 mg/g (0,6 mg/mmol). Les points représentent une valeur statistiquement significative et les triangles une valeur non significative.

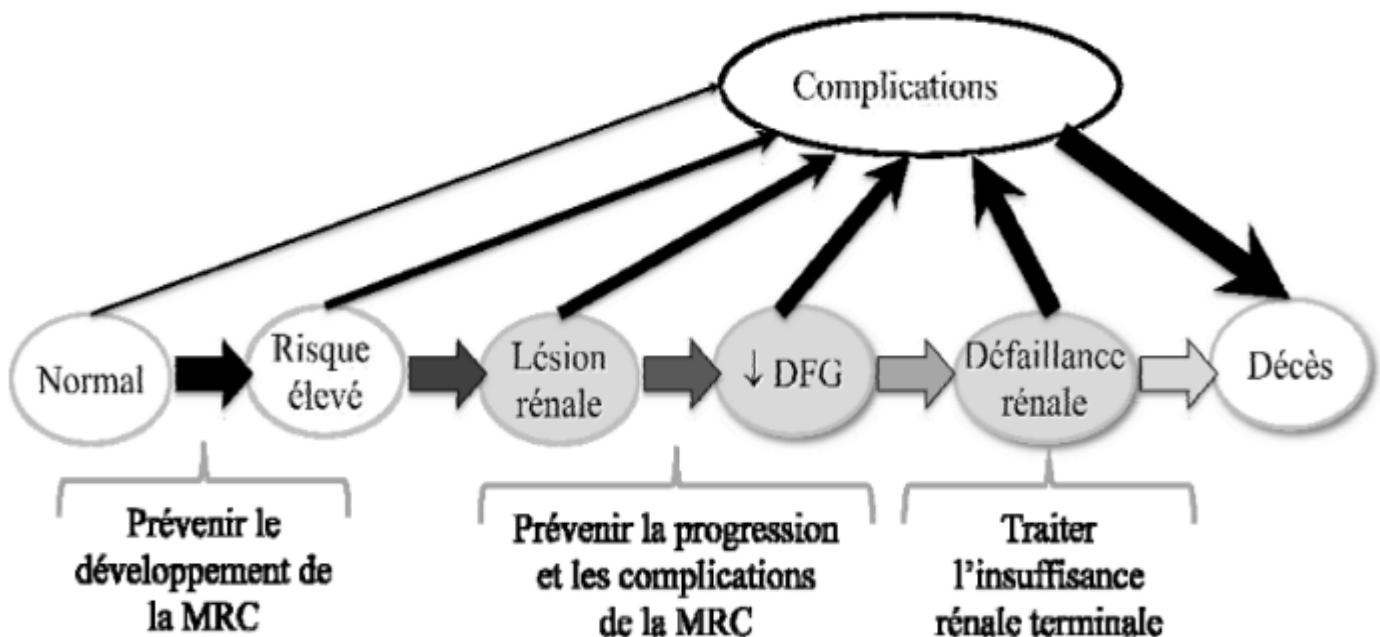
DFGe : Débit de filtration glomérulaire estimé ; ACR : ratio albuminurie/créatininurie ; HR : hazard ratio ; MCV : maladie cardiovasculaire. D'après CKD-PC, 2010³⁵.

Figure 4 : Risques relatifs de mortalité toute cause et de mortalité cardiovasculaire selon le débit de filtration glomérulaire et l'albuminurie dans des cohortes en population générale.

L'association entre les MCV et la MRC forme un cercle vicieux : sachant que les MCV sont parmi les facteurs de risque de MRC, mais aussi, la MRC augmente le risque des MCV de 2 à 4 fois³⁶ pour que ces derniers représentent la première cause de mortalité chez les patients atteints de MRC¹⁷. En effet, ces patients ont plus de risque de décéder (notamment de MCV) que de progresser jusqu'à la défaillance rénale³⁶.

1.1.3 Complications de la maladie rénale chronique

Le consortium « Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium » (CKD-PC)³⁷ a proposé un modèle conceptuel qui décrit bien que la MRC est une maladie évolutive, et que sa progression entraîne avec elle de nombreuses complications (**Figure 5**).



Les ellipses ombrées représentent les stades de la MRC ; les ellipses non ombrées représentent les antécédents ou les conséquences de la MRC. Les flèches épaisses entre les ellipses représentent les « facteurs de risque » associés à l'initiation et à la progression de la maladie qui peuvent être affectés ou détectés par des interventions : facteurs de susceptibilité (noir) ; facteurs d'initiation (gris foncé); facteurs de progression (gris clair) ; et les facteurs de stade final (blanc).

MRC : maladie rénale chronique ; DFG : débit de filtration glomérulaire.

Traduite et adaptée d'après Levey et al, 2009³⁷.

Figure 5 : Modèle conceptuel de la maladie rénale chronique

Les complications de la MRC sont fréquentes et multiples, y compris les complications endocrines et métaboliques (HTA, anémie, hyperkaliémie, hyperphosphatémie, hypoalbuminémie, hypocalcémie, l'hyperparathyroïdisme..), les complications cardiovasculaires, les infections, et le déclin cognitif³⁸⁻⁴⁰. Leurs fréquences augmentent avec la progression de la MRC, pour atteindre aux alentours de 80% pour l'HTA, 50% pour l'anémie, 20% pour l'hyperparathyroïdisme et l'hyperphosphatémie, 30% pour l'acidose, et 5 à 10% pour l'hypocalcémie et l'hypoalbuminémie au stade 4 de la maladie⁴¹.

1.1.3.1 Complications non cardiovasculaires de la maladie rénale chronique

Défaillance Rénale

La progression de la MRC vers le stade 5 associée à la mise en place d'un traitement de suppléance rénale, la dialyse ou la transplantation rénale, définit la défaillance rénale qui est une complication majeure de la MRC.

Les derniers travaux du consortium CKD-PC ont mis en évidence des facteurs de risque de progression de la MRC vers la défaillance rénale^{35,42}. Une méta-analyse, incluant plus de deux millions d'individus, a démontré qu'un DFGe bas ainsi qu'une albuminurie élevée sont indépendamment associés à des risques significativement élevés de progression vers la défaillance rénale, quelle que soit la tranche d'âge⁴². Le sexe masculin est un facteur important de progression du stade avancé de la MRC à la défaillance rénale⁴³. Le diabète ou l'HTA incontrôlés augmentent significativement le risque de défaillance rénale⁴³. En plus, les diètes riches en protéines sont des facteurs associés à la progression vers la défaillance rénale⁴⁴.

L'âge affecte extrêmement la probabilité de survie des patients en défaillance rénale qui est de 93% après un an d'initiation du traitement de suppléance chez les patients de moins de 65 ans contre 78% chez les plus de 65 ans. Ces taux diminuent après 5 ans d'initiation au traitement, passant à 77% et 35% respectivement³². La différence de survie dépend également de la présence d'une ou plusieurs comorbidités à l'initiation du traitement de suppléance³².

Complications métaboliques

L'anémie causée par une MRC s'associe à une diminution de la qualité de vie ainsi qu'à l'augmentation du risque de MCV et de décès⁴⁵. Elle se définit par un déficit d'hémoglobine sérique à moins que 12g/dL chez la femme et que 13g/dL chez l'homme⁴⁶, avec une prévalence qui augmente avec les stades de MRC pour passer de 17,4% à 53,4% du stade 3 au stade 5 respectivement, selon l'étude National Health and Nutrition

Examination Survey⁴⁷. Bien que le déficit d'érythropoïétine (hormone stimulant l'érythropoïèse normalement sécrétée par les reins), est la principale cause d'anémie chez les MRC, d'autres facteurs peuvent être responsables de cette complication comme présenté dans le **tableau 1**⁴⁸.

Tableau 1 : Causes de l'anémie en situation de maladie rénale chronique

Causes de l'anémie en situation de maladie rénale chronique
<ul style="list-style-type: none">• Diminution de la production d'érythropoïétine
<ul style="list-style-type: none">• Augmentation de l'hepcidine<ul style="list-style-type: none">➤ Due à la diminution de la clairance rénale➤ Menant à la séquestration du fer dans les macrophages ainsi qu'une résistance à l'érythropoïétine
<ul style="list-style-type: none">• Déficit en fer<ul style="list-style-type: none">➤ Due à l'augmentation de la perte sanguine et à une diminution médiée par l'hepcidine de l'absorption intestinale du fer
<ul style="list-style-type: none">• Suppression de l'érythropoïèse par les cytokines inflammatoires et les toxines urémiques
<ul style="list-style-type: none">• Durée de vie raccourcie des érythrocytes<ul style="list-style-type: none">➤ Due à l'inflammation et aux toxines urémiques

Traduit et adapté de Batchelor et al.⁴⁸.

L'hyperkaliémie est prévalente en situation de MRC, définit par une augmentation de la concentration sérique de potassium à plus que 5,0 mmol/L³⁸, et associée à une augmentation du risque d'arythmies et de décès. Sa fréquence augmente surtout suite à l'utilisation médicamenteuse de la famille des bloqueurs du système rénine-angiotensine³⁸.

La diminution de la fonction rénale entraîne des anomalies du métabolisme phosphocalcique, provoquant des **désordres minéraux et osseux** associées à une

ostéodystrophie rénale, une pathologie des glandes parathyroïdiennes, et des calcifications cardiovasculaires⁴⁹. Le rein est responsable de former la forme active de la vitamine D qui permet l'absorption du calcium par l'intestin, sa réabsorption tubulaire rénale ainsi que l'inhibition de la sécrétion de parathormone. En effet, le calcium, le phosphore, et la parathormone forment un cycle. Par conséquent, l'hypocalcémie et l'hyperphosphatémie causées suite à la diminution des fonctions rénales normales vont entraîner une activation des glandes parathyroïdiennes et donc une augmentation de la production de parathormone (responsable de la régulation de concentration de calcium sérique). Ainsi une résorption osseuse aura lieu suite à l'hypocalcémie afin d'augmenter la concentration de calcium circulant. Cet excès de calcium et de phosphore se fixent sur différents tissus de l'organisme dont les parois des vaisseaux sanguins, provoquant des complications cardiovasculaires⁴⁹.

La diminution d'excrétion de l'ammoniaque et la réabsorption du bicarbonate par le rein durant une MRC vont causer une **acidose métabolique**, condition assez prévalente dans la MRC⁴⁹. Une concentration trop élevée de bicarbonates sériques est associée à une augmentation du risque d'insuffisance cardiaque et de mortalité indépendamment du niveau de DFGe⁵⁰. L'acidose métabolique augmente l'excrétion urinaire du calcium causant donc des désordres minéraux et osseux, et est également associée à la progression de la MRC et à la mortalité^{49,51,52}.

La diminution de la fonction rénale provoque aussi une diminution de l'excrétion rénale de l'acide urique. **L'hyperuricémie** est associée à une aggravation de la progression de la MRC⁵³.

Autres

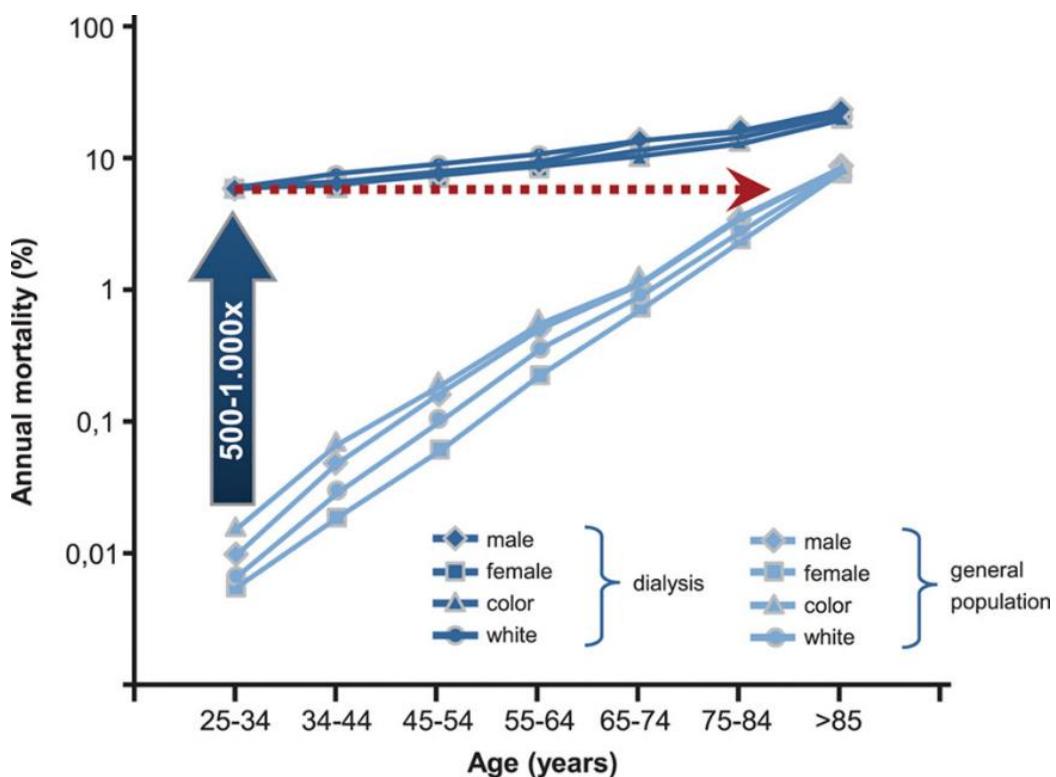
Plusieurs autres complications peuvent être liées à la MRC et ne doivent pas être négligées. Par exemple, la deuxième cause de mortalité chez les patients atteints de MRC est attribuée aux **infections** dont les risques sont multipliés par 3 à 4 par rapport à la population générale⁵. En plus, de nombreuses données épidémiologiques suggèrent que la MRC est fortement associée à un développement de **troubles cognitifs** et une

augmentation du risque de maladies cérébrovasculaires, notamment la maladie de Parkinson, les accidents vasculaires cérébraux (AVC) ischémique et hémorragique, l'anxiété et la dépression^{54,55}. La prévalence estimée des troubles cognitifs dans la MRC varie de 30% à 60% selon les études⁵⁶. En plus des facteurs de risque traditionnels comme le diabète ou l'hypertension, des facteurs de risque non traditionnels telles que les TUs, dont les concentrations augmentent au cours de la MRC, peuvent augmenter le risque de complications neurologiques⁵⁵. Certaines données expérimentales et cliniques récentes suggèrent que les TUs peuvent avoir un effet direct et/ou indirect sur les neurones⁵⁵.

1.1.3.2 Complications cardiovasculaires de la maladie rénale chronique

Les atteintes vasculaires causées par la MRC sont bien mises en évidence dans la littérature. En effet, la prévalence des MCV est plus élevée chez les patients atteints de MRC que chez les individus dans la population générale⁵⁷ : La moitié des patients atteints de MRC de stade 4 à 5 ont une MCV. Chez les patients de 25 à 34 ans atteints de défaillance rénale, le pourcentage de mortalité cardiovasculaire annuelle est multiplié par 500 à 1000, correspondant à celui de la population générale de ≈ 85 ans (**Figure 6**)⁵⁷. Selon Jankowski et al., « la MRC imite le vieillissement accéléré du système cardiovasculaire »⁵⁸.

En termes physiopathologiques, les MCV peuvent être classées en tant que MCV athéromateuses et non-athéromateuses, qui sont toutes les deux très prévalentes chez les patients atteints de MRC, sauf à partir de l'âge de 85 ans au-delà duquel la prévalence de celles non-athéromateuses devient plus élevée par rapport à celles athéromateuses⁵⁹.



D'après Jankowski et al., AHA, 2021⁵⁸

Figure 6 : Mortalité cardiovasculaire dans la population générale et chez les patients dialysés.

Facteurs de risque

La prévalence élevée de MCV dans la MRC est multifactorielle, attribuée à la combinaison des facteurs de risque cardiovasculaires traditionnels avec ceux non traditionnels dont la MRC qui est le principal facteur de risque non modifiable des MCV⁶⁰.

Les facteurs de risques traditionnels connus des MCV incluent le diabète, l'HTA, l'obésité, la dyslipidémie, l'âge avancé, le sexe masculin, le tabagisme, et la sédentarité⁶¹, des facteurs qui caractérisent également les patients atteints de MRC. En effet, l'HTA (surtout non contrôlée) est non seulement une cause commune de MRC, mais elle est aussi une complication fréquente de MRC. Cette complexe interaction entre la MRC et l'HTA augmente aussi le risque de complications cardiovasculaires, particulièrement dans le cas d'une hypertension résistante qui est fréquemment observée dans le contexte de la MRC⁶².

Les facteurs de risques non traditionnels directement liés à la MRC incluent un

métabolisme minéral et osseux altéré incluant des concentrations sanguines plus élevées en phosphate, en acide urique et en ferritine et plus faibles en 25(OH) vitamine D, un dysfonctionnement des cellules endothéliales (CE), des modifications lipidiques anormales, des calcifications vasculaires, le stress oxydatif, l'inflammation chronique, et les TUs^{60,61}. Il est bien connu que la MRC se caractérise par une inflammation systémique et un stress oxydatif⁶¹ qui vont donc augmenter les dommages cardiovasculaires et la mortalité⁶³. Les concentrations de protéine C-réactive (CRP) et de cytokines circulantes augmentent durant la MRC avec une synthèse accrue d'espèces réactives de l'oxygène déclenchées par l'inflammation. En effet, les concentrations de CRP élevées ont été associées à la présence d'athérosclérose chez les patients atteints de MRC⁶⁴. De plus, les TUs sont également associées à une augmentation de l'inflammation et du stress oxydatif.

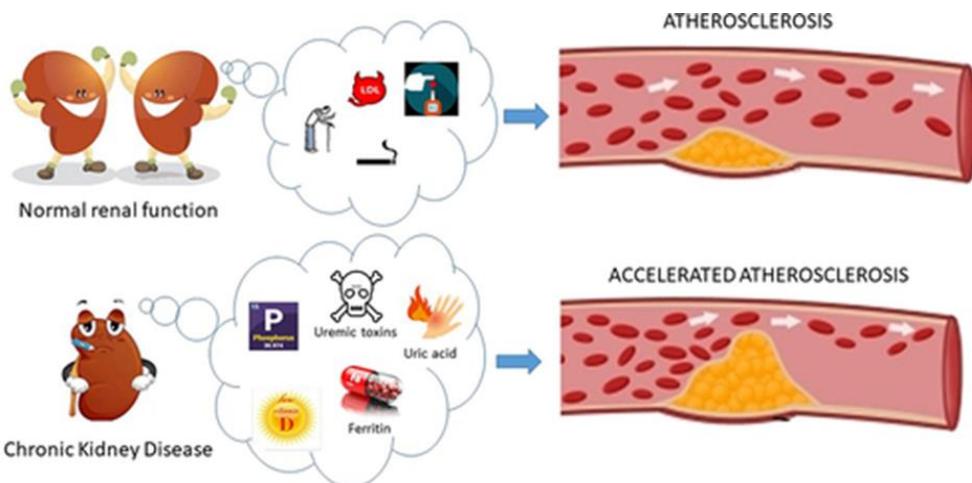
Maladies cardiovasculaires athéromateuses

La MCV athéromateuse ou athérosclérotique se caractérise par la présence de lésions occlusives et de plaques à l'intérieur de la paroi artérielle : les plaques d'athérome ; affectant principalement l'aorte et les artères coronaires⁶⁵. La taille et la composition des plaques athéromateuses chez les patients atteints de MRC sont différentes par rapport aux patients atteints d'une maladie coronarienne mais sans insuffisance rénale, avec un épaississement plus important de l'intima-média (**figure 7**) ainsi qu'un dépôt de calcium beaucoup plus marqué. Ce dernier pourra contribuer au taux élevé de complications observé chez ces patients^{60,66}. Selon *KDIGO*⁶⁷ et les *Cardiovascular Stroke Endpoint Definitions for Clinical Trials*⁶⁸, les MCV athéromateuses incluent les AVC ou le syndrome coronarien aigu avec ou sans infarctus du myocarde (IDM) (fatal ou non) et l'hospitalisation pour : une ischémie silencieuse, un angor instable, des accidents ischémiques transitoires, une thrombose intrastent, une maladie artérielle périphérique, des interventions coronariennes percutanées ou des pontages coronariens, une chirurgie vasculaire, une amputation et une revascularisation pour maladie coronarienne ou maladie artérielle périphérique. De plus, la maladie artérielle périphérique peut être définie comme un antécédent d'amputation, d'angioplastie ou de pontage du membre inférieur provoqué par des lésions ischémiques distales athéromateuses^{59,69}.

La prévalence des MCV athéromateuses est plus élevée chez les patients atteints de MRC modérée que chez les individus sains, et la progression de l'athérosclérose est fortement liée à la progression de la MRC⁶¹. L'incidence des IDM fatals était plus élevée chez les patients dialysés que dans la population générale⁶⁰. Les résultats d'études observationnelles ont montré que le risque d'AVC et de maladies coronariennes augmente avec la diminution du DFGe et l'augmentation de l'ACR^{61,70} et que la MRC est associée à un risque plus élevé de maladie artérielle périphérique^{71,72}.

Maladies cardiovasculaires non-athéromateuses

La MRC contribue de manière significative aux MCV non-athéromateuses⁷³. Elles englobent d'autres types de MCV que celles athéromateuses précédemment citées, notamment la mort cardiaque subite ou la mort par insuffisance cardiaque (sans antécédent de coronaropathie), l'hospitalisation pour insuffisance cardiaque (sans antécédent de coronaropathie), la fibrose cardiaque, la fibrillation auriculaire ou d'autres troubles du rythme, la dysfonction diastolique, la rigidité artérielle, l'hypertrophie des cardiomyocytes, la calcification vasculaire ou la cardiopathie valvulaire^{59,69,74}. Des études précédentes menées sur des cohortes ont conclu que la prévalence de l'insuffisance cardiaque augmentait considérablement avec la progression de la MRC et affectait 65 à 70 % des patients atteints de défaillance rénale⁷³. La rigidité artérielle est la modification artérielle la plus répandue chez les patients atteints de MRC⁷⁵ : plus le stade de MRC est avancé, plus le risque de rigidité artérielle est élevé⁷⁶. Cette dernière reflète la calcification vasculaire avec un épaississement de la media (à la différence de l'épaississement de **l'intima-media** pour les plaques d'athéromes)⁷⁷ et tous deux sont des prédicteurs indépendants de mortalité cardiovasculaire⁷⁸. En plus, différentes études ont rapporté que la MRC est un facteur de risque d'arythmie cardiaque⁷⁹. Bien que la fibrillation auriculaire représente le type d'arythmie le plus fréquent, les troubles ventriculaires sont les plus mortels^{80,81}. Par exemple, la tachyarythmie ventriculaire représentait 79 % des arrêts cardiaques enregistrés dans une étude sur des patients hémodialysés⁸⁰.



D'après Valdivielso et al. AHA, 2019⁶¹

Figure 7 : Athérosclérose dans les patients atteints de maladie rénale chronique et dans les individus avec une fonction rénale normale.

1.2 GENERALITES SUR LES TOXINES UREMIQUES

1.2.1 Définition et classification des toxines urémiques

La perte progressive de la fonction de filtration rénale s'accompagne de la rétention de nombreux métabolites, en raison d'une diminution de leur clairance rénale et/ou d'une augmentation de leur production. Ces solutés sont nommés « TUs » quand ils affectent le bon fonctionnement et métabolisme des cellules, y compris les cellules tubulaires rénales, les CE, les cellules immunologiques, ainsi que les cellules osseuses⁸². A noter que la toxicité urémique n'est pas seulement due à l'accumulation de certains solutés, mais aussi par un déficit d'autres comme la vitamine D. La diminution de sa concentration sérique est délétère et s'associe à des désordres osseux et cardiovasculaires⁴⁹. Nous allons nous concentrer dans la présente thèse sur les TUs qui s'accumulent dans l'organisme durant la MRC dont la toxicité fait toujours l'objet d'exploration par des études actuelles.

À ce jour, plus de 150 TUs ont été identifiées et classées par le groupe de travail européen sur les toxines urémiques (EUTox ; sigle anglais de European Uremic Toxin Work Group)^{83,84}. Néanmoins, les études omiques récentes ont montré l'accumulation d'autres molécules en plus de celles identifiées par EUTox. Le système de classification le plus couramment appliqué est basé sur les caractéristiques physico-chimiques des TUs, les

catégorisant en 3 principales classes (**Tableau 2**)⁸³ :

-petites molécules hydrosolubles (<500 Da) : elle ne présente pas nécessairement de toxicité, facilement éliminées par toute stratégie de dialyse⁸⁵;

-molécules moyennes (>500 Da) : la plupart sont des peptides qui présentent des toxicités pour plusieurs organes, ne sont éliminées que par des membranes à pores de grande taille pouvant être utilisée dans un système diffusif (hémodialyse) ou mode convectif (hémodiafiltration)⁸⁵;

-molécules liées aux protéines : la plupart de faible poids moléculaire tout en ayant des caractéristiques similaires aux molécules moyennes. Ces molécules se lient à l'albumine sérique et sont normalement éliminées par les reins chez les individus sains: la fraction libre par filtration glomérulaire et la fraction liée aux protéines par la sécrétion tubulaire⁸⁶. Par contre dû à leurs fortes liaisons à l'albumine, elles sont difficiles à éliminer par les techniques de dialyse traditionnelles chez les personnes atteintes de défaillance rénale⁸⁵. A noter que la variabilité du pourcentage de liaisons aux protéines de chaque TU pourra dépendre du taux d'albumine disponible (qui diminue en fonction de la progression de la MRC), et de la co-présence d'autres TUs liées aux protéines.

Tableau 2 : Classification des principales toxines urémiques

Petites molécules hydrosolubles (<500 Da)	Molécules moyennes (>500 Da)	Molécules liées aux protéines (Principalement <500 Da) (% liaison aux protéines⁸⁶)
Acide urique	ANP	Acide hippurique (33-48%)
ADMA	β2-microglobuline	Acide indole 3-acétique (82–94%)
Composés carbamylés	Cystatine C	Acide kynurénique (40-50%)
Créatinine	FGF-23	AGEs (50%)

Oxalate	Ghréline	CMPF (~100%)
Phénylacetylglutamine	Interleukine-6	Homocystéine (-)
Phosphate	Interleukine-8	Indoxyl sulfate (90–98%)
Sorbitol	Interleukine-18	Kynurénine (60-70%)
TMAO	PTH	p-crésyl sulfate (93–97%)
Urée	TNF-α	p-crésyl glucuronide (25-30%)

ADMA : diméthylarginine asymétrique, sigle anglais de asymmetric dimethylarginine; TMAO : N-Oxyde de triméthylamine, sigle anglais de trimethylamine-N-oxide ; ANP : peptide natriurétique auriculaire, sigle anglais de atrial natriuretic peptide; FGF-23 : facteurs de croissance des fibroblastes 23, sigle anglais de fibroblast growth factor ; PTH : hormone parathyroïdienne, sigle anglais de parathyroid hormone ; TNF-α : facteur de nécrose tumorale, sigle anglais de tumor necrosis factor ; AGEs : produits de glycation avancée, sigle anglais de advanced glycation end products ; CMPF : acide 3-carboxy-4-éthyl-5-propyl-2-furanpropanoïque.

Traduit et adapté de Vanholder et al.⁸⁷.

En décembre 2021, une nouvelle classification en six catégories a été suggérée : de petites molécules liées aux protéines (<500 Da), petites molécules hydrosolubles (<500 Da), moyennes molécules : petites (500–15 000 Da), moyennes (>15 000–25 000 Da), larges (>25 000 à 58 000 Da), et de grandes molécules (> 58 000 Da)⁸⁸. Cette classification plus globale prend en compte les caractéristiques physico-chimiques des TUs et leurs corrélations avec les symptômes cliniques ; cependant, elle a certaines limites et n'a pas encore été validée⁸⁸.

Alternativement, les TUs peuvent être classées selon leur origine : exogène (apport alimentaire), endogène, ou microbien (microbiote intestinale). EUTox a identifié plus de 25 TUs dérivées de l'alimentation et du métabolisme intestinal⁸⁹. La suite de ce travail ne présentera que les TUs qui seront étudiées dans le cadre de cette thèse.

Ce groupe de travail EUTox a rapporté les concentrations normales des TUs trouvées dans la population générale^{83,87}. Le tableau 3 présente ces concentrations correspondant aux principales TUs les plus représentatives pour chaque catégorie physico-chimique et qui font l'objet de cette thèse.

Tableau 3 : Concentrations normales des principales toxines urémiques

Classification	Toxines urémiques	Concentrations normales
Petites molécules hydrosolubles	Phénylacétylglutamine (mg/L) Phosphate (mmol/L) TMAO (mg/L) Urée (g/L)	<4,7 0,8 < normale < 1,5 2,84 ± 1,53 <0,4
Molécules liées aux protéines	Acide hippurique total (mg/L) Acide hippurique libre Acide indole 3-acétique total (mg/L) Acide indole 3-acétique libre (mg/L)	<5,0 0,4 ± 0,3 0,5 ± 0,3 0,04 ± 0,03
	Acide kynurénique total (mg/L) Acide kynurénique libre (mg/L)	<1,0 0,003 ± 0,004
	CMPF total (mg/L) CMPF libre (mg/L)	7,7 ± 3,3 0,004 ± 0,0035
	Indoxyl sulfate total (mg/L)	0,6 ± 5,4

	Indoxyl sulfate libre (mg/L)	0,026 ± 0,016
	Kynurénine totale (mg/L)	0,4 ± 0,2
	Kynurénine libre (mg/L)	0,15 ± 0,25
	p-crésyl sulfate total (mg/L)	1,9 ± 1,3
	p-crésyl sulfate libre (mg/L)	0,08 ± 0,09
	p-crésyl glucuronide total (mg/L)	0,019 ± 0,023
	p-crésyl glucuronide libre (mg/L)	0,015 ± 0,017

TMAO : N-Oxyde de triméthylamine, sigle anglais de trimethylamine-N-oxide; CMPF : acide 3-carboxy-4-éthyl-5-propyl-2-furanpropanoïque. Les valeurs normales sont rapportées en tant que moyenne ± écart-type, ou dans le cas d'une seule valeur en tant que maximum (accompagné de « < »).

Traduit et adapté de Vanholder et al.⁸⁷ et Duranton et al.⁸³.

1.2.2 Toxines urémiques d'origine exogène

Les principales TUs exogènes qui ont été évaluées durant la thèse sont l'urée et le phosphate qui sont de petites molécules solubles dans l'eau, ainsi que l'acide 3-carboxy-4-éthyl-5-propyl-2-furanpropanoïque (CMPF) qui est lié aux protéines.

La plus haute concentration sérique en TUs dans la MRC est celle de **l'urée**, un déchet toxique résultant du métabolisme des protéines⁹⁰. L'urée est principalement synthétisée à partir de l'ammoniac au niveau du foie et est ensuite éliminée du corps à travers les reins par l'urine⁹⁰. L'urée est considérée comme une TU directe et indirecte. Elle induit directement des changements moléculaires liés à la résistance à l'insuline, la production de radicaux libres, et l'expression de gènes de la famille pro-apoptotique⁹¹. L'urée génère

également de l'ammoniaque, du cyanate, et des composés carbamylés via le cyanate. Ainsi l'urée a aussi un effet indirect via la carbamylation des protéines qui est responsable des modifications protéiques post-traductionnelles. La carbamylation des lipoprotéines pourra expliquer l'incidence élevée d'évènements cardiovasculaires dans la MRC⁹⁰. Outre son lien connu avec la carbamylation, le cyanate est un radical libre qui exerce également une toxicité direct en augmentant les facteurs thrombogènes⁹¹.

Le **phosphate** est le deuxième minéral le plus abondant du corps et se trouve principalement sous sa forme inorganique. Environ 85% du phosphate est lié à la matrice osseuse sous forme de cristaux d'hydroxyapatite, et les 15% restants se trouvent dans les tissus mous et les fluides extracellulaires, y compris le plasma qui représente 0,02 % du phosphate total. En plus d'être impliqué dans la signalisation cellulaire, la synthèse d'adénosine triphosphate (stockage et libération d'énergie) et la régulation acido-basique, le phosphate est également un composant de la membrane cellulaire phospholipidique et des acides nucléiques⁹². Les sources alimentaires du phosphate sont diverses, dont les produits laitiers, les viandes et particulièrement les abats, les œufs, les noix et graines, et les céréales et produits céréaliers⁹². L'homéostasie du phosphate est régulée par les reins, l'absorption intestinale et le transfert entre les compartiments squelettique, extracellulaire et intracellulaire. Ce mécanisme complexe est médié par le calcitriol, la parathormone et le facteur de croissance des fibroblastes 23 (FGF-23 ; sigle anglais de fibroblast growth factor). L'expression du phosphate est diminuée par la parathormone et le FGF-23, provoquant une phosphaturie en inhibant la réabsorption rénale. Au cours d'une MRC, la baisse du DFG entraîne une rétention de phosphate qui semble actuellement être le mécanisme initial donnant lieu à des mécanismes compensateurs potentiellement délétères. Comme précédemment expliqué dans la partie complications métaboliques de la MRC, une hyperphosphatémie sera observée chez ces patients, tout en induisant la production du FGF-23 et de la parathormone et en diminuant la synthèse du calcitriol, augmentant ainsi le risque d'ostéodystrophie et d'évènements cardiovasculaires⁹².

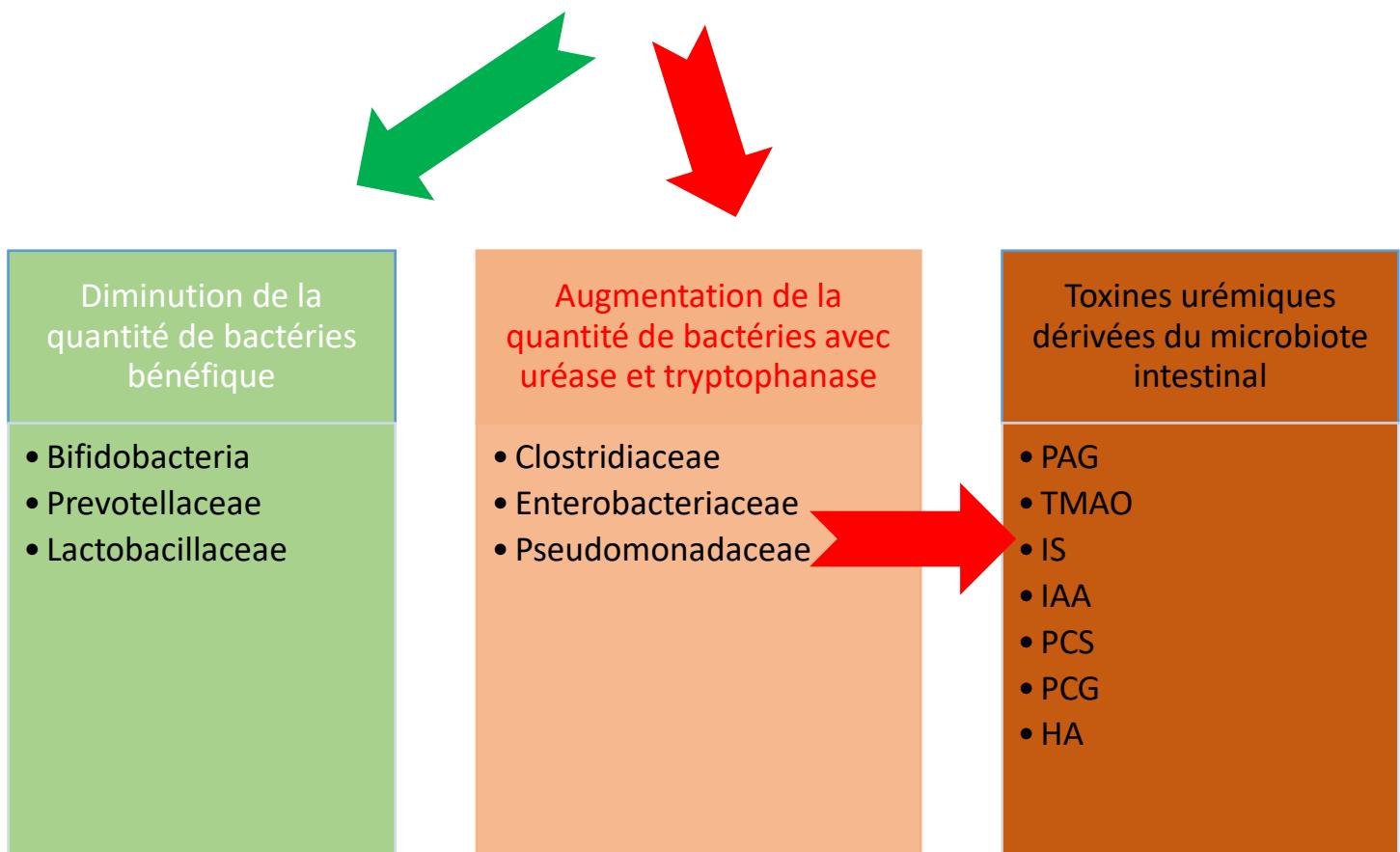
L'origine du **CMPF** reste incertain. Il a été suggéré que le CMPF est l'un des principaux métabolites des acides gras furaniques dont les principales sources alimentaires sont les

poissons et l'huile de poisson⁸⁶. Il ne peut être exclu que le CMPF soit également produit de novo dans le corps humain⁸⁶. Les effets pronostiques de l'accumulation du CMPF dans la MRC sont encore contradictoires et peu explorés. D'un côté, le CMPF semble présenter une toxicité, il a été démontré qu'il favorise le stress oxydatif, altère la fonction neurologique, entraîne des lésions cellulaires rénales, inhibe la sécrétion d'insuline et augmente le risque cardiovasculaire⁹³. D'autre part, plusieurs études ont identifié le CMPF plasmatique comme biomarqueur de la consommation de poisson et de diète saine riche en oméga 3, il semble être associé à un effet protecteur pour le diabète de type 2 ou l'inflammation⁹³. Luce et al. ont montré que les concentrations sériques élevées de CMPF chez les patients atteints de MRC n'étaient pas associées à la mortalité et aux MCV⁹³, et Dai et al. ont conclu que cette élévation était associée à un risque réduit de mortalité toutes causes confondues et de défaillance rénale et pourrait même contrecarrer les effets défavorables de N-Oxyde de triméthylamine (TMAO ; sigle anglais de trimethylamine-N-oxide)⁹⁴.

1.2.3 Toxines urémiques d'origine intestinal

La composition du microbiote intestinal est significativement altérée dans la MRC, avec une diminution de la prévalence des bactéries bénéfiques telles que la Bifidobacteria qui jouent un rôle crucial dans la protection du système cardiovasculaire, et avec une prolifération des bactéries protéolytiques telles que l'*Escherichia coli*⁹⁵. Ces communautés bactériennes ont présenté une augmentation de l'expression des enzymes comme la tryptophanase et des gènes responsables de la formation des TUs⁸⁹. Cette dysbiose associée à la MRC pourrait expliquer une altération dans la production de certaines TUs d'origine intestinal (**Figure 8**). En effet, le métabolisme et l'absorption des acides aminés au niveau de l'intestin grêle sont modifiés dans la MRC. Ces acides aminés vont donc progresser vers le côlon qui présente la plus grande densité en microbiotes responsable de leur métabolisme en TUs⁹⁶.

MRC



MRC : maladie rénale chronique ; PAG : phénylacetylglutamine ; TMAO : N-Oxyde de triméthylamine, sigle anglais de trimethylamine-N-oxide; IS : indoxyl sulfate ; IAA : acide indole-3-acétique ; PCS : p-crésyl sulfate ; PCG : p-cresyl glucuronide ; HA : acide hippurique, sigle anglais de hippuric acid.
Traduite et adaptée de Rysz et al.⁹⁶

Figure 8 : Altération du microbiote intestinal durant la maladie rénale chronique et production de toxines urémiques.

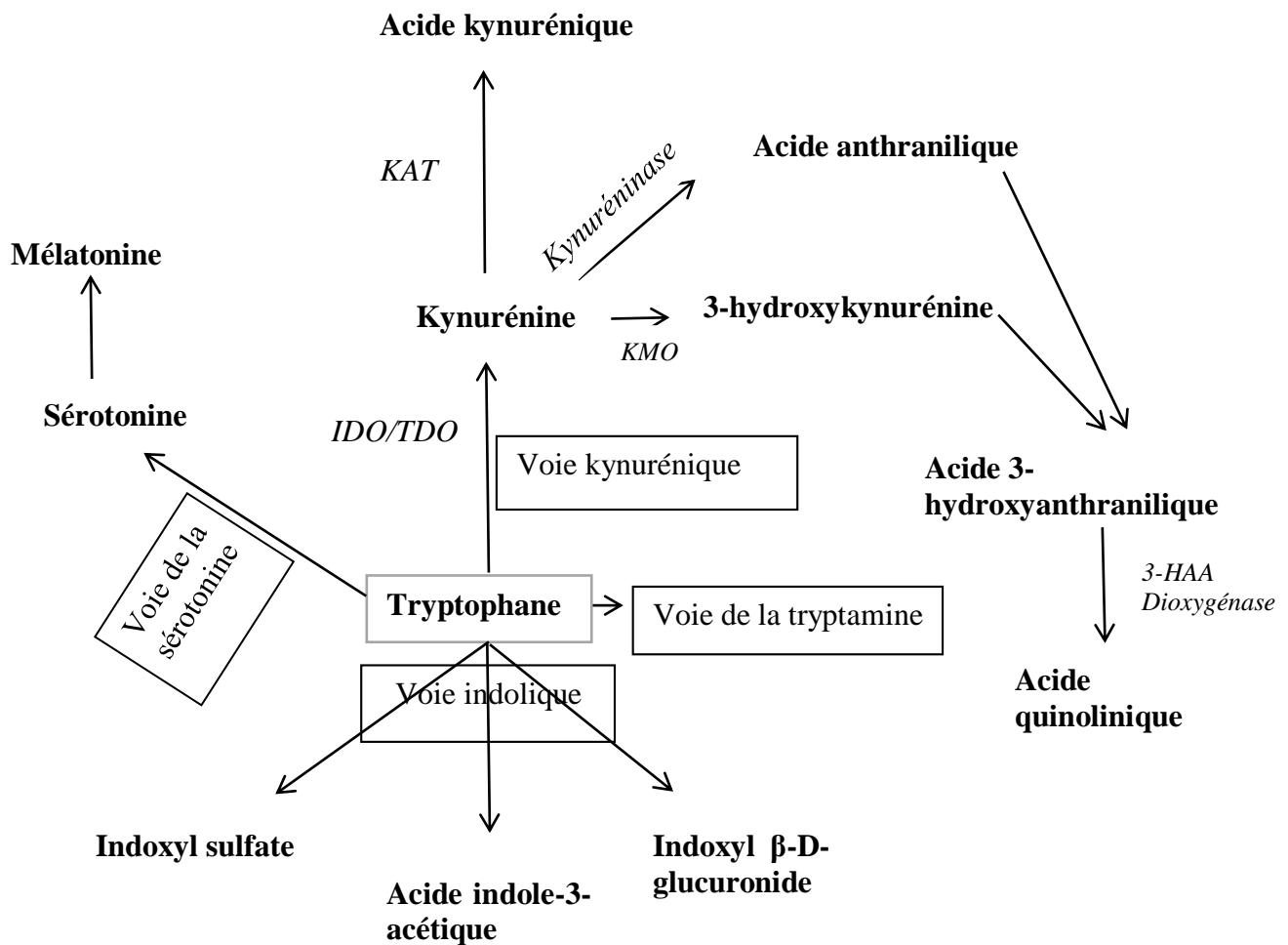
En plus, des enzymes des cellules épithéliales intestinales seront activées durant la MRC, et seront responsable aussi du métabolisme des acides aminés en certaines TU⁹⁷. Les principales TU^s d'origine intestinal (que ca soit du microbiote intestinal ou des cellules intestinales) qui ont été évaluées durant la thèse sont celles ayant montré la plus grande toxicité *in vitro* et *in vivo*⁸⁶ : la phénylacetylglutamine (PAG) et TMAO qui sont de petites molécules hydrosolubles et l'indoxyl sulfate (IS), l'acide indole-3-acétique (IAA), la kynurénine, l'acide kynurénique (KA ; sigle anglais de kynurenic acid), le p-crésyl sulfate (PCS), le p-cresyl glucuronide (PCG), l'acide hippurique (HA ; sigle anglais de hippuric acid) qui sont des molécules liées aux protéines.

La majorité de ces TUs sont issues du métabolisme intestinal des acides aminés aromatiques : tryptophane, phénylalanine et tyrosine⁸⁶. Le tryptophane est le précurseur de l'IS, l'IAA, la kynurénine, et le KA. La phénylalanine et la tyrosine sont les précurseurs des PCS et PCG. La phénylalanine est également précurseur de la PAG et l'HA.

1.2.3.1 *Les précurseurs des toxines urémiques : les acides aminés aromatiques*

Tryptophane

Le tryptophane est un acide aminé essentiel obtenu par apport alimentaire (pomme de terre, pois chiches, œufs, volaille, produits laitiers...). C'est le seul acide aminé qui se trouve lié aux protéines (aux alentours de 85%), donc après absorption, c'est la partie libre du tryptophane qui sera active⁹⁸. C'est un composant essentiel dans la biosynthèse des protéines, des enzymes et des muscles, ainsi qu'un substrat nécessaire pour la production d'hormones et de neurotransmetteurs et pour l'homéostasie cellulaire normale⁹⁹. C'est un précurseur de plusieurs composés bioactifs, notamment la niacine (vitamine B3), la sérotonine, la mélatonine, et les kynurénines (**Figure 9**). Ces métabolites impactent le processus de régulation du sommeil et de l'humeur⁸⁹. Dans des conditions physiologiques, la voie métabolique kynurénique consomme près de 90% du tryptophane en utilisant le tryptophane 2,3-dioxygénase (TDO) au niveau du foie⁹⁷, tout en produisant diverses molécules bioactives ayant des activités antioxydante, anti-inflammatoire, et neuroprotectrice. Néanmoins, les actions des métabolites de cette voie dépendent de leurs concentrations et de l'environnement cellulaire⁹⁹. Dans un contexte d'inflammation et de stress comme dans la MRC, des perturbations des voies métaboliques du tryptophane sont observées¹⁰⁰. Par conséquent, la voie métabolique de la sérotonine est déplacée vers la voie kynurénique suite à l'activation de l'enzyme indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) et vers une activation de la voie indolique suite à l'altération du microbiote intestinal (**Figure 9**).



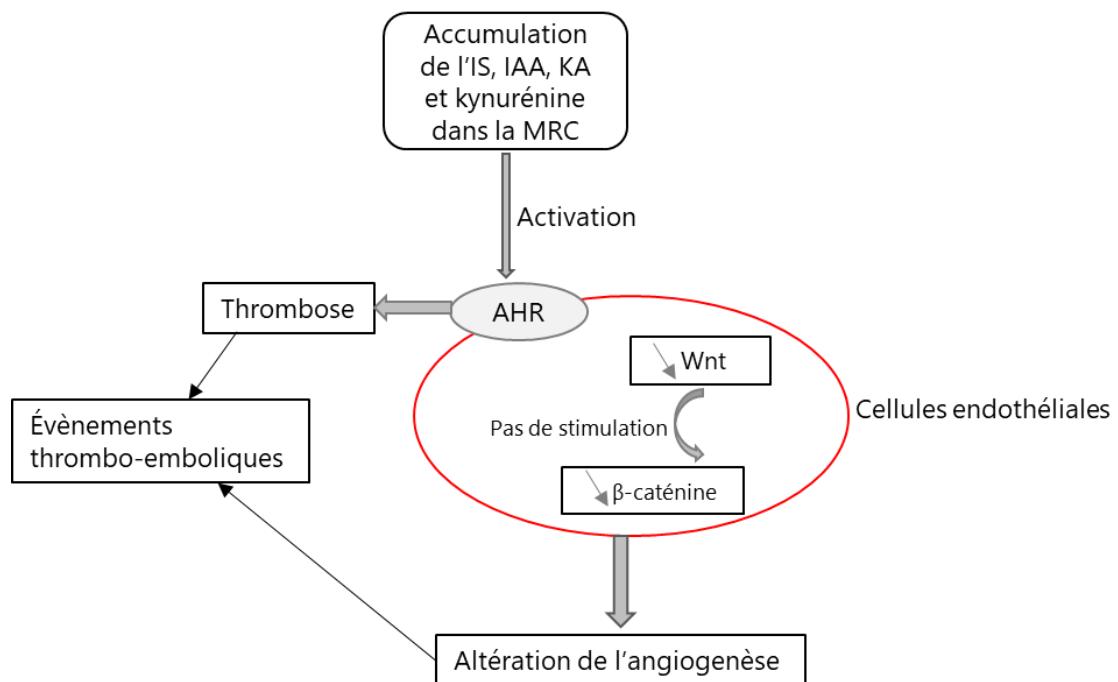
IDO : indoléamine 2,3-dioxygénase ; TDO : tryptophane dioxygénase ; KAT : kynurénine aminotransférase ; KMO : kynurénine monooxygénase ; 3-HAA dioxygénase : l'acide 3-hydroxyanthranilique dioxygénase.
 Adapté de la figure 1 dans Sallée et al., 2014⁹⁷.

Figure 9 : Voies métaboliques du tryptophane.

L'IDO existe de manière omniprésente dans le corps (cellules intestinales, immunitaires, endothéliales, ...), et est puissamment induite par les cytokines pro-inflammatoires⁹⁷. Ceci conduit à une augmentation des concentrations sériques de kynurénine et de KA qui s'accumulent vu la diminution des capacités de filtration rénale, et qui vont altérer les fonctions biologiques normales⁹⁹. Des modèles *in vivo* et *in vitro* ont montré que l'accumulation de ces TUs dérivées du tryptophane perturbe les fonctions endothéliales et peut mener à des maladies artérielles périphériques tout en activant le récepteur d'aryl hydrocarbone (AhR ; sigle anglais de Aryl hydrocarbon Receptor)^{101,102}. Cette activation a un

effet sur les cellules endothéliales de deux façons : elle aboutit à l'inhibition de l'activité de Wnt via la voie de la β -caténine ce qui altère l'angiogenèse, et à l'induction du facteur tissulaire ce qui favorise les phénomènes thrombotiques (**Figure 10**)¹⁰²⁻¹⁰⁴. En effet, l'activation de la voie de la β -caténine augmente la prolifération et la migration des CE, expliquant donc l'altération de l'angiogenèse en l'absence de son activité. Arinze et al. ont démontré que ces TUs agissent ensemble pour favoriser le développement de maladies microvasculaires dans la MRC¹⁰².

Par conséquence, le rôle du tryptophane est complexe dans la MRC, du fait qu'il génère un nombre important de métabolites, certains principalement toxiques (TUs), d'autres principalement bénéfiques (sérotonine et mélatonine)¹⁰⁵.



IS : indoxyl sulfate ; IAA : acide indole-3-acétique ; KA : acide kynurénique, sigle anglais de kynurenic acid ; MRC : maladie rénale chronique ; AhR : récepteur d'aryl hydrocarbone, sigle anglais de Aryl hydrocarbon Receptor. Traduite et adaptée de Massy et Druoke, 2022¹⁰¹.

Figure 10 : Voie de l'AHR et toxicité endothéliale.

Tyrosine et phénylalanine

La phénylalanine est un acide aminé essentiel, de source végétales et animales comme la viande, le poisson, les produits laitiers, les œufs, les légumineuses.... La phénylalanine est principalement absorbée au niveau de l'intestin grêle, mais la partie non absorbée atteint le côlon pour être métabolisée par les bactéries intestinales¹⁰⁶. La tyrosine est un acide aminé non essentiel du fait qu'elle peut être synthétisée dans l'organisme à partir de la phénylalanine, et elle a aussi les mêmes sources alimentaires que la phénylalanine⁸⁹ (produits laitiers, œufs...). Le p-crésol est le métabolite le plus connu obtenu à partir de la fermentation bactérienne de la phénylalanine et de la tyrosine au niveau du segment distal du côlon. L'acide phényleacétique est aussi un métabolite dérivé à partir de la dégradation microbienne de la phénylalanine (quand il est en excès) au niveau du côlon⁸⁹. Nous allons nous restreindre à ces informations sans détailler plus vu que ces métabolites ne feront pas l'objet principal de la thèse.

1.2.3.2 Toxines urémiques dérivées du tryptophane

Indoles

Le tryptophane est métabolisé par la voie indolique au niveau du côlon distal (**Figure 9**), pour générer l'indole et l'IAA⁸⁹. La tryptophanase des bactéries intestinales (surtout l'*Escherichia coli*) convertit le tryptophane en indole tout d'abord, et puis l'indole est absorbé et acheminé vers le foie où il est hydroxylé et sulfaté en **IS** par le cytochrome hépatique humain P450 et les enzymes sulfotransférases (**Figure 11**)⁸⁹. L'IAA est généré directement dans les intestins par les enzymes bactériennes tryptophane monooxygénases et indole-3-acétamide hydrolases, ou de manière endogène dans les tissus via la tryptamine^{86,89}. L'IS et l'IAA sont normalement excrétés dans l'urine par sécrétion tubulaire.

Kynurénine

Les métabolites de la voie kynurénique sont augmentés dans la MRC, non seulement

en raison de la diminution de la clairance rénale, mais aussi suite à des altérations du métabolisme du tryptophane. La **kynurénine** est le premier métabolite de la voie kynurénique, elle est dérivée du métabolisme du tryptophane à travers diverses étapes, en commençant dans l'intestin, puis en impliquant différents types de cellules. La majeure partie du tryptophane (qui reflète l'apport alimentaire) est métabolisée par la voie kynurénique dans les cellules épithéliales intestinales, qui est initiée par l'IDO. Même si les enzymes impliquées dans la voie kynurénique ne sont pas issues du microbiote intestinal altéré, mais ce dernier a un effet sur le métabolisme de la voie kynurénique par la régulation des interférons de type I^{107,108}. Après absorption, le tryptophane restant peut être lié à des protéines ou exister sous forme libre. La fraction libre du tryptophane continue à être métabolisée en kynurénine (et d'autres molécules) par différentes cellules qui utilisent la TDO (cellules hépatiques) et l'IDO (CE...)¹⁰⁸. La transformation métabolique de la kynurénine initiée par la kynurénine aminotransférase entraîne la formation de **KA** (**Figure 9**)¹⁰⁰. Ces métabolites sont également excrétés dans l'urine par sécrétion tubulaire.

1.2.3.3 Toxines urémiques dérivées de la phénylalanine/tyrosine

Para-Crésyl

Après absorption, le p-crésol est converti en **PCS** et **PCG**. Il est sulfaté dans le foie par l'enzyme sulfotransférase 1A1 pour former le PCS (**Figure 11**). En effet, plus de 95 % du p-crésol circule sous forme de PCS⁸². Ce dernier est principalement éliminé du corps par sécrétion tubulaire. Une petite partie du p-crésol subit une glucuronidation pour former le PCG, qui est aussi excrété dans l'urine par sécrétion tubulaire⁹⁶. En moyenne, les niveaux de PCG sont environ 200 fois moins élevés que ceux de PCS¹⁰⁶. Cependant, un passage de la sulfatation à la glucuronidation a lieu avec la progression de la MRC, et par conséquent, le rapport PCS/PCG diminue¹⁰⁶.

Phénylacétylglutamine

Après formation de l'acide phénylacétique dans l'intestin, il pénètre dans le système porte et est métabolisé dans le foie pour former la **PAG**, une TU dont les concentrations sont

significativement plus élevées chez les sujets atteints de MRC que dans la population générale¹⁰⁶.

1.2.3.4 Toxine urémique dérivée des polyphénols

Acide hippurique

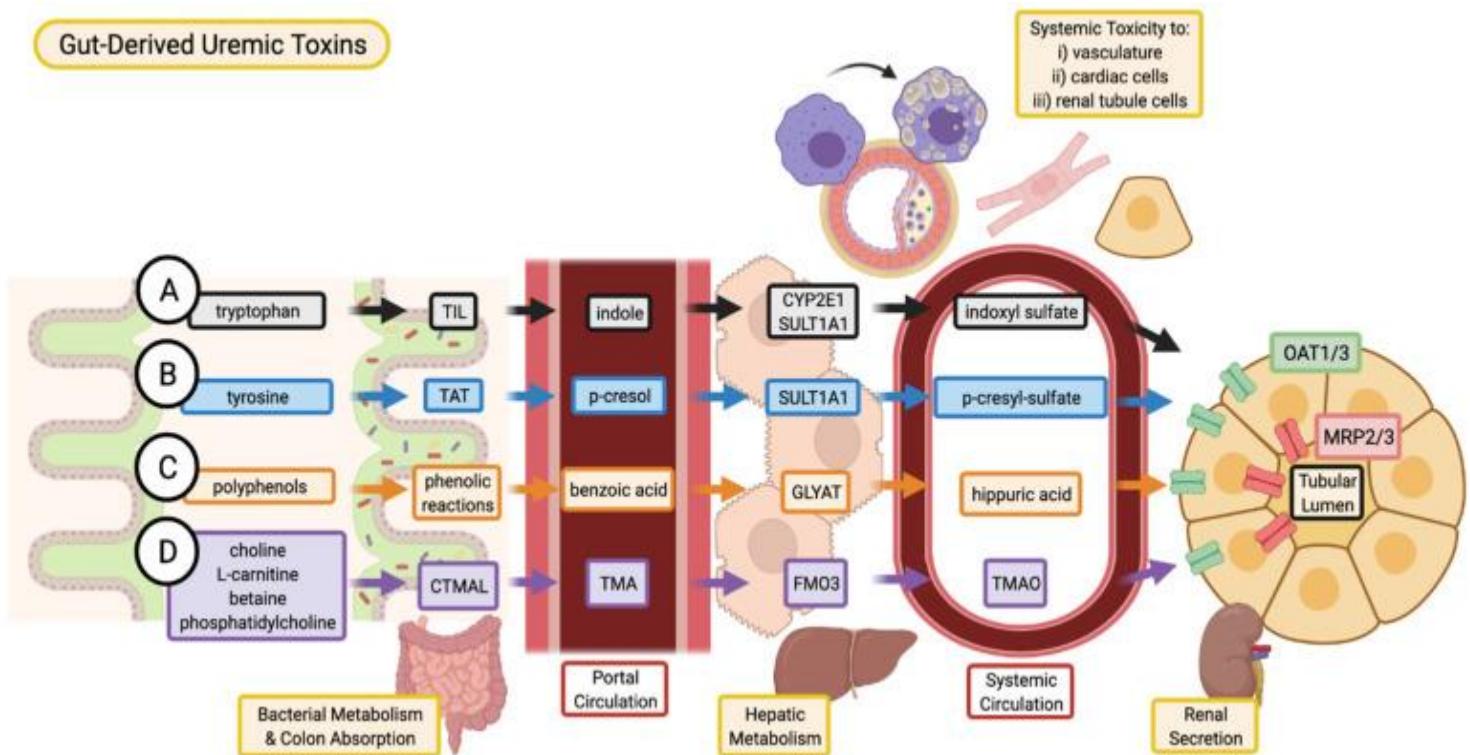
Les polyphénols sont des composés ayant des sources alimentaires tels que ceux trouvés dans le vin, les fruits et le thé, et/ou des sources endogènes dérivés à partir du métabolisme des acides aminés aromatiques par le microbiote intestinale⁸⁹. Quelle que soit leur source, le microbiote intestinal convertit les polyphénols en acide benzoïque. Au niveau hépatique, ce dernier est d'abord converti en benzoyl-CoA par la benzoyl-CoA synthétase, et le benzyl-CoA est ensuite conjugué avec la glycine par la glycine N-acétyltransférase pour former l'**l'HA** (**Figure 11**)⁸². L'HA se trouve normalement dans l'urine et est couramment utilisé comme mesure de la clairance rénale⁸⁹. Ainsi, plus la MRC progresse, plus l'HA est accumulé dans l'organisme.

1.2.3.5 Toxine urémique dérivée de la choline/phosphatidylcholine

La choline, qui est principalement présente dans les aliments sous forme de phosphatidylcholine, provient principalement d'un régime alimentaire occidental caractérisé par une consommation accrue de viande rouge, d'œufs et de produits riches en matières grasses (foie, porc...) ¹⁰⁶. La choline est un nutriment essentiel pour la synthèse des phospholipides membranaires. Lorsque la capacité de transport de la choline, la phosphatidylcholine ou la L-carnitine est dépassée dans l'intestin grêle (suite à un régime riche en graisses), une plus grande quantité de ces composés atteint le côlon où les bactéries intestinales les convertissent en triméthylamine. Plusieurs espèces bactériennes sont impliquées dans la production de triméthylamine, notamment Clostridia, Proteus, Shigella, et Aerobacter. Des études récentes suggèrent que l'abondance accrue de gènes d'utilisation de la choline dans le microbiome intestinal (suite à la dysbiose observée dans la MRC) est associée à des concentrations accrus de triméthylamine. Ce dernier est ensuite absorbé et convertie en **TMAO** au niveau du foie par les monooxygénases flaviniques hépatiques

(Figure 11) ¹⁰⁶. Le TMAO est un métabolite excrété dans l'urine par sécrétion tubulaire principalement via les transporteurs de cations organiques ¹⁰⁶. En revanche, au cours d'une MRC, la concentration de TMAO augmente plus le DFG diminue. Étant donné que le TMAO n'est pas lié aux protéines, il peut être éliminé par hémodialyse ¹⁰⁶. De plus, les concentrations plasmatiques de TMAO sont considérablement réduits après une transplantation rénale ¹⁰⁶.

La figure 11 suivante illustre le métabolisme et l'excrétion de quatre TUs prises de chacun des quatre groupes expliqués ci-dessus.



TIL : tryptophan indole-lyase; CYP2E1: cytochrome P450 2E1; SULT1A1: sulfotransférase 1A1; TAT: tyrosine aminotransférase; GLYAT: glycine-N-acetyltransferase ; FMO3 : monooxygénases flaviniques hépatiques; CTMAL : carnitine trimethylamine lyase ; OAT : transporteur d'anions organiques ; MRP : protéines associées à la multirésistance aux médicaments.

Adapté de la figure 1 dans Lim et al., 2021⁸².

Figure 11 : Métabolisme et excrétion de l'indoxylique, le p-cresyl sulfate, l'acide hippurique et le TMAO.

1.2.4 Facteurs modulant les concentrations sériques en toxines urémiques

Les TUs évaluées dans la présente thèse sont celles d'origine alimentaire ou

intestinale, qui, comme précédemment évoqué, ont montré le plus de toxicité dans les études expérimentales, et font toujours l'objet d'intérêt des études cliniques. Principalement, le stade de la MRC affecte les concentrations en TUs. Dépendamment de leurs sources, différents facteurs pourront avoir une influence sur leurs concentrations sériques dans la MRC. Puisque leur accumulation est due à l'augmentation de leur production ainsi qu'à la diminution de leur élimination, donc les facteurs modulant l'une ou l'autre pourra influencer leurs concentrations sériques.

Pour les TUs issues de l'alimentation (urée, phosphate, CMPF), l'apport alimentaire riche en molécules précurseurs de chacune de ces TUs pourra avoir une influence sur leurs concentrations. Pour les TUs issues de l'intestin, les facteurs ayant un effet sur la composition et le métabolisme du microbiote intestinal auront donc un effet sur la production de TUs. Ceci inclut l'âge, le sexe, le tabagisme, les sources alimentaires des précurseurs qui subiront le métabolisme intestinal, la prise ou pas de prébiotiques et/ou probiotiques, l'indice de masse corporel (IMC), les maladies qui augmentent l'inflammation et qui sont prévalentes chez les patients atteints de MRC dont le diabète, la dyslipidémie, et l'HTA, et les médicaments tels que les antibiotiques et les inhibiteurs de pompe à protons (IPP)¹⁰⁹⁻¹¹².

Chez les patients en défaillance rénale, le type de TUs pourra affecter leurs concentrations sériques. La dialyse pourra moduler les concentrations en petites molécules hydrosolubles, mais non pas en TUs liées aux protéines. De plus, des médicaments inhibiteurs de certains transporteurs de type anions organiques 1 (OAT ; sigle anglais de organic anion transporter) et OAT3 tels que les diurétiques et les IPPs pourront moduler les concentrations en TUs éliminées par ces transporteurs¹¹³.

1.3 POLYPHARMACIE CHEZ LES PATIENTS EN MALADIE RENALE CHRONIQUE

Comme expliqué dans la partie 1.1., les patients atteints de MRC ont généralement de multiples comorbidités, et ceci est donc associé à une polypharmacie largement observée chez ces patients¹¹³. Les médicaments les plus couramment prescrits sont les antihypertenseurs (médicaments du système rénine angiotensine (losartan, valsartan...), diurétiques...), les hypolipémiants (statines (fluvastatine)), les antidiabétiques, et les IPPs

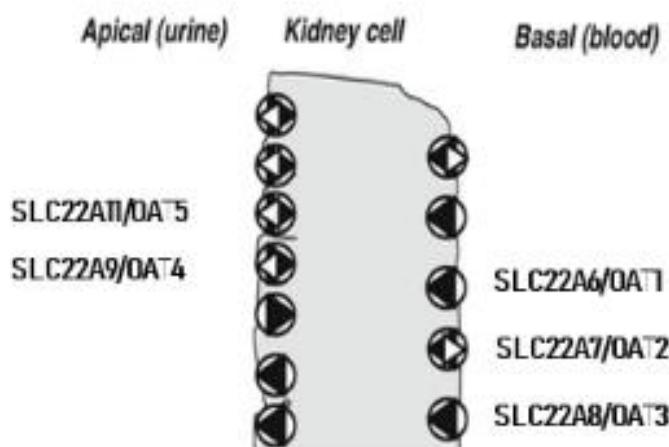
(oméprazole, pantoprazole, lansoprazole, ésomeprazole...) ¹¹⁴.

Cette polypharmacie est associée à une fréquence élevée d'effets indésirables et pourrait augmenter les interactions pharmacocinétiques entre les médicaments ¹¹⁵.

La pharmacocinétique, autrement dit l'action de l'organisme sur un médicament, englobe le parcours du médicament depuis son introduction dans l'organisme jusqu'à son élimination ¹¹⁶. Ceci s'effectue en 4 étapes principales qui sont altérées durant la MRC : l'absorption, la distribution, le métabolisme, et l'excrétion ^{116,117}. L'absorption est la 1^{ère} étape par laquelle le médicament pénètre dans la circulation sanguine à partir du site d'administration. Elle est déterminée par les propriétés physico-chimiques du médicament, sa formulation galénique et sa voie d'administration ¹¹⁶. Le ralentissement de la motilité intestinale observé chez les sujets souffrant de MRC peut prolonger le délai nécessaire pour atteindre la concentration plasmatique maximale. En plus, l'alcalinisation du système gastro-intestinal chez ces patients peut altérer la dissolution des médicaments solubles en milieu acide (comme le furosémide) et réduire leur fraction absorbée ¹¹⁷. Après absorption, le médicament est distribué dans divers tissus du corps. La distribution dépend de la solubilité du médicament, de la perméabilité des membranes cellulaires, de sa liaison aux protéines sanguines qui est bien affectée durant la MRC ¹¹⁷, du pH local, et de plusieurs autres facteurs ¹¹⁶. Le foie est le principal site de métabolisme des médicaments. Enfin, le médicament est principalement éliminé par les reins ¹¹⁶, l'étape qui nous intéresse dans les travaux de la présente thèse. En effet, la conséquence directe de la MRC sur la pharmacocinétique des médicaments est une diminution de la clairance rénale due à une réduction du DFG, et donc une altération de l'élimination des médicaments ¹¹⁷, expliquant les effets indésirables (dont la néphrotoxicité) observés chez les patients atteints de MRC ¹¹⁵.

Un certains nombre de médicaments largement utilisés dans la MRC sont des anions organiques, qui sont physiologiquement éliminés par les OAT, également connu sous le nom de famille de transporteurs soluté 22 (SLC22). Ces transporteurs ont un rôle dans le transport d'un nombre important de médicaments prescrits dans la MRC, mais aussi de toxines (TUs, mercure...) et de molécules endogènes (prostaglandines, vitamines...) ^{113,117}. Les OAT 1 à 5

sont les transporteurs connus à être exprimés au niveau des reins (**Figure 12**). Nous allons se concentrer sur les OAT1 et OAT3 qui font l'objet de la thèse et qui sont impliqués dans l'évaluation de notre dernier objectif. Ils assurent le transport de nombreux substrats (anti-inflammatoires non stéroïdiens, antibiotiques bêta-lactames...) à travers la membrane basolatérale du tubule proximal rénal. Contrairement aux précédentes, l'OAT4 est localisée à la membrane apicale de l'épithélium tubulaire (**Figure 12**)¹¹⁸.



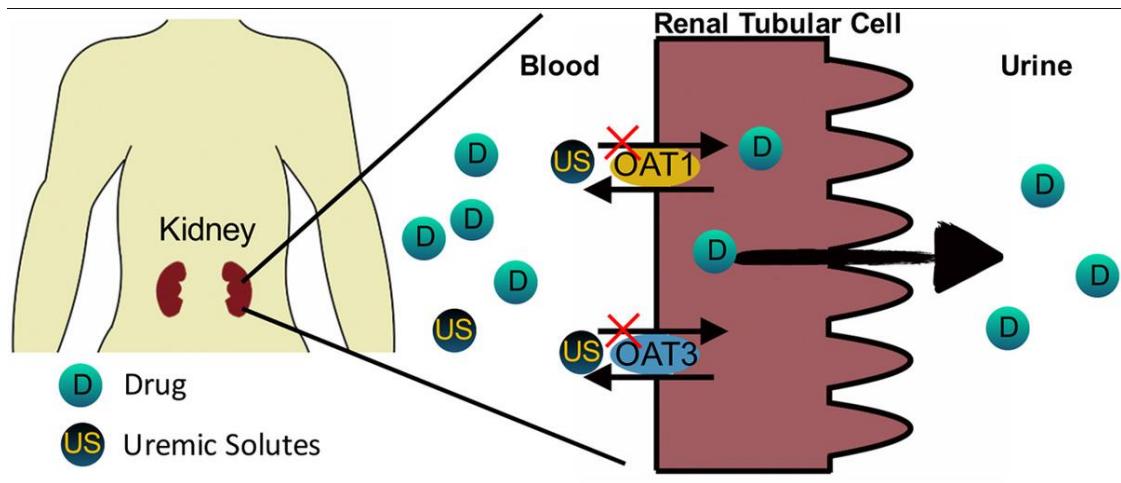
OAT : transporteur d'anions organiques.

Adapté de Neuhoff et al., 2013¹¹⁹.

Figure 12 : Emplacement des transporteurs d'anions organiques au niveau des reins.

Plus de 35 TUs (en particulier les TUs liées aux protéines) sont des substrats des OAT1 (également connu sous le nom de SLC22A6) et OAT3 (également connu sous le nom de SLC22A8), mais en interagissant différemment avec ces transporteurs^{120,121}. Par exemple, l'IS a une plus grande affinité à l'OAT3 qu'à l'OAT1, tandis que le PCS interagit de la même manière avec les deux¹²⁰ (**Tableau 4**). Ces deux transporteurs sont impliqués dans la sécrétion des TUs liées aux protéines du sang vers l'urine. Le **tableau 4** présente l'affinité ou pas aux OAT1 et/ou OAT3 des TUs considérées dans la thèse. Par conséquent, une potentielle compétition entre TU et médicament au niveau de ces transporteurs (**Figure 13**) pourrait expliquer les changements de concentration de certaines TUs et pourrait donc accentuer leurs effets toxiques, une hypothèse qu'on va évaluer dans l'un des objectifs de

notre thèse en ciblant les IPPs spécifiquement.



OAT : transporteur d'anions organiques.

D'après Hsueh et al., 2016¹²².

Figure 13 : Compétition entre les médicaments et les toxines urémiques au niveau des transporteurs d'anions organiques des reins.

Tableau 4 : Affinité des toxines urémiques pour l'OAT1 et l'OAT3

Toxines urémiques	Affinité pour l'OAT1 et l'OAT3 ^{120,121,123-126}
Indoxyl sulfate	Plus grande affinité à l'OAT3 qu'à l'OAT1
Acide indole-3-acétique	Affinité modérée pour les deux
Kynurénine	Affinité élevée pour les deux
Acide kynurénique	Affinité modérée pour les deux
p-crésyl sulfate	Affinité élevée pour les deux
p-crésyl glucuronide	Pas d'affinité
Acide hippurique	Affinité élevée pour les deux

Phénylacétylglutamine	Pas d'affinité
CMPF	Affinité à l'OAT3
TMAO	Plus d'études sont nécessaires
Urée	Pas d'affinité

CMPF : acide 3-carboxy-4-éthyl-5-propyl-2-furanpropanoïque ; TMAO ; sigle anglais de trimethylamine-N-oxide.

Quelques études ont montré que l'inhibition des transporteurs OAT1/OAT3 induit l'accumulation des TUs. Luo et al. ont observé une augmentation de l'aire sous la courbe et de la demi-vie d'élimination de l'IS après l'administration de ciprofloxacine, un antibiotique inhibiteur de l'OAT3, chez des rats néphrectomisés ¹²⁷. Une autre étude *in vivo* montre que l'administration d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (diclofénac et kétoprofène) diminue la clairance rénale de l'IS ¹²⁸. Cependant, contrairement aux IPPs, ces derniers médicaments sont rarement prescrits aux patients atteints de MRC ¹¹⁴. Une étude clinique chez 20 volontaires sains montre que l'administration de probénécide, un médicament uricosurique utilisé dans le traitement de la goutte et utilisé expérimentalement comme contrôle positif de l'inhibition des transporteurs OAT1/OAT3, induit une accumulation d'IS et d'IAA ¹²⁹. Une autre étude clinique menée chez des patients atteints de MRC a montré que les patients traités par le furosémide présentaient une accumulation plasmatique de TMAO ¹³⁰. André et al. ont montré que la prescription d'au moins un médicament inhibiteur d'OAT1/3 est associée avec l'accumulation plasmatique du PCS chez les transplantés rénaux ¹¹³. D'où l'importance de comprendre les interactions entre les médicaments et les TUs.

1.4 CKD-REIN : COHORTE DE PATIENTS ATTEINTS DE MALADIE RENALE CHRONIQUE

Il existe plusieurs grandes cohortes européennes et internationales de patients atteints de MRC avec différents objectifs ¹³¹⁻¹³⁵. Entre autre, l'étude « Chronic Kidney Disease Outcomes and Practice Patterns Study » (connue par CKDopps) qui a été mise en place dans les années 2010¹³⁵. C'est une étude internationale de grande ampleur, incluant près de

10 000 patients atteints de MRC suivis par un néphrologue, ayant pour but d'examiner les variations de soins pour les patients atteints de MRC avancée non dialysés afin d'identifier les pratiques de traitement les plus efficaces. CKDopps consiste en une collaboration internationale de différentes cohortes nationales provenant du Brésil¹³³, de l'Allemagne¹³¹, des États-Unis, de la France^{132,136}, et du Japon¹³⁴. La cohorte nationale française « Chronic Kidney Disease–Réseau Épidémiologie et Information en Néphrologie » (CKD-REIN) contribue grandement à la collaboration CKDopps, par l'inclusion de 3033 patients atteints de MRC.

CKD-REIN est une cohorte clinique prospective promue par l'Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM) et coordonnée par l'Université Paris-Sud (coordination scientifique : Bénédicte Stengel Inserm – UPS UMRS 1018, **annexe 4**). CKD-REIN inclus 3033 patients adultes atteints de MRC aux stades 3 (60%) ou 4 (40%) (DFG compris entre 15 et 60 mL/min/1,73m²), réalisée à partir de 40 consultations de néphrologie (d'établissements publics, privés à but lucratif ou non lucratif) réparties sur toute la France afin d'obtenir un échantillon représentatif national des pratiques néphrologiques et des patients suivis par un néphrologue. Il s'agit donc de l'une des grandes cohortes de patients atteints de MRC en Europe.

En effet, après une phase de recensement dans chacun des sites des participants, 13 607 patients ont été identifiés avec un diagnostic de MRC ayant un DFG < 60 mL/min/1,73m² et avec au moins une visite chez le néphrologue dans les 4 à 12 mois. La phase d'inclusion des patients a débuté de juillet 2013 jusqu'à avril 2016. Les patients ont été inclus à l'occasion d'une consultation de routine dans le service de néphrologie si les critères d'inclusion étaient respectés. Basé sur la liste du recensement, les patients ayant au moins 18 ans, au moins deux mesures de DFG entre 45 et 60 mL/min/1,73m² (Stade 3A) à au moins 1 mois d'intervalle ou une mesure entre 15 et 45 mL/min/1,73m² (Stades 3B et 4), et qui n'étaient ni dialysés, ni transplantés ont été sélectionnés aléatoirement, permettant l'inclusion de 3033 patients après avoir signé un consentement éclairé. L'inclusion ne dépendait pas du type de néphropathie du patient. Les objectifs principaux de cette cohorte sont d'étudier les déterminants et les biomarqueurs de progression et de complications de

la MRC, d'identifier les meilleures pratiques pour ralentir la progression, réduire les complications et les hospitalisations, améliorer la transition vers la défaillance rénale, et comprendre ce qui est important dans la MRC du point de vue du patient.

Tous les patients ont été activement suivis durant 5 ans, avec des mises à jour annuelles des données (événements cliniques, biologie, qualité de vie, etc.) grâce à des entretiens en face à face ou par téléphone ainsi qu'un accès aux dossiers médicaux des patients. Comme pour la phase d'inclusion, des questionnaires sont aussi remplis à l'occasion d'une consultation de routine dans le service. Si le patient est entré en dialyse alors son suivi se termine 6 mois après son entrée, et s'il a bénéficié d'une greffe de rein alors son suivi se termine 1 an après la greffe. Un recueil des échantillons biologiques à l'inclusion, à 2 ans et à 5 ans a aussi eu lieu. Cette collection biologique est conservée à la Biobanque de Picardie et comprend 6 natures de prélèvements différentes : les tubes EDTA, sec, citrate, héparine, urine, et buffycoat.

L'étude des associations entre un ensemble de facteurs à l'échelon du patient et la survie, le déclin de la fonction rénale, l'incidence de défaillance rénale, l'incidence des MCV, la mortalité, la survenue de plusieurs complications rénales et non rénales, et la qualité de vie, font partie des objectifs de CKD-REIN.

1.5 LES OBJECTIFS

Nous avons souligné que les patients atteints de MRC présentent un risque accru de MCV, et que les décès cardiovasculaires forment la principale cause de décès chez ces patients. Par conséquence, il est important d'identifier et de comprendre les facteurs de risque cardiovasculaires spécifiques à la MRC. Nous avons choisi d'étudier les TUs qui s'accumulent avec la progression de la MRC. Ainsi, nous avons répondu aux objectifs suivants, tout en s'appuyant, pour les second et troisième objectifs, sur les données issues de la cohorte CKD-REIN :

- 1- Identifier les facteurs de risque cardiovasculaires non traditionnels dans la MRC, en faisant une revue narrative au sujet des effets des TUs au niveau

cardiovasculaire ;

- 2- Identifier les facteurs de risque cardiovasculaires non traditionnels dans la MRC, en évaluant l'association entre la kynurénine, une TU montrant une toxicité expérimentale mais non étudiée en clinique chez les patients pré-dialysés, et la survenue d'évènements cardiovasculaires et de mortalité toute cause ;
- 3- Identifier les facteurs qui pourront moduler les concentrations sériques en TUs, en évaluant l'association entre les inhibiteurs de pompe à protons et les concentrations sériques en TUs.

2 CHAPITRE 2 : EFFET DES TOXINES UREMIQUES SUR LE RISQUE CARDIOVASCULAIRE

2.1 RÉSUMÉ

Les patients atteints de MRC ont une prévalence élevée de MCV athéromateuses et/ou non athéromateuses en raison d'un ensemble de facteurs de risque liés à la MRC, tels que les TUs. En effet, les TUs jouent un rôle majeur dans l'émergence d'un nombre important de MCV, qui constituent la principale cause de décès chez les patients atteints de défaillance rénale. Il existe un manque dans la littérature de revue narrative sur l'implication des TUs les plus toxiques dans les MCV et les mécanismes physiopathologiques correspondants. Nous avons passons en revue de la littérature scientifique de toutes les études cliniques et expérimentales publiées entre 2002 et 2022 (dont 138 articles originaux inclus dans notre revue) sur les TUs alimentaires et d'origine intestinale présentant la plus grande toxicité *in vitro* et *in vivo*. Une meilleure compréhension du rôle de ces toxines dans la prévalence élevée des MCV chez les patients atteints de MRC pourrait faciliter le développement de traitements ciblés. Par conséquent, l'objectif de ce premier axe de thèse repose sur la compréhension des différents mécanismes qui sous-tendent l'influence des TUs d'origine alimentaire et intestinal sur le risque de MCV chez les patients atteints de MRC. Ce travail facilitera le bon déroulement des axes de la thèse, l'élaboration, et l'interprétation des résultats de l'objectif suivant.

2.2 INTRODUCTION

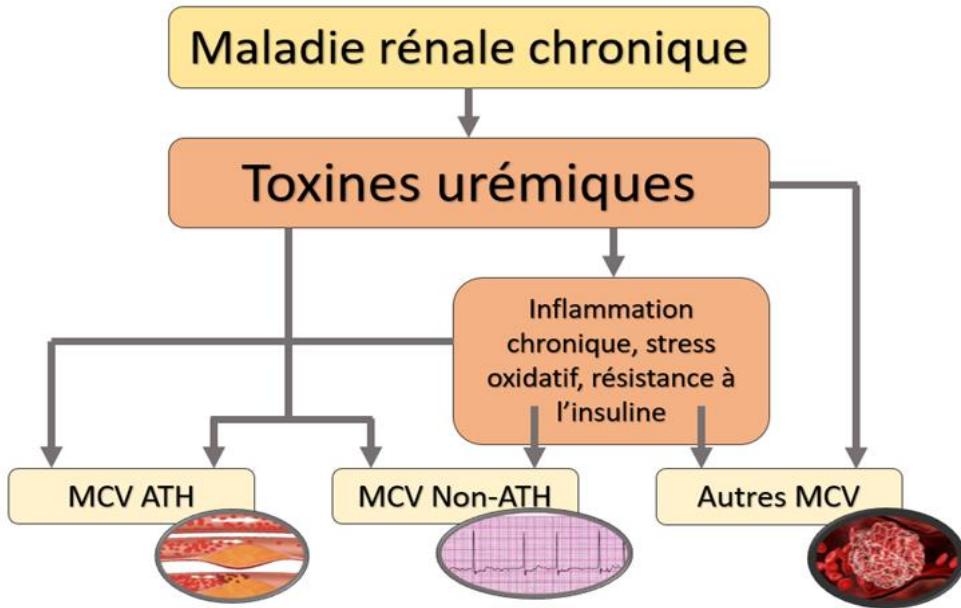
Afin de bien entamer le sujet de la thèse et de mieux aborder ses objectifs, nous avons débuté le parcours par une recherche bibliographique sur les TUs, leurs définitions, leurs classifications, et leurs effets sur le risque cardiovasculaire dans la MRC. Devant un manque dans la littérature de revue narrative sur le lien entre les TUs et le risque de morbi-mortalité cardiovasculaires, l'écriture d'une telle revue a été entreprise ¹.

Comme mentionné précédemment, la MRC est directement liée à une augmentation

des taux de morbidité et de mortalité en général¹³⁷, et plus spécifiquement ceux liés aux MCV¹³⁸ qu'elles soient athéromateuses et/ou non-athéromateuses⁵⁹. Cette augmentation du risque cardiovasculaire est multifactorielle, combinant les facteurs de risque cardiovasculaires traditionnels qui sont souvent retrouvés en tant que comorbidités chez les patients atteints de MRC, et ceux non traditionnels et spécifiques à la MRC comme les TUs^{60,61}.

Vu que les revues précédentes se sont concentrées sur les TUs endogènes (telles que la β-2 microglobuline, les interleukines et d'autres marqueurs inflammatoires)^{82,91}, nous avons visé dans notre travail celles d'origine alimentaire et intestinal. Le microbiote intestinal métabolise de nombreux composés alimentaires qui sont normalement excrétés par les reins chez les individus sains⁹⁵. Par contre, nous avons vu que l'altération de la composition microbienne intestinale, comme celle observée chez les patients atteints de MRC, génère des métabolites néfastes qui vont s'accumuler dans l'organisme vu la diminution de la clairance rénale⁸⁹.

Dans la présente revue narrative, nous avons inclus uniquement les TUs qui sont celles de sources alimentaire et intestinale ayant montré la plus grande toxicité aux niveaux expérimentaux⁸⁶ : CMPF, phosphate, urée, IS, IAA, kynurénine, KA, PCS, PCG, PAG, HA, TMAO. Comme l'illustre la **figure 14**, l'accumulation de ces TUs a été impliquée directement ou indirectement dans un spectre de MCV athéromateuses et non-athéromateuses⁸². Ainsi, l'objectif de ce premier axe de thèse repose sur la compréhension des différents mécanismes qui sous-tendent l'influence des TUs d'origines alimentaire et intestinal sur le risque de MCV chez les patients atteints de MRC. Ce travail facilitera le bon déroulement des axes de la thèse, l'élaboration, et l'interprétation des résultats de l'objectif suivant.



MCV : maladies cardiovasculaires ; ATH : athéromateuses.

Figure 14 : Description schématique des effets des toxines urémiques sur les maladies cardiovasculaires dans la maladie rénale chronique.

2.3 MÉTHODES

Pour atteindre pleinement l'objectif et fournir une explication complète qui tienne en compte les dernières mises à jour sur le sujet, nous avons effectué une revue de littérature exhaustive sur toutes les études publiées entre 2002 et 2022 (**Annexe 1**). Nous avons systématiquement effectué une recherche bibliographique (dans la base de données PubMed, jusqu'au 28 février 2022 qui était le dernier temps avant la soumission de l'article pour publication) pour identifier les publications évaluant l'effet des TUs sur les MCV chez les adultes atteints de MRC, en combinant les mots-clés suivants : ("Chronic kidney disease" OR "renal impairment" OR "kidney disease" OR "chronic kidney failure" OR "chronic renal failure") AND ("Cardiovascular disease" OR "vascular calcification" OR "oxidative stress" OR "coronary artery disease" OR "atherosclerosis" OR "peripheral artery disease" OR "cardiovascular damage" OR "Cardiovascular Diseases" [Mesh] OR "arrythmia" OR "stroke" OR "cardiovascular death" OR "myocardial infarction") AND ("uremic toxin*" OR "uremic retention solute*" OR "cardiovascular toxin*" OR "indoxylo sulfate" OR "p-Cresyl sulfate" OR "p-cresyl glucuronide" OR "indole-3-acetic acid" OR "hippuric acid" OR "kynurenic acid" OR "kynurenine" OR "3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid" OR

"Phenylacetylglutamine" OR "trimethylamine N-oxide") AND ("in vivo" OR "in vitro" OR "animal*" OR "cohort" OR "study" OR "clinical" OR "human" OR "patients"). Au total, 256 articles ont été analysés. Nous avons exclu 9 études sur la pédiatrie, 94 revues et méta-analyses, et 15 études portant sur d'autres TUs que celles alimentaires ou intestinales. Au total, 138 articles originaux ont été sélectionnés, et ont fait l'objet d'une publication d'un revue narrative en 2022¹. Sauf qu'en Juin 2023, la publication d'un des articles cités dans notre revue¹³⁹ a été rétractée, ce qui fait que les résultats de cet article ne seront plus inclus dans la présente thèse.

2.4 RESULTATS

2.4.1 Maladies cardiovasculaires

Nous avons décrit dans la partie 1.1.3.2. de l'introduction que les MCV sont plus prévalentes chez les patients atteints de MRC que chez les individus dans la population générale, et qu'elles peuvent être classées en tant que MCV **athéromateuses** et **non-athéromateuses** en bien expliquant chacune. Nous allons rajouter dans cette revue narrative une 3^e classification des MCV qui ne sont ni athéromateuses ni non-athéromateuses, ci-après dénommées « **MCV autres que athéromateuses et non-athéromateuses** ». Cette classe inclut l'agrégation plaquettaire, la formation de thrombose et le dysfonctionnement des CE. De nombreuses études ont souligné les dommages vasculaires causés par la MRC. En effet, la progression de la MRC est étroitement liée à l'augmentation des niveaux de stress oxydatif et d'inflammation, lesquels sont eux-mêmes responsables de l'augmentation des lésions cardiovasculaires et de la mortalité¹⁴⁰. Il a été aussi fréquemment démontré que la MRC est associée à une augmentation de l'activation plaquettaire¹⁴¹ et du risque de thrombose veineuse et artérielle^{142,143}. Sachant que les patients atteints de MRC subissent fréquemment des procédures endovasculaires ; le risque de thrombose post-angioplastie ou de thrombose de l'accès vasculaire est significativement élevé dans cette population à haut risque, plaçant la MRC en tant que deuxième facteur de risque de complications post-opératoires¹⁴⁴.

2.4.2 Toxines urémiques et risque de maladies cardiovasculaires

Certaines TUs sont associées à une majoration du risque de MCV chez les patients atteints de MRC. Plusieurs études *in vitro*, *in vivo* et *observationnelles* ont évalué à l'impact des TUs d'origine alimentaire et intestinale sur le risque cardiovasculaire. Nous allons présenter dans cette partie les derniers résultats selon le type d'étude, et selon le type de MCV : **athéromateuses, non-athéromateuses, et autres types de relations qu'avec les maladies cardiovasculaires athéromateuses et non-athéromateuses.**

2.4.2.1 *Données expérimentales : études in vitro*

Cette sous-partie résume les études *in vitro* qui évaluent l'impact des TUs sur les MCV dans un contexte de MRC. Concernant les TUs liées aux protéines, la plupart des études suivantes ont ajouté de l'albumine sérique humaine. Cette addition devrait être prise en compte dans un tel contexte, et surtout lors de l'interprétation des résultats afin de refléter leurs effets cliniques réels¹⁴⁵.

Des résultats récents ont démontré que les TUs contribuent aux MCV par divers mécanismes, dont les plus importants sont le dysfonctionnement endothérial et la calcification vasculaire causés principalement par le stress oxydatif et l'inflammation. Par exemple, une étude récemment parue¹⁰², sur les CE microvasculaires cutanées humaines primaires, a montré que les indoles dérivés du tryptophane (IS, kynurénine et KA) étaient associés à l'aggravation de la maladie artérielle périphérique. Ces TUs ont activé l'AhR, et donc diminué l'activité de Wnt/β-caténine provoquant ainsi un dysfonctionnement de la CE et une altération de l'angiogenèse.

Des études sur différents modèles *in vitro* ont révélé que l'IS, l'IAA, le PCS, l'HA, le phosphate et l'urée engendraient un stress oxydatif en augmentant la production d'espèces réactives de l'oxygène^{146–153} ou en activant la production de radicaux libres¹⁵⁴, contribuant ainsi au dysfonctionnement endothérial et à l'apoptose. Itoh et al.¹⁵⁵ ont rapporté que l'IS induisait une production d'espèces réactives de l'oxygène nettement plus importante que celle observée avec le CMPF.

Shang et al.¹⁵⁶ ont conclu que l'IS, l'IAA et l'HA augmentaient les niveaux de miR-92a, un microARN induit par le stress oxydatif dans les CE et qui est impliqué dans l'athérosclérose. De plus, l'IS était impliqué dans la physiopathologie de l'athérosclérose en augmentant l'expression des molécules d'adhésion : molécule d'adhésion intercellulaire-1, molécule d'adhésion cellulaire vasculaire-1, protéine chimiотactique monocytaire-1 et e-sélectine^{157,158}, et en activant la voie de la protéine kinase activée par le mitogène p42/44 favorisant ainsi la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires¹⁵⁹.

Des expériences sur les CE de la veine ombilicale humaine ont démontré que le PCS avait un effet néfaste sur les CE en (i) stimulant directement la kinase associée à la protéine Rho¹⁶⁰, (ii) augmentant l'expression de la Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase et donc la production d'espèces réactives de l'oxygène¹⁴⁸, (iii) induisant la libération de microparticules endothéliales¹⁶¹, et (iv) inhibant (avec l'IS) la prolifération et la réparation des lésions endothéliales¹⁶². Le phosphate (la TU la plus étudiée *in vitro*) endommage également les CE. L'excès de phosphate a bloqué la progression de la phase G1/S, réduisant ainsi la prolifération des CE¹⁶³, et a également réduit l'expression de l'annexine II rendant ainsi les CE plus rigides¹⁶⁴. Dans des expériences sur des anneaux aortiques, un excès de phosphate a provoqué une vasoconstriction : il a augmenté la contraction induite par la phényléphrine et a diminué la relaxation induite par l'acétylcholine¹⁶⁵. De plus, il a accéléré le dépôt de calcium sur les parois des artéries et a diminué la vasodilatation ainsi que la production d'oxyde nitrique dans les cellules musculaires lisses vasculaires humaines¹⁶⁶. L'urée a également perturbé les CE, soit par un effet direct sur les cellules, soit indirectement par la carbamylation des protéines. Elle a facilité l'activation des voies pro-athérosclérotiques : Elle a provoqué la formation excessive de pièges extracellulaires de neutrophiles dans les CE de la veine ombilicale humaine¹⁶⁷, a altéré les jonctions cellule-cellule dans une lignée de CE humaines immortalisées¹⁶⁸, a induit l'expression de la protéine BAD associée à la mort des cellules musculaires lisses aortiques humaines¹⁶⁹, et a inhibé la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (enzyme clé impliquée dans la glycolyse) et la prostacycline synthase (substance chimique produite notamment dans les CE permettant la régulation de l'inflammation et de la coagulation).

sanguine) au niveau des CE aortiques humaines¹⁵². En termes d'effet indirect, la carbamylation des lipoprotéines de haute densité (HDL) a inhibé la migration, l'angiogenèse et la prolifération des CE, et donc les fonctions de réparation endothéliale¹⁷⁰. TMAO a contribué aux processus d'athérosclérose dans divers modèles. Il a favorisé l'adhésion des leucocytes aux CE, le dysfonctionnement endothérial et la calcification vasculaire en activant l'inflamasome *nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing-3* connu sous NLRP3 et les signaux du facteur nucléaire kappa B¹⁷¹⁻¹⁷⁴.

Plusieurs mécanismes mènent à la calcification vasculaire. Des études sur les cellules musculaires lisses aortiques humaines ont montré que l'IS induisait la calcification aortique en activant la voie de signalisation du facteur nucléaire kappa B¹⁷⁵, en réduisant l'expression de Klotho (récepteur du FGF-23)¹⁷⁶, et en induisant la génération d'espèces réactives de l'oxygène et l'expression de NADPH oxydases, de la phosphatase alcaline et de l'ostéopontine¹⁴⁶. Dans l'étude de Bouabdallah et al.¹⁷⁷, l'IS et le phosphate ont induit la sécrétion d'interleukine-8 par les CE, favorisant ainsi la calcification vasculaire. De plus, le phosphate a favorisé la calcification de la matrice extracellulaire et a augmenté l'expression des marqueurs d'ostéoblastes par les cellules musculaires lisses vasculaires¹⁷⁸. Un milieu riche en phosphate a activé la signalisation du récepteur toll-like 4 et du facteur nucléaire kappa B¹⁷⁹ et a augmenté l'expression de l'aldostérone-synthase, ce qui a induit la transdifférenciation ostéogénique et la calcification des cellules musculaires lisses vasculaires¹⁸⁰. Dans une étude portant sur les cellules mononucléaires du sang périphérique, le phosphate a modulé l'expression de miR-223 et a réduit l'ostéoclastogenèse¹⁸¹. Il a induit la différenciation ostéoblastique dans les cellules musculaires lisses vasculaires¹⁸², a réduit l'expression du perlécan et a induit l'expression de la protéine morphogénétique osseuse 2 (impliquée dans les voies de transdifférenciation ostéogénique) dans des anneaux aortiques de rat (ex vivo) et des cellules musculaires lisses vasculaires humaines¹⁸³. Enfin, le phosphate a médié la calcification vasculaire en augmentant l'activité de la phosphatase alcaline dans les cellules musculaires lisses vasculaires¹⁸⁴.

Il a été montré que l'IS contribue aux MCV à travers les associations avec l'arythmie, l'hypertrophie cardiaque et la fibrose. L'effet arythmogène de cette TU a été évalué dans les

cardiomyocytes embryonnaires de rat : l'IS a inhibé le canal ionique potassique, prolongeant ainsi le potentiel d'action et l'intervalle QT, et induisant une dépolarisation précoce¹⁸⁵. Lekawanvijit et al.¹⁸⁶ étaient les premiers à démontrer l'effet fibrotique de l'IS; cela a été confirmé plus tard par Liu et al.¹⁸⁷. L'IS a exercé des effets pro-fibrotiques, pro-hypertrophiques et pro-inflammatoires en activant les voies de protéine kinase activée par les mitogènes et du facteur nucléaire kappa B^{186,187}. De plus, l'IS a augmenté la synthèse de collagène dans les fibroblastes cardiaques chez les rats, a favorisé l'hypertrophie des myocytes, et a stimulé l'expression du facteur de nécrose tumorale-alpha et de l'interleukine-6¹⁸⁶.

Les indoles sont également connus pour avoir un effet prothrombotique. Nous avons vu que l'IS et l'IAA activaient l'AHR: ceci conduit à une augmentation de l'expression du facteur tissulaire¹⁸⁸⁻¹⁹⁰. Gao et al.¹⁹¹ ont démontré que l'IS et l'IAA endommageaient les globules rouges, ce qui pourrait entraîner la formation de caillots sanguins.

Les TUs présentent également des effets indirects sur les MCV. En particulier, le CMPF a inhibé la sécrétion d'insuline¹⁹², et l'urée a augmenté l'expression des adipokines, à savoir la *retinol binding protein 4* et la résistine¹⁹³.

2.4.2.2 *Données expérimentales: études *in vivo**

Nous allons présenter ci-après les études animales qui évaluent l'impact des TUs sur les MCV athéromateuses ou non.

Maladies cardiovasculaires athéromateuses

Arinze et al.^{101,102} ont étudié l'effet des indoles dérivés du tryptophane sur les maladies artérielles périphériques en utilisant des modèles de souris avec MRC induite par l'adénine et des modèles de souris auxquels de l'IS a été administré¹⁰². Comme ils l'ont montré dans les modèles *in vitro* (présenté dans la partie 2.3.2.1), l'IS, la kynurénine et la KA ont également augmenté l'activité de l'AHR dans ces modèles *in vivo*, entraînant donc la suppression de la voie Wnt/β-caténine. Ce phénomène a conduit à une angiogenèse altérée et a provoqué une ischémie des membres inférieurs. Cette complication de maladies

artérielles périphériques a également été observée par Hung et al. et Matsumoto et al.^{194,195}, qui ont conclu que l'IS diminuait la mobilisation des cellules progénitrices endothéliales et altérait la néovascularisation¹⁹⁴, et que le TMAO a altéré les facteurs relaxants dérivés de l'endothélium¹⁹⁵. Les résultats des études *in vivo* suggèrent que le PCS, l'HA, l'urée et le TMAO contribuent à l'accélération de l'athérosclérose. Dans une étude menée sur des souris ApoE(-/-) ayant subi une néphrectomie de 5/6, Han et al.¹⁹⁶ ont montré que le PCS induisait la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires et perturbait l'équilibre entre les métalloprotéinases matricielles et les inhibiteurs de métalloprotéinases. Huang et al.¹⁵³ et Shang et al.¹⁵⁶ ont complété leurs résultats *in vitro* en étudiant le rôle de l'HA dans l'induction de l'athérosclérose dans des modèles animaux. L'HA a provoqué un stress oxydatif et une dysfonction endothéliale, a altéré la vasodilatation dépendante de l'endothélium¹⁵³ et a induit la miR-92a¹⁵⁶. Des études récentes ont révélé que le TMAO est également impliqué dans l'induction de l'athérosclérose. Il a activé l'expression de composants des voies de signalisation CD36/ protéines kinases activées par des agents mitogènes et le facteur nucléaire kappa B^{197,198}, favorisant ainsi la formation de cellules spumeuses¹⁹⁷ et l'inflammation vasculaire¹⁹⁸. De plus, Koeth et al.¹⁹⁹ ont montré que le TMAO était lié à des événements cardiaques majeurs, principalement des IDM et des AVC. Massy et al. ont confirmé le rôle de l'urée²⁰⁰ et ont conclu que ce composé aggravait l'athérosclérose en favorisant la calcification des artères.

Maladies cardiovasculaires non-athéromateuses

Il a été montré qu'en plus des MCV athéromateuses, l'IS, le PCS, le phosphate et l'urée ont favorisé les MCV non-athéromateuses en général et la calcification vasculaire en particulier. L'IS et le PCS ont induit une calcification sévère de l'aorte et des artères périphériques : l'IS a diminué la production d'oxyde nitrique et augmenté la phosphorylation de l'oxyde nitrique synthase endothéliale²⁰¹, et l'IS et le PCS ont activé les voies d'inflammation et de coagulation²⁰². Selon Chen et al.¹⁷⁶, l'IS a favorisé la calcification aortique en réduisant l'expression de Klotho. De plus, Muteliefu et al.²⁰³ et Adijiang et al.^{204,205} ont montré que l'IS accélérerait l'épaississement de la paroi aortique et la calcification vasculaire suite à l'augmentation de l'expression de p16, p21, p53, pré-laminine A et de la

protéine spécifique des ostéoblastes qui induit la sénescence des cellules musculaires lisses vasculaires. Le phosphate a également induit la calcification des cellules musculaires lisses vasculaires²⁰⁶ et a été associé à la calcification artérielle médiale^{207,208}. Un excès de phosphate a augmenté l'expression du facteur de nécrose tumorale alpha, des marqueurs ostéochondrogéniques²⁰⁹, ainsi que du facteur de transcription runt-2 de l'aorte²¹⁰, ce qui a induit une inflammation systémique et la calcification des cellules musculaires lisses vasculaires. Chez des rats mâles Sprague-Dawley ayant subi une néphrectomie de 5/6, des concentrations élevées en phosphate ont provoqué une calcification médiale en augmentant l'activité de la phosphatase alcaline non spécifique du tissu²¹¹.

Les TUs ont contribué à la fibrose cardiaque, à l'arythmie et à l'hypertrophie cardiaque. L'exposition à l'IS a aggravé la fibrose cardiaque et l'hypertrophie des cardiomyocytes en augmentant le stress oxydatif et en diminuant les défenses antioxydantes^{212,213}. Chen et al. ont montré que ces changements²¹⁴ ont augmenté l'arythmogenèse atriale. Des concentrations élevées de phosphate ont également conduit à l'hypertrophie cardiaque et à la fibrose²¹⁵. Il a été démontré que des concentrations élevées de phosphate ont entraîné une réduction des niveaux de Klotho dans les modèles murins de MRC²¹⁵. De plus, des concentrations élevées d'urée ont conduit à une microangiopathie systémique, une hypoxie tissulaire et une angiogenèse dysfonctionnelle²¹⁶. Des concentrations élevées d'urée ont également induit une inflammation systémique, responsable de l'épaississement de l'artère sous-épicardique²¹⁷. La toxicité du PCS était liée à une augmentation de l'expression de la NADPH oxydase et de la production d'espèces réactives de l'oxygène chez des souris néphrectomisées à 5/6; ces changements ont contribué à l'apoptose des cardiomyocytes, qui à son tour a aggravé le dysfonctionnement diastolique²¹⁸.

Autres types de relations qu'avec les maladies cardiovasculaires athéromateuses et non-athéromateuses

Il a été suggéré que l'IS, la kynurénine et le TMAO augmentent le risque de thrombose. L'IS a augmenté l'expression et l'activation du facteur tissulaire de manière dépendante de l'AHR après injection d'IS chez la souris¹⁰⁴. De plus, l'IS a activé la

signalisation des voies d'espèces réactives de l'oxygène/protéines kinases activées par des agents mitogènes p38 et réduit l'expression de Klotho, ce qui aggraverait l'effet sur l'agrégation plaquette et la formation de thrombus²¹⁹. La kynurénine a causé la coagulation suite à une lésion vasculaire²²⁰. Zhu et al.²²¹ ont conclu que le TMAO a renforcé l'hyperréactivité plaquette et a ainsi contribué au risque de thrombose.

Plusieurs mécanismes favorisent la dysfonction des CE. Chez les rats néphrectomisés à 5/6, l'urée a augmenté la production d'espèces réactives de l'oxygène, induisant ainsi un stress oxydatif dans la circulation systémique^{193,222,223}. De plus, une augmentation du TMAO circulant a été associée à une diminution de la production d'oxyde nitrique²²⁴.

Le stress oxydatif induit par l'urée contribue également à la résistance à l'insuline. L'urée a augmenté le stress oxydatif et la O-GlcNAcylation des protéines, perturbant ainsi la sécrétion d'insuline et la glycolyse²²². D'Apolito et al.¹⁹³ ont montré que l'urée a augmenté la production d'espèces réactives de l'oxygène et a favorisé la résistance à l'insuline et l'intolérance au glucose. L'IS et le PCS engendrent aussi des effets indirects, étant donné qu'ils étaient fortement associés à une altération de l'homéostasie du glucose, et donc à l'hyperglycémie et à la résistance à l'insuline²⁰². Koppe et al.²²⁵ ont conclu que le PCS seulement (mais non pas le PCG) induisait une résistance à l'insuline en activant les kinases régulées par des signaux extracellulaires, modifiant ainsi la signalisation de l'insuline dans le muscle squelettique²²⁶. En outre, les résultats *in vitro* de Nagy et al.¹⁹² sur le rôle du CMPF dans la promotion de la résistance à l'insuline ont été confirmés *in vivo*¹⁹².

2.4.2.3 *Etudes observationnelles*

Certaines études observationnelles visaient à élucider l'association entre les TUs et les MCV athéromateuses et/ou non-athéromateuses chez les patients atteints de MRC.

Maladies cardiovasculaires athéromateuses et non-athéromateuses

Chez 147 patients atteints de MRC (stade 1 à 5), des concentrations plasmatiques élevées d'IS étaient associées à des événements cardiovasculaires majeurs indépendamment du DFG et de l'état nutritionnel²²⁷. De même, Dou et al. ont montré une association

significative entre les concentrations sériques d'IAA et la survenue des évènements cardiovasculaires majeurs chez 120 patients atteints de MRC (stades 3 à 5), même après des ajustements multiples¹⁴⁷. Une étude récente menée par Konje et al.²²⁸ a trouvé une association positive entre la kynurénine et les MCV athéromateuses et non-athéromateuses incidentes, y compris les IDM, l'angine de poitrine, la chirurgie de pontage coronarien, l'angioplastie/stent d'une artère coronaire, les AVC, la maladie artérielle périphérique, l'insuffisance cardiaque congestive et les arythmies chez des patients atteints de MRC (stades 1 à 5). Wu et al.²²⁹ ont montré que des concentrations sériques élevées de PCS libre étaient associées à la mortalité cardiovasculaire chez les patients hémodialysés. Une étude menée par Liabeuf et al.²³⁰ a démontré que les concentrations sériques de PCG étaient positivement corrélées à la mortalité cardiovasculaire, indépendamment des prédicteurs de survie. Ces résultats montrent que même si le PCG est le métabolite minoritaire du p-crésol, il semble avoir une association avec la mortalité similaire à celle du PCS et de l'IS. Plusieurs études ont confirmé le lien entre le phosphate et les MCV et la mortalité. Chez 13 292 patients atteints de MRC de stades 3 à 5, le phosphate sérique était positivement corrélé à un risque accru d'AVC incident, d'attaque ischémique transitoire, d'IDM, de maladie coronarienne avancée, d'insuffisance cardiaque incidente et de mortalité²³¹. Une concentration sérique élevée de phosphate était significativement associée à la mortalité cardiovasculaire dans de nombreuses études²³²⁻²³⁵. De manière similaire, des concentrations sériques élevées de TMAO étaient associés à des évènements cardiovasculaires et à la mortalité chez les patients hémodialysés, y compris des évènements coronariens, des arythmies, une mort cardiaque subite et une insuffisance cardiaque congestive²³⁶.

L'urée a des effets directs et indirects sur les évènements cardiovasculaires chez les patients atteints de MRC. Une étude récente menée par Laville et al.⁶⁹ a montré une association directe entre des concentrations sériques élevées d'urée et un risque accru de MCV athéromateuses, non-athéromateuses, et de mortalité chez des patients pré-dialysés. Il existe diverses hypothèses pouvant expliquer la toxicité des concentrations élevées d'urée, notamment la carbamylation des protéines (une modification post-traductionnelle des protéines avec diverses conséquences biologiques, principalement liées à l'athérogenèse)

²³⁷. Berg et al. ²³⁸ ont affirmé que des concentrations élevées d'urée étaient positivement corrélées avec la carbamylation de l'albumine sérique et ont suggéré que cette carbamylation avait un impact sur les MCV et la mortalité.

Toutes les études mentionnées ci-dessus ont conclu qu'il existait une association significative et indépendante entre différentes TUs et le risque de complications cardiovasculaires. Cependant, quelques études n'ont pas trouvé d'association après ajustement sur les facteurs de confusion, et d'autres n'ont trouvé aucune association entre certaines TUs et la morbidité/mortalité cardiovasculaire. L'étude *Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC)* menée par Chen et al. ²³⁹ a inclus 3 407 patients atteints de MRC mais sans défaillance rénale. Les résultats ont montré qu'une clairance rénale de 24h plus faibles des solutés urémiques IS, KA et PCS étaient associées à l'incidence de l'insuffisance cardiaque et de l'IDM. Cependant, cette association n'était pas statistiquement significative après ajustement sur le DFGe. Dans l'étude HEMO, Shafi et al. ²⁴⁰ ont conclu que l'IS, le PCS, la PAG et l'HA n'étaient pas associés à des événements cardiovasculaires (événements coronariens, maladie vasculaire périphérique, maladie cardiaque ischémique, insuffisance cardiaque congestive ou arythmies). Toutefois, des concentrations élevées d'IS étaient prédictives de la mort cardiaque et de la mort subite chez les patients présentant un taux d'albumine plus bas. Il a été démontré que des concentrations sériques élevées de CMPF n'étaient pas associées à aucun type de MCV chez des patients hémodialysés ⁹³, et que des concentrations de phosphate plus élevées étaient associées à une augmentation de la mortalité cardiovasculaire chez des patients atteints de MRC du stade 1 à 4, mais cette dernière association n'était pas statistiquement significative après ajustement sur le DFGe ²⁴¹. Dans une étude portant sur 235 patients sous hémodialyse, Kaysen et al. ²⁴² n'ont pas trouvé d'association significative entre le TMAO et les hospitalisations cardiovasculaires ou la mortalité.

Bien que certaines études aient examiné l'association des TUs à la fois avec les MCV athéromateuses et non-athéromateuses, de nombreuses études se sont concentrées soit sur l'une soit sur l'autre.

Maladies cardiovasculaires athéromateuses

Dans une étude portant sur 100 patients hémodialysés, des concentrations sériques élevées d'IS et de PCS étaient associées à la maladie artérielle périphérique et à des marqueurs d'artériosclérose²⁴³. En plus, Arinze et al.¹⁰² ont confirmé leurs résultats *in vitro* et *in vivo* de l'effet des indoles dérivés du tryptophane sur la maladie artérielle périphérique dans deux cohortes. La 1^{ère} cohorte incluant 20 patients hémodialysés a conclu que des concentrations plasmatiques élevées d'IS, de kynurénine et de KA étaient associées à une diminution significative de la prolifération et de la migration des CE, par rapport à 15 témoins¹⁰². La 2^{ème} est une étude cas-témoins emboîtée issue d'une cohorte de patients atteints de maladie artérielle périphérique des membres inférieurs qui ont été suivis pendant 2 ans pour les évènements cliniques liés à la maladie artérielle périphérique. Des concentrations plasmatiques élevées d'IS, de kynurénine et de KA étaient associées à un risque accru de survenue ou d'aggravation de : claudication, ischémie critique chronique des membres, thrombose de stent, toute amputation, sténose/resténose, et nouvelles procédures de revascularisation¹⁰². Des concentrations plasmatiques élevées de kynurénine et de KA étaient associées à l'épaisseur intima-média chez 106 patients atteints de MRC²⁴⁴.

Shafi et al.²⁴⁵ ont conclu que des concentrations sériques plus élevées d'IS, de PCS, de PAG et d'HA étaient associées à un plus grand risque d'évènements cardiovasculaires athérosclérotiques fatals ou non fatals chez des patients sous hémodialyse. Des études antérieures avaient déjà montré que des concentrations sériques élevées d'IS étaient associées à des évènements cardiovasculaires athérosclérotiques chez des patients avec une MRC^{246,247}. Une étude sur 70 patients en pré-dialyse a conclu que l'IS était un marqueur de prédiction des MCV²⁴⁶. Dans une cohorte de 224 patients hémodialysés, les concentrations plasmatiques d'IS ont montré une corrélation négative significative avec la HDL, et elles étaient associées à des lésions athérosclérotiques²⁴⁷. Une étude plus ancienne menée par Lin et al.²⁴⁸ en 2010 a montré que des concentrations sériques élevées de PCS étaient significativement associées à des évènements cardiovasculaires athérosclérotiques. En 2016, Poesen et al. ont réalisé deux analyses complémentaires des données de l'étude *Leuven Mild-to-Moderate CKD*. Une analyse complémentaire a montré qu'un rapport plus bas entre PCS

et PCG sériques, ainsi que des concentrations élevées de PCS et PCG totals, étaient associés à des événements cardiovasculaires athérosclérotiques fatals et non fatals²⁴⁹. L'autre analyse a démontré que des concentrations sériques élevées de PAG étaient associées aux MCV même après ajustement sur l'âge, le sexe, la présence de diabète, les antécédents de MCV et le DFGe. Par conséquent, une augmentation des concentrations de PAG a été considérée comme un facteur de risque indépendant pour les MCV majeures (notamment l>IDM et l'AVC)²⁵⁰.

L'étude de l'association entre le PCS et les MCV athéromateuses remonte à une étude menée en 2010 sur 202 patients atteints d'angine de poitrine stable et en phase précoce de MRC, montrant qu'une concentration plasmatique élevée de PCS était associée à la maladie coronarienne et corrélée à la gravité de la maladie²⁵¹. L'association dans la MRC entre l'hyperphosphatémie et les maladies athérosclérotiques a été signalée pour la première fois à partir 2002²⁵² et puis de nouveau récemment²⁵³. Chez 1203 patients atteints de MRC non dialysés, des concentrations sériques élevées de phosphate étaient associées à une augmentation du risque de MCV athéromateuses fatales²⁵⁴. L'hyperphosphatémie était associée à l>IDM dans une étude représentative de 3490 patients atteints de MRC²⁵⁵. Le TMAO est la TU la plus fréquemment étudiée dans les modèles animaux en ce qui concerne son lien avec les MCV athéromateuses. Depuis 2016, plusieurs cohortes ont confirmé ces résultats. Des concentrations élevées de TMAO étaient positivement corrélées à l'athérosclérose coronarienne dans une étude portant sur des patients avec MRC (stade 1 à 5)²⁵⁶ et aux événements cardiovasculaires ischémiques dans une autre étude portant sur 2529 patients de stade 3b ou 4 de la MRC²⁵⁷.

Une seule étude (menée par Melamed et al.²⁵⁸) chez des patients hémodialysés n'a pas réussi à trouver une association entre IS ou PCS et les MCV athéromateuses fatales.

Maladies cardiovasculaires non-athéromateuses

Alors que le TMAO est le composé le plus étudié en ce qui concerne l'effet des TUs sur les MCV athéromateuses *in vivo*, celui le plus étudié pour les MCV non-athéromateuses est l'IS. La plupart des études cliniques observationnelles ont confirmé l'association entre l'IS

et la calcification vasculaire. Une étude récente portant sur des hommes pré-dialysés aux stades 2 à 5 de la MRC évaluant l'IS, l'IAA, le PCS, le PCG et l'HA a montré que chaque TU était indépendamment et significativement associée avec la dysfonction cardiaque subclinique²⁵⁹. Cao et al.²⁶⁰ et Shimazu et al.²⁶¹ ont rapporté que des concentrations plasmatiques élevées d'IS étaient associées à l'insuffisance cardiaque^{260,261} et au décès cardiaque²⁶¹ chez les patients avec MRC. Dans une étude sur 204 patients atteints de MRC ayant une fonction ventriculaire gauche préservée, des concentrations plasmatiques plus élevées d'IS étaient associées à un risque élevé de dysfonction diastolique du ventricule gauche²⁶². Dans une cohorte menée par Barreto et al. sur des patients à différents stades de la MRC²⁶³, les concentrations sériques d'IS étaient indépendamment associées à la vitesse de l'onde de pouls et à la calcification aortique, et le tertile d'IS le plus élevé était associé à la mortalité cardiovasculaire. Une étude menée par Liabeuf et al.²⁶⁴ en 2010 sur des patients à différents stades de la MRC a démontré qu'une concentration sérique élevée de PCS total et libre était significativement associée à la calcification vasculaire, et le PCS libre a été identifié comme associé à la mortalité cardiovasculaire. L'HA a également été étudié en 2018; des concentrations élevées d'HA étaient significativement associées à l'hypertrophie du ventricule gauche chez les patients hémodialysés²⁶⁵. Plusieurs études ont montré que l'hyperphosphatémie était associée à la calcification vasculaire^{266–268}. Petchey et al.²⁶⁶ ont en outre signalé que le phosphate sérique était positivement corrélé à la vitesse de l'onde de pouls et donc à la rigidité artérielle chez des patients atteints de MRC avec un DFGe entre 25 et 60 mL/min/1,73m². Dans une cohorte de 6814 patients atteints de MRC, une concentration sérique élevée de phosphate était associée à la calcification vasculaire et valvulaire²⁶⁷. De plus, Ix et al.²⁶⁹ ont conclu que l'hyperphosphatémie était fortement associée à la rigidité artérielle périphérique chez les patients avec MRC. Comme mentionné précédemment, l'urée exerce sa toxicité de manière indirecte via la carbamylation des protéines. Chez 1255 patients avec une MRC traitée par hémodialyse, des concentrations plus élevées d'urée étaient associées à des taux sériques élevés d'albumine carbamylée, et le tertile supérieur de l'urée était positivement corrélé avec l'insuffisance cardiaque et l'arythmie²⁷⁰.

Autres types de relations qu'avec les maladies cardiovasculaires athéromateuses et non-athéromateuses

De nombreuses études observationnelles ont mis en évidence l'effet nuisible des TUs sur les CE. Une étude incluant des patients pré-dialysés aux stade 1 à 5 de la MRC menée par Glorieux et al.²⁷¹ en 2021 a démontré que des concentrations sériques élevées d'IS, d'IAA, de PCS, de PCG et d'HA étaient corrélées à des marqueurs de dommages endothéliaux, principalement l'angiopoïétine-2, qui est une protéine jouant un rôle essentiel dans l'angiogenèse et qui est impliquée dans l'épaississement de l'intima-média de l'artère carotide, la rigidité artérielle et l'hypertrophie du ventricule gauche^{271,272}. Dans une étude menée par Wang et al.²⁷³ en 2019 sur des patients pré-dialysés, des concentrations sériques élevées d'IS étaient négativement corrélées avec les valeurs de l'indice de réactivité vasculaire. Une étude menée par Jourde-Chiche et al.²⁷⁴ chez des patients hémodialysés a révélé que des concentrations sériques élevées d'IS, d'IAA et de PCS étaient associées à un faible nombre de cellules progénitrices endothéliales. Meijers et al.¹⁶¹ ont étudié le PCS *in vitro* et dans une cohorte de patients hémodialysés ; des concentrations sériques élevées de PCS étaient associées à la présence de microparticules endothéliales circulantes. En 2009 et 2010, Pawlak et al. ont étudié la toxicité de la kynurénine et de son métabolite le KA chez des patients atteints de MRC ; les deux étaient associés à un stress oxydatif élevé, à l'inflammation et à une dysfonction des CE^{244,275,276}. Les chercheurs ont trouvé que les concentrations plasmatiques de KA étaient positivement associées à l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire et négativement associées au fragment 1 + 2 de la prothrombine chez des patients avec MRC sous traitement conservateur²⁷⁷ et chez des patients sous dialyse péritonéale²⁷⁸. Pawlak et al. ont également conclu que les concentrations plasmatiques de kynurénine étaient positivement associées à la thrombomoduline et au facteur de von Willebrand (deux marqueurs de la dysfonction des CE) chez des patients au stade terminale de la MRC²⁷⁹.

De plus, des concentrations sériques élevées de kynurénine et de KA étaient indépendamment et significativement associées à une hypercoagulabilité chez les dialysés²⁸⁰. Des concentrations sériques élevées d'IS et de kynurénine pourraient contribuer aux

complications post-angioplastie. Des concentrations élevées d'IS^{220,281} et de kynurénine²²⁰ étaient associées à la thrombose post-angioplastie chez les dialysés.

Il est important de noter que des concentrations élevées de PCS libre et de PCG libre avaient l'association la plus forte avec les MCV même après avoir ajusté pour le DFGe dans une étude de patients pré-dialysés aux stade 1 à 5 de la MRC²⁷¹.

2.5 CONCLUSION

Nous avons principalement passé en revue des TUs dérivées de l'intestin vu que la plupart d'entre elles sont des solutés liés aux protéines qui sont difficiles à éliminer du plasma par les méthodes classiques de dialyse, et leur accumulation dans la circulation est associée à de nombreux effets néfastes notamment les complications cardiovasculaires. Nous avons également passé en revue le phosphate et l'urée, dont la toxicité est connue depuis longtemps mais qui est encore en cours d'exploration. Les MCV posent un problème majeur chez les patients atteints de MRC et constituent la principale cause de décès au sein de cette population⁸². Des stratégies visant à modifier les concentrations de TUs ont été décrites dans des revues précédentes^{88,282}. Une approche combinée, ciblant à la fois les TUs et d'autres aspects de la MCV, pourrait être nécessaire pour prévenir ces complications. Il est à noter que la relation entre la MRC et les MCV est bidirectionnelle : les MCV peuvent également avoir un impact sur la santé rénale, causant des lésions rénales et la progression de la maladie, ce qui crée le syndrome cardio-rénal²⁸³.

3 CHAPITRE 3: KYNURENINE ET RISQUE D'EVENEMENTS CARDIOVASCULAIRES

3.1 RESUME

Contexte : La kynurénine est une TU liée aux protéines dont les concentrations sériques sont augmentées en cas de MRC. Des études expérimentales ont montré que la kynurénine exerçait des effets cardiovasculaires délétères. Nous avons cherché à évaluer une association entre les concentrations sériques de kynurénine et les évènements cardiovasculaires fatals ou non fatals et la mortalité toutes causes confondues chez les patients atteints de MRC.

Méthodes : L'étude CKD-REIN est une cohorte prospective de personnes atteintes de MRC ayant un DFGe <60 ml/min/1,73 m². Des échantillons congelés des TUs à l'inclusion ont été mesurés à l'aide d'une technique validée de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Des modèles de Cox cause-spécifique ont été utilisés pour estimer les rapports de risque instantané (HR) pour chaque évènement d'intérêt.

Résultats : Parmi les 2406 patients inclus (âge médian : 68 ans ; DFGe médian : 25 ml/min/1,73 m²), 52 % avaient des antécédents de MCV. Un doublement des concentrations sériques de kynurénine libre était associée à une augmentation de 18 % du risque d'évènements cardiovasculaires [466 événements, HR (IC 95 %) : 1,18 (1,02, 1,33)], indépendamment du DFGe, des concentrations du tryptophane sérique libre ou d'autres TUs, des médicaments cardioprotecteurs et des facteurs de risque cardiovasculaires traditionnels. La kynurénine sérique libre était associée de manière significative aux évènements cardiovasculaires non-athéromateux [HR (IC à 95 %) : 1,26 (1,03, 1,50)], mais pas aux évènements cardiovasculaires athéromateux [HR (IC à 95 %) : 1,15 (0,89, 1,50)]. L'association de la kynurénine sérique libre avec la mortalité cardiovasculaire était également significative de manière indépendante [87 événements ; HR ajusté (IC à 95 %) : 1,64 (1,10, 2,40)]. Cependant, l'association de la kynurénine sérique libre avec la mortalité toute cause n'était plus significative après ajustement sur le tryptophane sérique libre [311 événements,

HR (IC 95 %) : 1,12 (0,90, 1,40)].

Conclusion : Nos résultats impliquent que la kynurénine sérique libre, indépendamment d'autres facteurs de risque cardiovasculaire (y compris le DFGe), est associée aux évènements cardiovasculaires fatals ou non fatals, en particulier des évènements cardiovasculaires non-athéromateux ; chez les patients atteints de MRC. Les stratégies visant à réduire les concentrations sériques de kynurénine devraient être évaluées dans des études ultérieures.

3.2 INTRODUCTION

La plupart des TUs les plus néfastes sont dérivées du métabolisme intestinal des acides aminés⁸⁹. Le métabolisme du tryptophane est le plus étudié dans des travaux antérieurs étant donné l'implication des TUs qui en dérive (les indoles et les toxines dérivées de la voie kynurénique) (**Figure 9**) dans les atteintes vasculaires^{97,103}.

Les résultats de la revue narrative présentés dans le chapitre 2 précédent ont montré qu'il existe un manque dans la littérature sur l'évaluation de l'effet de la kynurénine, une des TU dérivée du tryptophane, sur la morbi-mortalité cardiovasculaire chez les pré-dialysés. Par conséquent, nous avons opté pour l'évaluation de cette toxine en tant que prochain objectif de notre présente thèse.

La voie kynurénique est celle la plus fréquente issue du métabolisme du tryptophane, et la kynurénine est le premier métabolite dérivé de cette voie¹⁰⁰. Comme déjà expliqué, les concentrations sériques de la kynurénine sont augmentées durant la MRC, non seulement en raison de la diminution de la clairance rénale, mais aussi suite à des altérations du métabolisme du tryptophane liées à l'état d'inflammation qui est la MRC¹⁰⁰.

Les études expérimentales présentées dans la revue du chapitre 2 ont conclu sur l'effet cardiotoxique de la kynurénine dans la MRC, y compris les maladies artérielles périphériques et la thrombose^{102,220}.

L'association entre les concentrations de kynurénine totale et les MCV incidentes/la mortalité toute cause a été surtout rapportée dans la population générale notamment chez

les personnes âgées et chez les patients atteints d'angor stable. Ces études ont porté sur des effectifs supérieurs à 1000 patients, par exemple 1574 participants dans une étude et 7010 participants dans une autre²⁸⁴⁻²⁸⁷. Cependant, **très peu d'études observationnelles ont montré l'association entre la kynurénine totale et les MCV chez les patients pré-dialysés**¹⁰², **aucune des études précédentes n'a étudié l'association avec la mortalité toute cause chez les pré-dialysés**²⁸⁸, et **aucune n'a inclus dans l'évaluation la fraction libre**²⁸⁹ de la kynurénine qui est la partie pathologique, dans un large échantillon représentatif. Le dosage de la fraction libre des TUs liées aux protéines est généralement complexe, ce qui explique la disponibilité limitée de données sur la kynurénine libre²⁹⁰. En outre, les données sur la kynurénine portent surtout sur leur association avec les MCV du type athéromateux. En revanche, compte tenu du poids de la MCV non-athéromateuse dans la MRC, il est important d'évaluer séparément le lien entre la kynurénine et la MCV en fonction du type athéromateux ou non.

L'objectif de la présente étude était d'évaluer **l'association entre les concentrations sériques** de chacun **des kynurénine** totale et **libre** (en se concentrant surtout sur cette dernière fraction qui n'a jamais été considérée dans des études précédentes) **et la survenue d'un premier évènement cardiovasculaire fatal ou non**, globalement et par sous-types des pathologies cardiovasculaires (athéromateux et non-athéromateux), dans un large échantillon national français de patients pré-dialysés. Nous avons aussi évalué **l'association indépendante avec la mortalité toute cause avant défaillance rénale**, globalement et par sous-types de mortalité cardiovasculaire ou non cardiovasculaire.

3.3 MÉTHODES

3.3.1 Population

Cette étude a été réalisée à partir des données de la cohorte nationale française « CKD-REIN » présenté dans le sous-chapitre de l'introduction 1.4. ci-dessus. Tous les patients (3033 patients) ont signé un consentement éclairé avant leur inclusion pour un suivi annuel de cinq ans.

Cette cohorte a reçu les avis favorables du comité de protection des personnes de Bicêtre, de l'*International review board* (IRB00003888) de l'Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM, Paris, France) et de la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés. Les détails du protocole de l'étude ont été précédemment publiés¹³².

Afin de répondre aux objectifs de la présente étude, les patients devaient disposer d'un échantillon biologique disponible pour les déterminations des TUs et du tryptophane (prélevés dans un tube sec). Les patients n'ont pas forcément été prélevés pour tous les types de tubes (héparine, tubes sec, EDTA, ...). 2675 patients ont eu les premiers prélèvements avec un tube sec pour pouvoir doser les toxines. On note aussi qu'il peut exister des dates de prélèvements différentes des dates d'inclusion. La réalité CKD-REIN fait que les dates de prélèvements biobanque ne coïncident pas forcément avec les dates de suivi (inclusion, 2 ans ou 5 ans). L'explication est principalement logistique : un patient n'ayant pas eu le temps de faire le prélèvement biobanque le jour de son inclusion, doit revenir plus tard pour réaliser ce prélèvement. Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons choisi d'inclure les patients ayant la date de prélèvement le même jour que l'inclusion, ou bien au maximum 3 mois au-delà de l'inclusion à condition que les évènements d'intérêts (dans la présente étude mortalité toute cause, MCV et défaillance rénale) n'aient pas eu lieu entre l'inclusion et les 3 mois après l'inclusion. Dans la présente étude, nous avons pu étudier **2406** patients avec la majorité prélevée le même jour que l'inclusion et 99 ayant la date de prélèvement après la date d'inclusion avec un délai maximal de 3 mois (**annexe 5**), et avec 1 patient exclu pour lequel son échantillon n'a pas été analysé car le tube était vide donc pas de sérum à analyser.

La **Figure 15** présente le diagramme de flux de la présente étude.

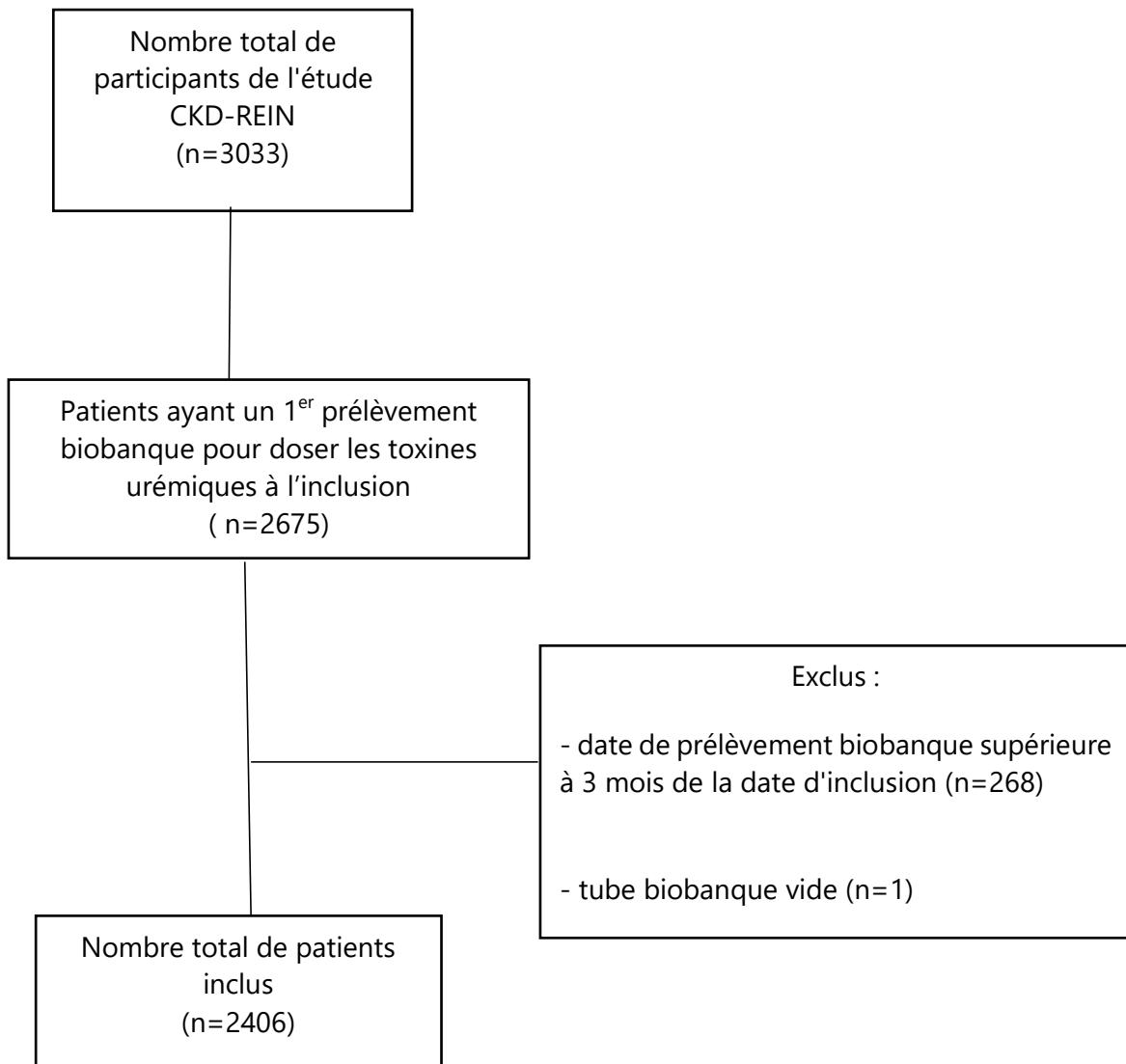


Figure 15 : Diagramme de flux de l'étude

3.3.2 Collection des données

Les données de l'étude CKD-REIN sont recueillies par un système de collecte de données en ligne via un cahier d'observation électronique. De nombreuses données sont recueillies sur les facteurs sociodémographiques et le mode de vie. Les questionnaires relatifs aux patients ont été complétés par des attachés de recherche clinique qualifiés à partir des dossiers médicaux, des entretiens avec les patients et à partir d'un auto-questionnaire rempli par le patient²⁹¹.

Ont été collecté les caractéristiques des patients (âge, sexe et statut tabagique) ainsi que leurs antécédents médicaux détaillés, y compris tout antécédent de diabète, d'HTA, de

dyslipidémie, de MCV et d'insuffisance rénale aiguë. Les patients étaient considérés comme ayant des antécédents de MCV s'ils avaient déjà eu des événements de maladie coronarienne, d'AVC, de maladie vasculaire périphérique, d'insuffisance cardiaque, d'arythmie ou de maladie valvulaire. Ils étaient considérés comme diabétiques si la condition était mentionnée dans leur dossier médical, s'ils avaient des taux sériques d'HbA1c $\geq 7\%$, une glycémie à jeun $\geq 7,0$ mmol/L ou une glycémie aléatoire $\geq 11,0$ mmol/L, ou s'ils utilisaient des médicaments antidiabétiques. De même, les patients étaient considérés comme hypertendu si cela était mentionné dans leur dossier médical, s'ils avaient une pression artérielle systolique ≥ 140 mm Hg ou une pression artérielle diastolique ≥ 90 mm Hg ou s'ils avaient une prescription de médicaments antihypertenseurs, et ils étaient considérés comme souffrant de dyslipidémie si cela a été indiqué dans leur dossier médical ou s'ils utilisaient des médicaments hypolipémiants. La pression artérielle, le poids et la taille des patients étaient évalués lors de la visite chez le néphrologue. L'IMC a ensuite été calculé par le rapport du poids sur la taille au carré. Tous les patients se sont vu prescrire des analyses standard de sang et d'urine (telles que recommandées par les autorités sanitaires françaises pour les soins de routine des MRC), qui ont été effectuées dans leur laboratoire habituel au début de l'étude, ou dans un laboratoire centralisé pour la mesure de la créatinine sérique, la CRP et la cystatine C. L'hémoglobine sanguine, le bicarbonate et l'albumine sériques, ainsi que l'albumine urinaire ou l'ACR ont également été enregistrés. Le DFGe a été calculé à partir de la cystatine C à l'aide de l'équation CKD-EPI (2009) donnant le DFGe le plus précis pour la prédition du risque cardiovasculaire et de la mortalité¹⁰, et l'ACR (albuminurie (mg) / creatininurie (g)) était soit mesuré sur le spot urinaire de l'échantillon prélevé à l'inclusion ou de l'urine de 24h, soit estimé par une équation basée sur des mesures de protéinurie²⁹².

Les informations sur l'utilisation des médicaments ont été obtenues à partir des prescriptions de médicaments lors de l'entretien à l'inclusion. Il a été demandé aux patients d'apporter toutes leurs ordonnances de médicaments des trois mois précédents la visite d'inclusion dans l'étude. Les attachés de recherche clinique ont utilisé un formulaire électronique (lié au *international Anatomical Therapeutic and Chemical [ATC] thesaurus*)

pour saisir les codes standardisés. Les IPPs comprenaient l'oméprazole, l'ésoméprazole, le pantoprazole, le lansoprazole ou le rabéprazole. Les diurétiques incluaient les diurétiques thiazidiques, les diurétiques de l'anse ou les diurétiques distaux. Les médicaments antidiabétiques incluaient les différents types d'insuline, les agents antidiabétiques oraux (metformine, répaglinide, sulfonylurée, inhibiteurs de l'alpha-glucosidase, inhibiteurs de la dipeptidyl peptidase-4) ou les agonistes des récepteurs du *glucagon-like peptide-1*. Les médicaments antihypertenseurs comprenaient des bêtabloquants, des inhibiteurs calciques, des inhibiteurs du système rénine-angiotensine, des inhibiteurs de l'aldostérone, des diurétiques ou d'autres (tels que des agents à action centrale). Les médicaments hypolipémiants comprenaient les statines, les fibrates, les chélateurs des acides biliaires, l'ézétimibe ou les acides gras oméga-3.

3.3.3 Quantification des toxines urémiques et du tryptophane

Lors du recrutement des patients, des échantillons de sérum ont été prélevés, immédiatement stockés à 4°C et aliquotés dans les 6 heures sans traitement supplémentaire. Tous les échantillons CKD-REIN ont été conservés congelés (-80°C) à la Biobanque de Picardie (numéro BRIF : BB-0033-00017) et expédiés congelés dans un laboratoire de pharmacologie parisien pour analyse des TUs. Les deux équipes étaient aveugles des résultats et des caractéristiques des patients. La kynurénine, l'IS, le PCS, l'IAA (qui sont les TUs inclus dans la présente analyse) et le tryptophane ont été dosées dans le sérum à l'aide d'une technique validée de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), comme décrit précédemment²⁹⁰. Ces molécules sont liées aux protéines, par conséquent, leurs concentrations sériques ont été présentées comme libre et totale dans les résultats.

Pour déterminer les concentrations totales (correspondant aux fractions libres et liées aux protéines), 50 µL d'échantillons de sérum ont d'abord été précipités avec 340 µL de méthanol en présence de 25 µL d'étalons internes marqués aux isotopes. Après centrifugation pendant 10 min à 9000 g, le surnageant a été évaporé sous courant d'azote puis reconstitué dans 80 µL d'eau.

Les concentrations libres ont été déterminées par ultrafiltration ; 150 µL de sérum ont été introduits dans un filtre pour centrifugation de porosité 30 kDa, puis centrifugés à 13 300 g pendant 20 min. Etant donné que ces molécules sont majoritairement liées à l'albumine (65 kDa, qui ne passe pas à travers le filtre), le filtrat résiduel ne contenait que la fraction libre.

3.3.4 Evaluation des événements d'intérêts

3.3.4.1 *Evènements cardiovasculaires fatals ou non fatals*

Les événements cardiovasculaires non fatals ont été saisis à partir des dossiers médicaux, des comptes rendus d'hospitalisations et de décès, et/ou lors des entretiens annuels avec les patients au cours des 5 ans de suivi actif. Ces événements ont été évalués par un médecin selon les critères de *Cardiovascular and Stroke Endpoint Definition for Clinical Trials*⁶⁸. Tous les décès cardiovasculaires ont ensuite été évalués à l'aveugle par deux cardiologues.

Les hospitalisations et décès cardiovasculaires ont été enregistrés dans la base de données CKD-REIN grâce aux codages de la Classification internationale des maladies connue par CIM-10 (primocodage). Ensuite, chaque hospitalisation ou décès codés de cause cardiovasculaire a été expertisé à partir d'une procédure définie et des fiches de codage afin de valider ou non le primocodage.

Les événements cardiovasculaires fatals ou non fatals ont été étudiés en tant qu'événements composites de :

- Anévrisme de l'aorte
- Décès subit
- Ainsi qu'un composite des événements cardiovasculaires athéromateux et non-athéromateux pour lesquels la distinction entre eux a également été décidée par un comité à l'aveugle.

En raison de l'incertitude quant aux mécanismes sous-jacents à certains événements de mort cardiaque subite et quant à la spécificité de la classification des anévrismes de l'aorte, ces

événements n'ont été classés dans aucune des deux catégories spécifiques de MCV athéromateuses ou non-athéromateuses. Ils ont donc été inclus dans l'analyse globale des événements cardiovasculaires, mais non inclus dans l'analyse par sous-groupe selon le type athéromateux ou non.

Les MCV athéromateuses incluaient :

- Maladies coronaires (incluant IDM, intervention coronarienne (angioplastie coronaire ou intervention coronarienne percutanée, pontage coronarien, thrombolyse coronaire), angine instable)
- Maladie cérébrovasculaire ischémique (incluant AVC ischémique, accident ischémique transitoire, et interventions carotidiennes : thrombolyse, thrombectomy, endartériectomie, angioplastie avec pose de stent ou chirurgie de pontage coronarien)
- Maladies des artères périphériques (incluant artérite des membres inférieurs (claudication vasculaire et des interventions telles que l'angioplastie avec pose de stent, l'endartériectomie, le pontage ou l'amputation pour lésions ischémiques athéromateuses) et sténose des artères rénales).

Les MCV non-athéromateuses incluaient :

- AVC hémorragique
- Insuffisance cardiaque (définie par une nouvelle apparition ou une aggravation de l'insuffisance cardiaque)
- Fibrillation auriculaire
- Flutter et autres tachycardies atriales
- Trouble de la conduction
- Trouble du rythme ventriculaire.

Les arythmies et les troubles de la conduction ont été documentés par électrocardiographie.

Tous les événements considérés ont eu lieu avant défaillance rénale (telle qu'identifiée à partir des dossiers médicaux ou par lien avec le registre REIN).

Pour les analyses cardiovasculaires, une censure a été réalisée à la défaillance rénale, au décès non cardiovasculaires avant défaillance rénale, et à la date de fin de suivi actif de 5 ans.

3.3.4.2 Données sur la mortalité

La mortalité toute cause comprenait tout décès enregistré, qu'il soit cardiovasculaire ou non. Les décès ont été déclarés par des membres de la famille ou par des attachés de recherche clinique durant le suivi actif annuel de l'étude, constatés à partir des certificats de décès et des dossiers hospitaliers, ou grâce à un lien avec le registre national des décès.

Comme mentionné précédemment, la mortalité cardiovasculaire était évaluée par des cardiologues. Tous les autres décès ont été classés comme mortalité non cardiovasculaire.

3.3.5 Analyse statistique

3.3.5.1 Analyses statistiques descriptives

Les caractéristiques à l'inclusion sont décrites pour l'ensemble des patients inclus dans notre étude ($n = 2406$) et en fonction des tertiles de la kynurénine libre. La description en fonction des tertiles de la kynurénine totale est présentée dans **l'annexe 6**. Les variables continues sont présentées sous forme de médiane [Q1-Q3] et ont été comparées entre trois groupes par le test de Kruskal-Wallis. Les variables catégorielles sont présentées sous forme de pourcentages et ont été comparées entre les groupes par le test de khi-deux. Nous avons représenté la variation des concentrations sériques de chacune des kynurénine libre, totale et libre/totale, et de chacun des tryptophane libre et total, et du ratio kynurénine/tryptophane, respectivement en fonction des stades de la MRC. Le test Kruskal-Wallis a été utilisé afin de comparer les concentrations entre les groupes, suivi d'une analyse post-hoc effectuée par le test de Dunn.

3.3.5.2 Analyse de survie

Étant donné que la distribution des valeurs de la kynurénine libre et totale ne respecte pas une distribution Gaussienne, et que l'étendue de leurs valeurs est très large, les valeurs

ont été log normalisées dans l'ensemble des analyses.

Pour chacun des six événements d'intérêts de l'étude, nous avons utilisé des modèles de Cox cause-spécifique pour estimer les rapports de risque instantané (HR ; sigle anglais de Hazard Ratio) bruts et ajustés [IC à 95 %] associés à chacun des concentrations sériques de kynurénine libre et totale (les associations avec la kynurénine totale sont incluses dans **l'annexe 7-9,11,13 et 15**). Les différents événements évalués sont :

- 1) Survenue d'un premier événement cardiovasculaire fatal ou non, 2) d'un événement cardiovasculaire athéromateux, 3) d'un événement cardiovasculaire non-athéromateux :

Risques compétitifs : défaillance rénale* et mortalité non cardiovasculaire.

Censures appliquées :

- Date de la transplantation préemptive ou du démarrage de la dialyse
- Date de décès de cause non cardiovasculaire
- Date de dernières nouvelles (date de dernier suivi actif ou date de perte de vue).

- 4) Mortalité toute cause avant défaillance rénale:

Risques compétitifs : défaillance rénale *.

Censures appliquées :

- Date de la transplantation préemptive ou du démarrage de la dialyse*
- Date de dernières nouvelles (date de dernier suivi actif ou date de perte de vue).

- 5) Mortalité de cause non cardiovasculaire :

Risques compétitifs : défaillance rénale * et mortalité cardiovasculaire.

Censures appliquées :

- Date de la transplantation préemptive ou du démarrage de la dialyse*

- Date de décès de cause cardiovasculaire
- Date de dernières nouvelles (date de dernier suivi actif ou date de perte de vue).

6) Mortalité de cause cardiovasculaire :

Risques compétitifs : défaillance rénale * et mortalité non CV.

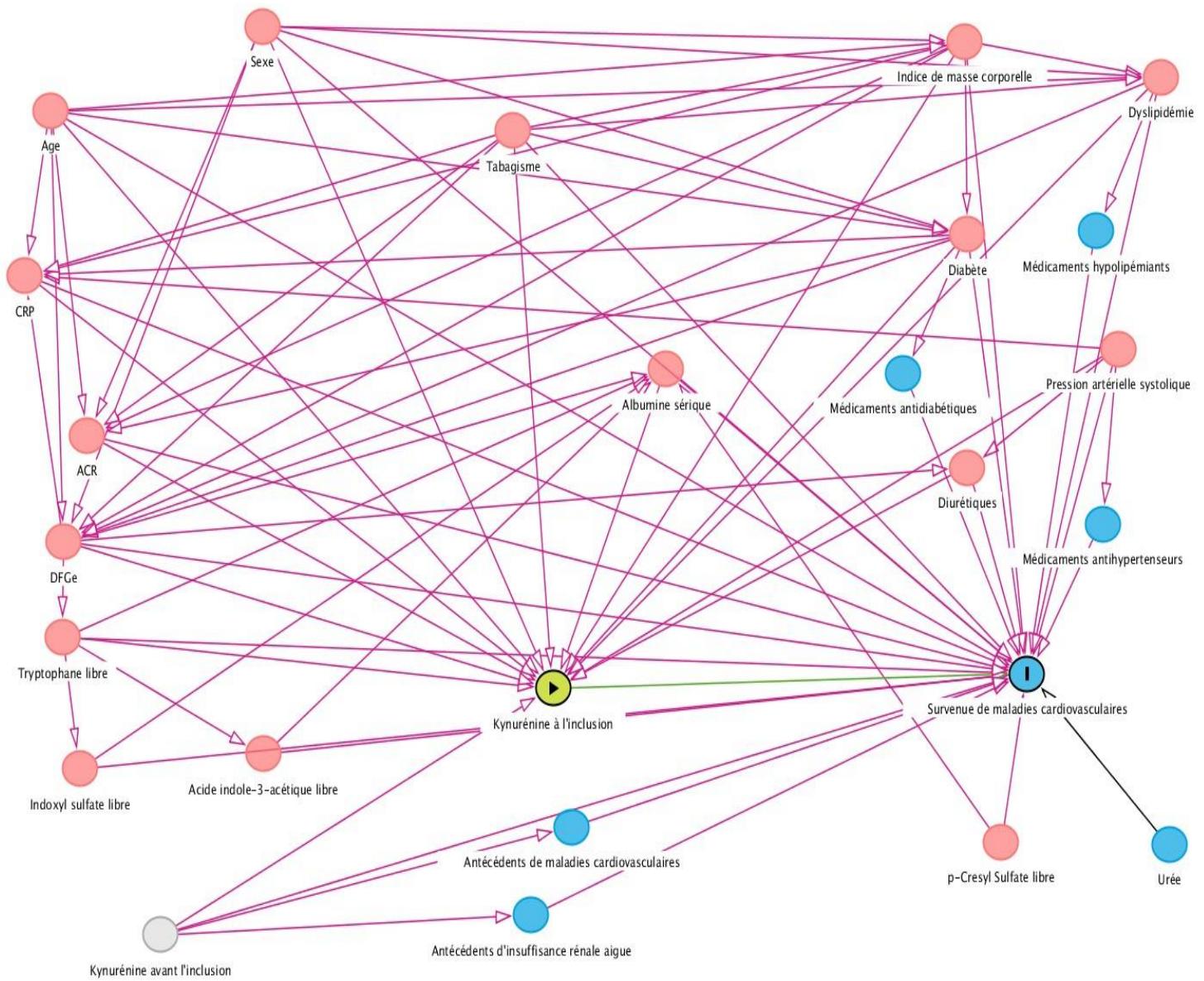
Censures appliquées :

- Date de la transplantation préemptive ou du démarrage de la dialyse*
- Date de décès de cause non cardiovasculaire
- Date de dernières nouvelles (date de dernier suivi actif ou date de perte de vue).

*A noter que la défaillance rénale n'est un risque compétitif que par design de notre étude qui requiert d'arrêter de suivre les patients au démarrage d'un traitement de suppléance (si dans le cadre de l'étude CKD-REIN, le suivi des patients n'avait pas été arrêté au démarrage d'un traitement de suppléance, nous aurions pu voir la survenue des évènements cardiovasculaires).

Les modèles de Cox ont été ajustés pour un ensemble de facteurs de confusion, qui ont été sélectionnés à partir d'un graphe acyclique dirigé (DAG; sigle anglais de directed acyclic graph), c'est-à-dire un diagramme des voies causales résumant les hypothèses à priori des relations causales entre les variables (**Figures 16 et 17**). Cette approche permet de sélectionner un ensemble optimal de facteurs d'ajustement (c'est-à-dire des facteurs associés à la fois à l'exposition et à l'évènement d'intérêt), évitant l'ajustement sur des facteurs non nécessaires, des médiateurs, ou des facteurs de collision ²⁹³. Les variables sélectionnées à partir du DAG sont celles associées à la fois à l'exposition (kynurénine) et à l'évènement d'intérêt, ou à l'évènement d'intérêt seulement. Ainsi, les analyses sur les associations entre la kynurénine sérique et les risques cardiovasculaires, les risques de mortalité toute cause, de mortalité cardiovasculaire et de mortalité non cardiovasculaire ont

été ajustées sur l'âge à l'inclusion, le sexe, la CRP, l'urée, le diabète, la dyslipidémie, la pression artérielle systolique, l'IMC, le statut tabagique, le DFGe à l'inclusion, l'ACR, le tryptophane sérique libre, l'IS, l'IAA et le PCS sériques libres, ainsi que les prescriptions de diurétiques, de médicaments antihypertenseurs, de médicaments hypolipémiants et de médicaments antidiabétiques. Nous ne pouvons pas ajuster sur l'histoire de MCV ni de l'insuffisance rénale aiguë, car ils seront considérés comme des facteurs de collision et ne peuvent donc pas être inclus dans le modèle afin d'éviter des résultats biaisés. Nous avons exclu la prescription de diurétiques des modèles d'ajustement évaluant l'association avec le risque cardiovasculaire athéromateux, car aucune étude antérieure n'a trouvé une association entre eux ; et nous avons exclu la dyslipidémie et les médicaments hypolipémiants des modèles évaluant l'association avec le risque cardiovasculaire non-athéromateux. Nous avons ajouté la concentration sérique d'albumine aux modèles lors de l'évaluation de la kynurénine sérique libre, étant donné que la kynurénine est une molécule liée aux protéines, et toute diminution de la concentration sérique d'albumine augmenterait la fraction libre de la kynurénine. Les IPPs ont été dans certaines études associés au risque de mortalité. Cependant, étant donné les sources limitées de littérature confirmant un lien de causalité entre les IPPs et la kynurénine, ainsi que la direction de l'association entre eux, une analyse de sensibilité a comparé les résultats entre un modèle ajusté incluant les IPP et un autre les excluant. Nous n'avons pas trouvé de différence de résultats entre ces deux modèles, donc les IPPs n'ont pas été considérés comme facteurs de confusion et n'ont pas été inclus dans les modèles ajustés lors de l'évaluation du risque de mortalité (**Annexes 10 à 15**).

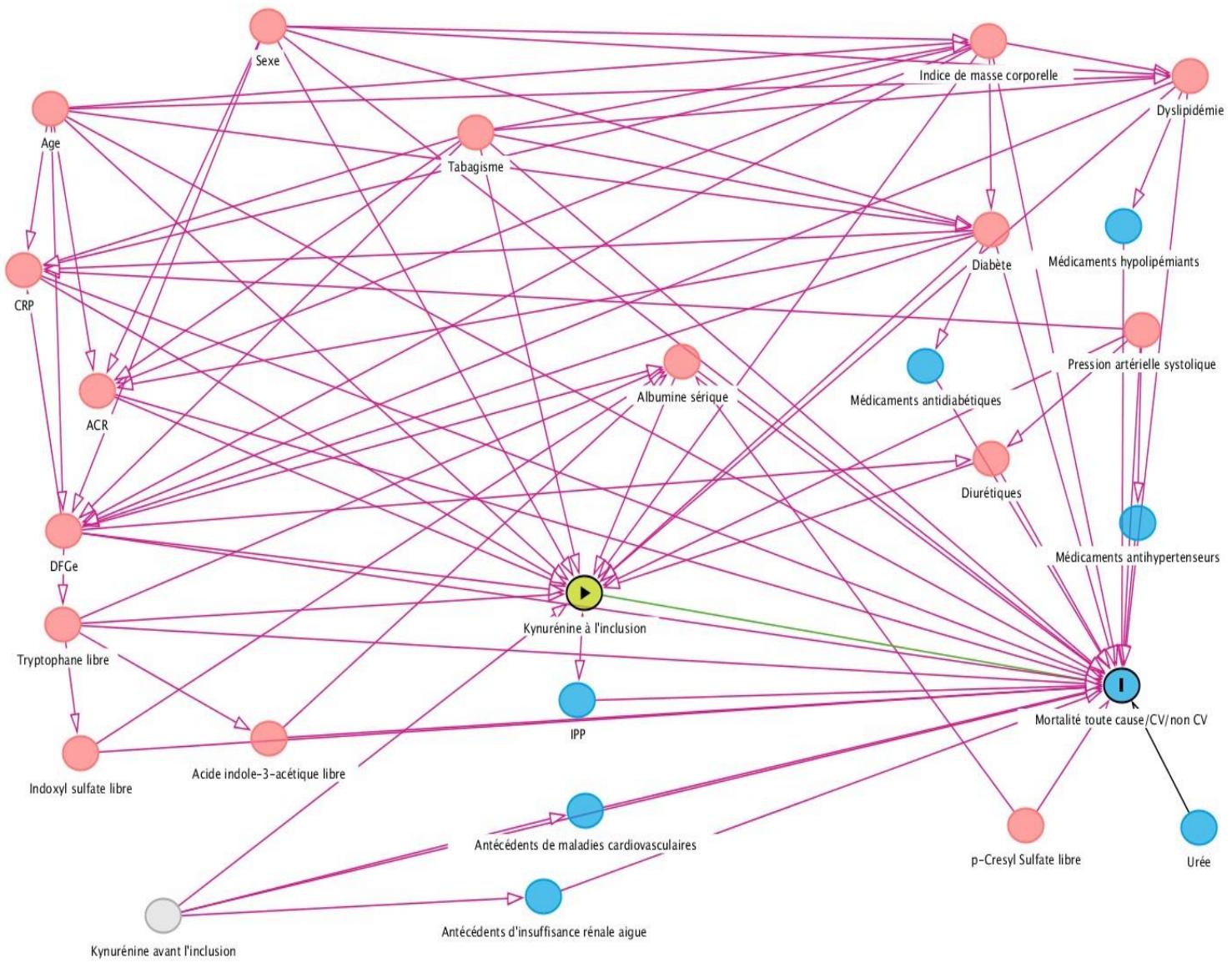


DFGe: débit de filtration glomérulaire estimé; ACR : ratio albuminurie/créatininurie ; CRP : protéine C-réactive.

Légende :

- ▶ Exposition
- Evénements d'intérêts
- Facteur de risque lié à l'exposition et à l'évènement d'intérêt
- Facteur de risque lié à l'évènement d'intérêt
- Variables non observée

Figure 16 : Graphe acyclique dirigé identifiant les facteurs d'ajustements minimaux suffisants pour estimer l'effet de la kynurénine sur les évènements cardiovasculaires, qu'ils soient athéromateux ou non, fatals ou non.



DFGe: débit de filtration glomérulaire estimé; ACR : ratio albuminurie/créatininurie ; CRP : protéine C-réactive ; IPP : inhibiteurs de pompe à protons ; CV : cardiovasculaire.

Légende :

- ▶ Exposition
- I Événements d'intérêts
- Facteur de risque lié à l'exposition et à l'événement d'intérêt
- Facteur de risque lié à l'événement d'intérêt
- Variables non observée

Figure 17 : Graphe acyclique dirigé identifiant les facteurs d'ajustements minimaux suffisants pour estimer l'effet de la kynurénine sur la mortalité toute cause/cardiovasculaire/non cardiovasculaire.

Pour tous les modèles de Cox, l'hypothèse des risques proportionnels a été évaluée en testant les résidus de Schoenfeld en fonction du temps.

Les HR obtenus des modèles de Cox ont été transformés en échelles non logarithmiques, afin d'obtenir des valeurs plus interprétables en terme clinique. Cette transformation est effectuée en appliquant la formule suivante : exponentielle ($\beta_0 + \beta_1 * \text{log}(y)$) (avec $y=2$ défini comme la valeur la plus plausible correspondant à la distribution de la kynurénine et donnant des résultats interprétables "l'effet d'un **doublement** de la kynurénine"). Cette transformation est effectuée pour rendre les résultats plus compréhensibles en ramenant les HR à une échelle plus intuitive et facilitant leur interprétation.

La structure des données manquantes était multivariée et arbitraire. Vu que les valeurs manquantes dépendent des données observées, nous avons conservé l'hypothèse d'un mécanisme de valeurs manquantes au hasard connue par MAR. Pour traiter les valeurs manquantes, une méthode d'imputation multiple avec des équations chaînées (MICE; Multivariate Imputation by Chained Equations) ²⁹⁴ a été réalisée (grâce à l'algorithme Fully Conditional Specification de Van Buuren) sous le logiciel R avec le package MICE ²⁹⁵. Étant donné le pourcentage de données manquantes, 20 bases de données ont été imputées. Toutes les covariables présentes dans les modèles de Cox ont été incluses dans le modèle d'imputation (la variable d'intérêt, les covariables du modèle, et la variable dépendante). Le temps de suivi de l'analyse de survie inclus dans le modèle d'imputation est le taux de risque cumulé (the cumulative hazard rate) créé selon l'estimateur Nelson-Aalen du package MICE sous R. Des modèles de Cox ajustés ont été générés pour chaque jeu de données imputé, et les coefficients de régression ont été poolés selon les règles de Rubin.

Un $p < 0,05$ était considérée comme statistiquement significative, présentée en gras dans les tableaux. Toutes les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel R, version 4.1.2 (R Foundation for Statistical Computing, Vienne, Autriche) ²⁹⁵.

3.4 RÉSULTATS

3.4.1 Caractéristiques des patients à l'inclusion

Les caractéristiques des 2406 patients inclus dans cette étude sont présentées dans le **tableau 5**, comparées entre les tertiles des concentrations de kynurénine libre. L'âge médian [Q1-Q3] des participants était de 68 ans [60-76], 66% étaient des hommes et l'IMC médian était de 27,9 [24,7-31,7] kg/m². Presque tous les patients souffraient d'HTA (96%), une grande proportion souffrait de dyslipidémie (74%), environ la moitié d'entre eux présentaient des antécédents de MCV (52%) et 41% de diabète. Le DFGe médian était de 24,7 [18,4-33,1] ml/min/1,73 m² et il était significativement plus bas chez les patients présentant les tertiles de kynurénine libre les plus élevés. Par rapport aux patients appartenant aux tertiles 1 et 2 de kynurénine libre, les patients du tertile 3 étaient plus âgés, présentaient plus de comorbidités, un IMC plus élevé et des concentrations sériques plus élevées de CRP et de tryptophane libre.

Tableau 5: Caractéristiques de la population étudiée selon les tertiles de la kynurénine sérique libre

Caractéristique	Total	Tertiles de kynurénine libre (mg/L)			P-valeur ²	Données imputées
	N = 2406 ¹	T1 <0,11 (n=802) ¹	T2 [0,11-0,16] (n=801) ¹	T3 >=0,16 (n=803) ¹		
Age à l'inclusion (années)	68 [60-76]	67 [58-74]	69 [60-76]	69 [62- 77]	<0,0001	0%
Homme	66%	68%	67%	63%	0,07	0%
DFGe à l'inclusion (ml/min/1,73m²)	24,7 [18,4-33,1]	31 [24-40]	25 [19-32]	20 [15-26]	<0,0001	0%

Rapport albumine ou protéine/créatinine (mg/g)	104 [21-491]	57 [14-345]	104 [23-440]	198 [34-721]	<0,0001	11,5%
Antécédents d'insuffisance rénale aiguë	23%	20%	24%	27%	0,005	7,2%
Statut de fumeur					0,3	0,6%
Jamais fumeur	40,5%	41%	40%	40%		
Fumeur actuel	12,5%	13%	13%	10%		
Ancien fumeur	47%	46%	46%	50%		
Hypertension artérielle	96%	95%	97%	98%	0,01	0,2%
Pression artérielle systolique (mmHg)	140 [128- 153]	138 [127-151]	140 [129- 152]	140 [130-155]	0,014	0,5%
Diabète	41%	35%	41%	47%	<0,0001	0,2%
Dyslipidémie	74%	70%	73%	77%	0,008	0,4%
Antécédents de maladies cardiovasculaires	52%	46%	51%	60%	<0,0001	0,5%
Bicarbonate sérique (mmol/L)	25 [23-27]	25,4 [23-27,4]	25 [22,4-27]	24,5 [22-27]	<0,0001	8,8%
Albuminémie (g/L)	40,4	41	41	40	<0,0001	14,5%

	[38-43]	[38,4-43,2]	[38-43]	[37- 42]		
Hémoglobine (g/dL)	13 [11,8-14,2]	13,4 [12,3- 14,5]	13 [11,9- 14,2]	12,6 [11,5- 13,7]	<0,0001	0,9%
CRP (mg/L)	2,4 [1,1-5,1]	2 [0,9-4,1]	2,3 [1,1-4,8]	2,9 [1,3-6,5]	<0,0001	5,4%
Indice de masse corporelle (kg/m²)	27,9 [24,7-31,7]	27,2 [24,3-30,8]	27,8 [24,5-31,6]	28,8 [25,4-32,8]	<0,0001	1,9%
Prescription d'IPP à l'inclusion	32%	30%	31%	36%	0,01	0,2%
Prescription de diurétique à l'inclusion	52%	43%	51%	63%	<0,0001	0,3%
Prescription de médicaments antihypertenseurs à l'inclusion	94%	91%	94%	96%	<0,0001	0,3%
Prescription de médicaments hypolipémiants à l'inclusion	63%	59%	64%	67%	0,005	0,3%
Prescription de	34%	29%	34%	39%	<0,001	0,3%

médicaments							
antidiabétiques	à						
l'inclusion							
Tryptophane libre (mg/L)		0,9 [0,7-1,2]	0,7 [0,6-0,9]	0,9 [0,8-1,1]	1,2 [0,9-1,5]	<0,0001	0%
Tryptophane total (mg/L)		12 [10-15]	12 [10-15]	12,6 [10-15]	12 [9,9-14,6]	0,1	0%
Kynurénine libre (mg/L)		0,1 [0,09-0,2]	0,07 [0,06-0,08]	0,12 [0,11-0,14]	0,2 [0,18-0,26]		0%
Kynurénine totale (mg/L)		1,2 [0,9-1,6]	0,9 [0,7-1,2]	1,2 [0,9-1,6]	1,4 [1,2-1,8]	<0,0001	0%

¹ Médiane [Q1-Q3]; %

² Test de Kruskal-Wallis; test de khi-deux

DFGe: débit de filtration glomérulaire estimé; CRP: protéine C-réactive; IPP: inhibiteurs de pompe à protons.

Les patients aux stades plus avancés de MRC présentaient des concentrations significativement plus élevées de kynurénine libre et totale (**Figure 18**) ainsi que du rapport kynurénine libre/totale (**Figure 19**). Les concentrations de tryptophane total étaient significativement plus faibles dans les stades plus avancés de MRC, tandis que celles du tryptophane libre étaient plus élevées (**Figure 20**). Le rapport kynurénine libre/triptophane libre était significativement plus élevé aux stades plus avancés de MRC qu'aux stades 2 et 3. De même, le rapport kynurénine totale/triptophane libre était significativement plus élevé au stade 4 par rapport aux stades 2 et 3 (**Figure 21**).

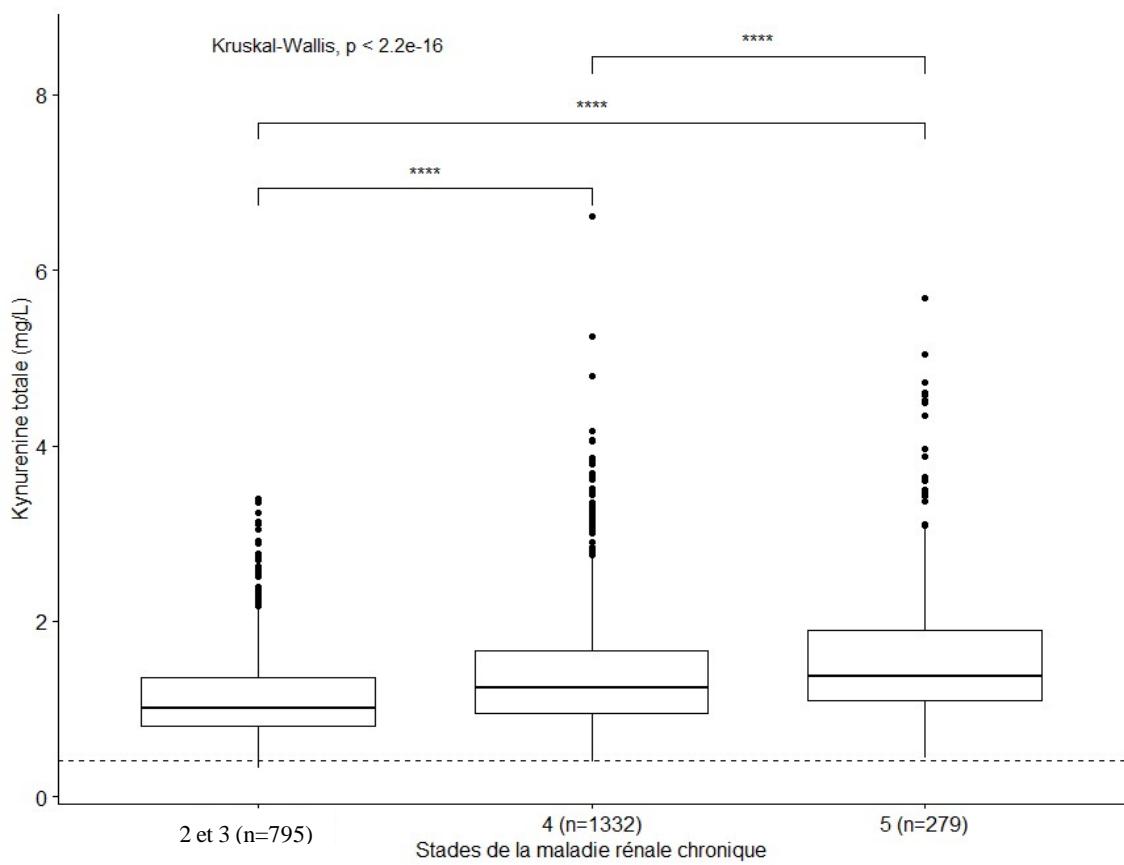
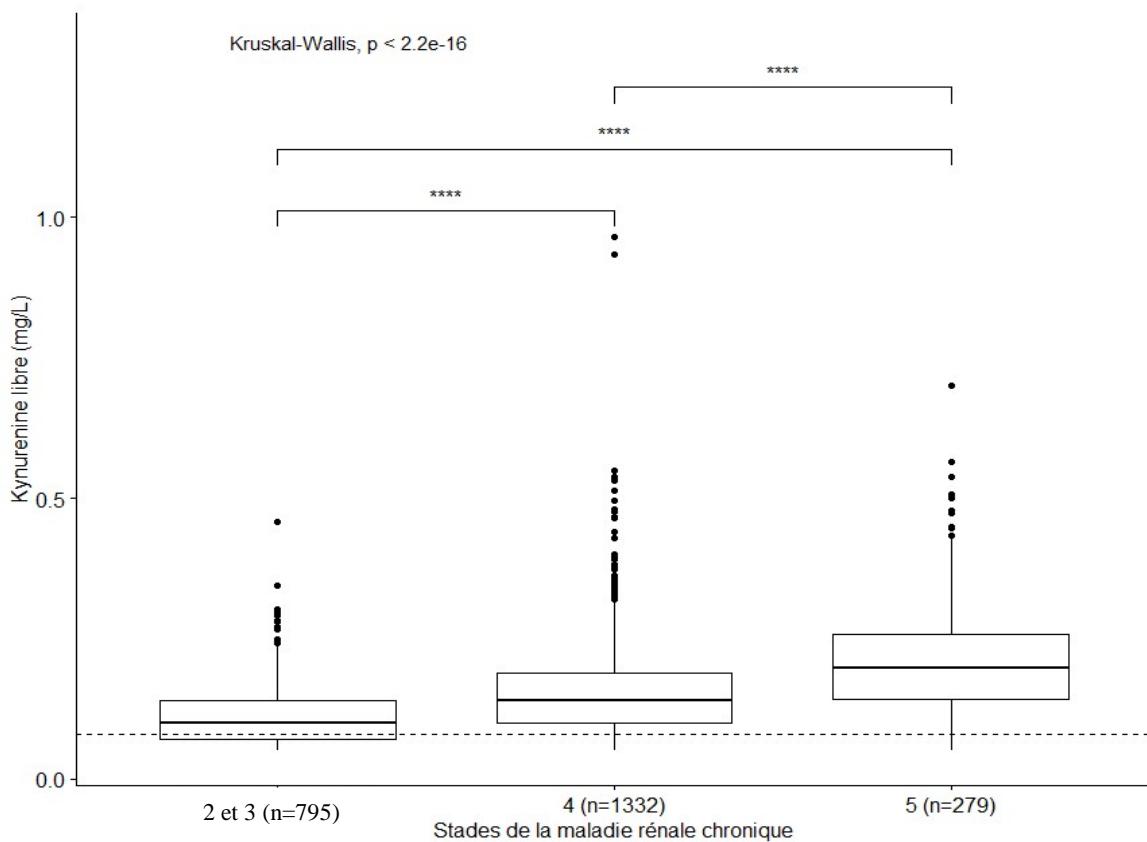


Figure 18 : Distribution de la kynurénine selon les stades de la maladie rénale chronique.

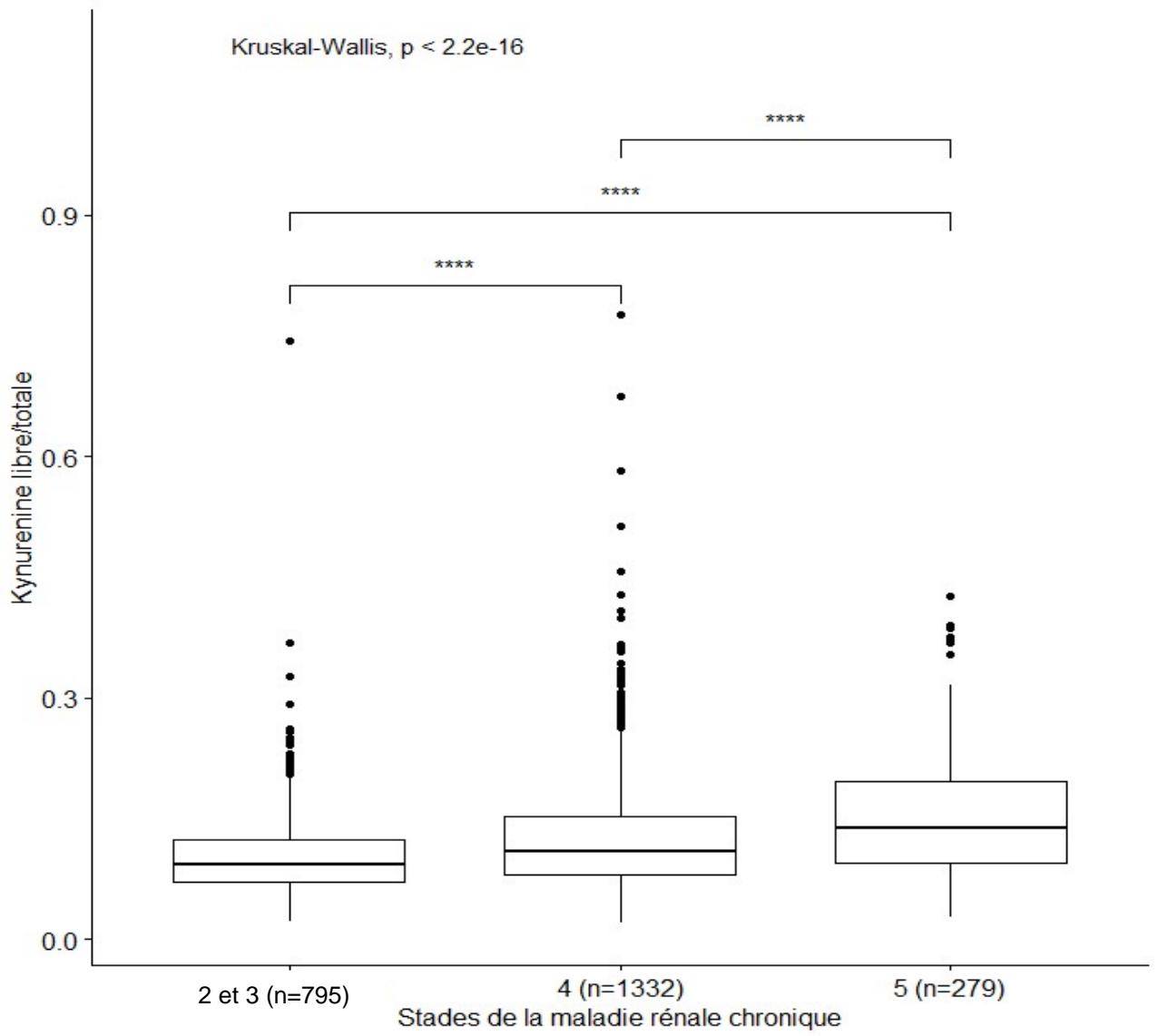


Figure 19 : Distribution du rapport kynurénine libre/totale selon les stades de la maladie rénale chronique.

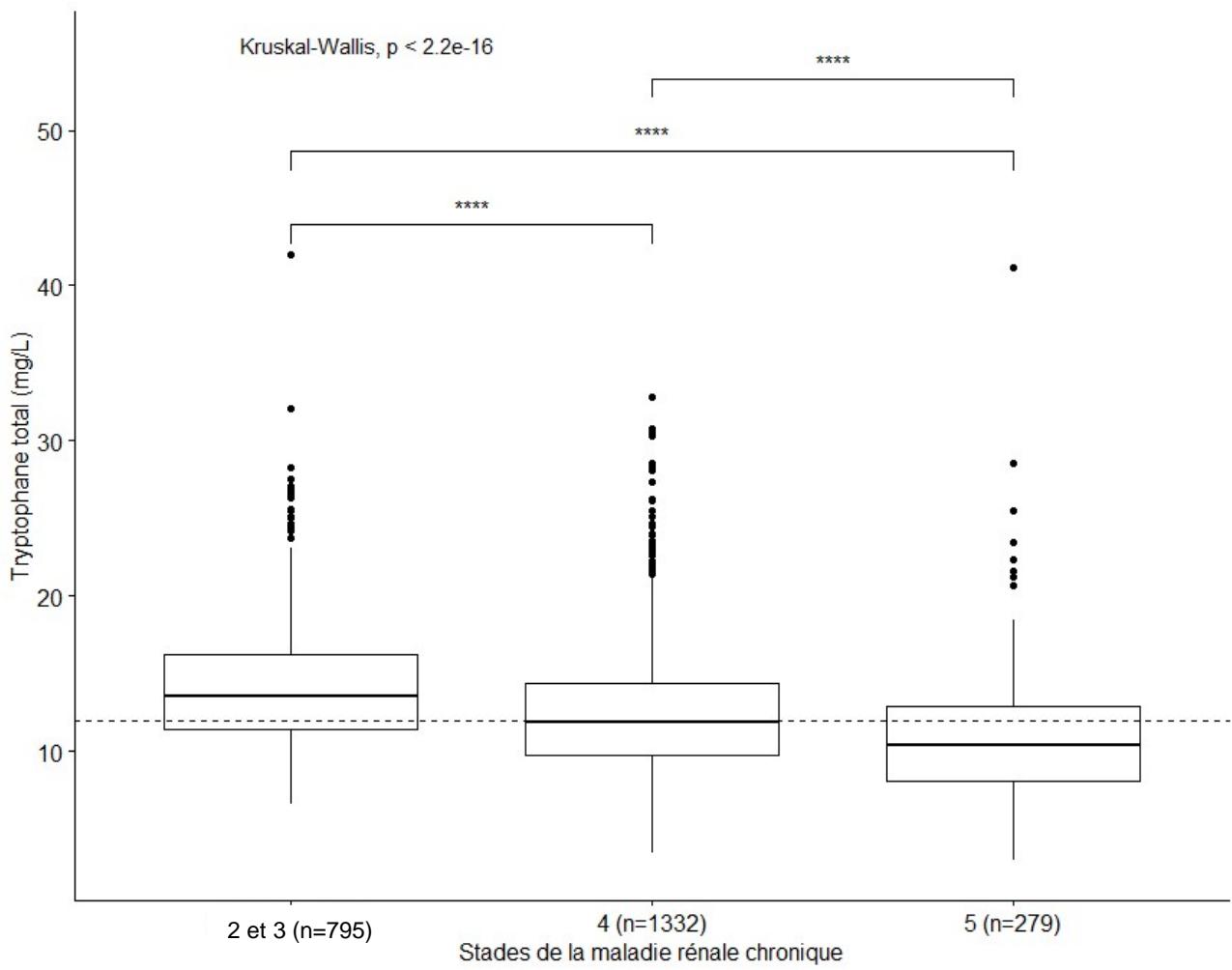
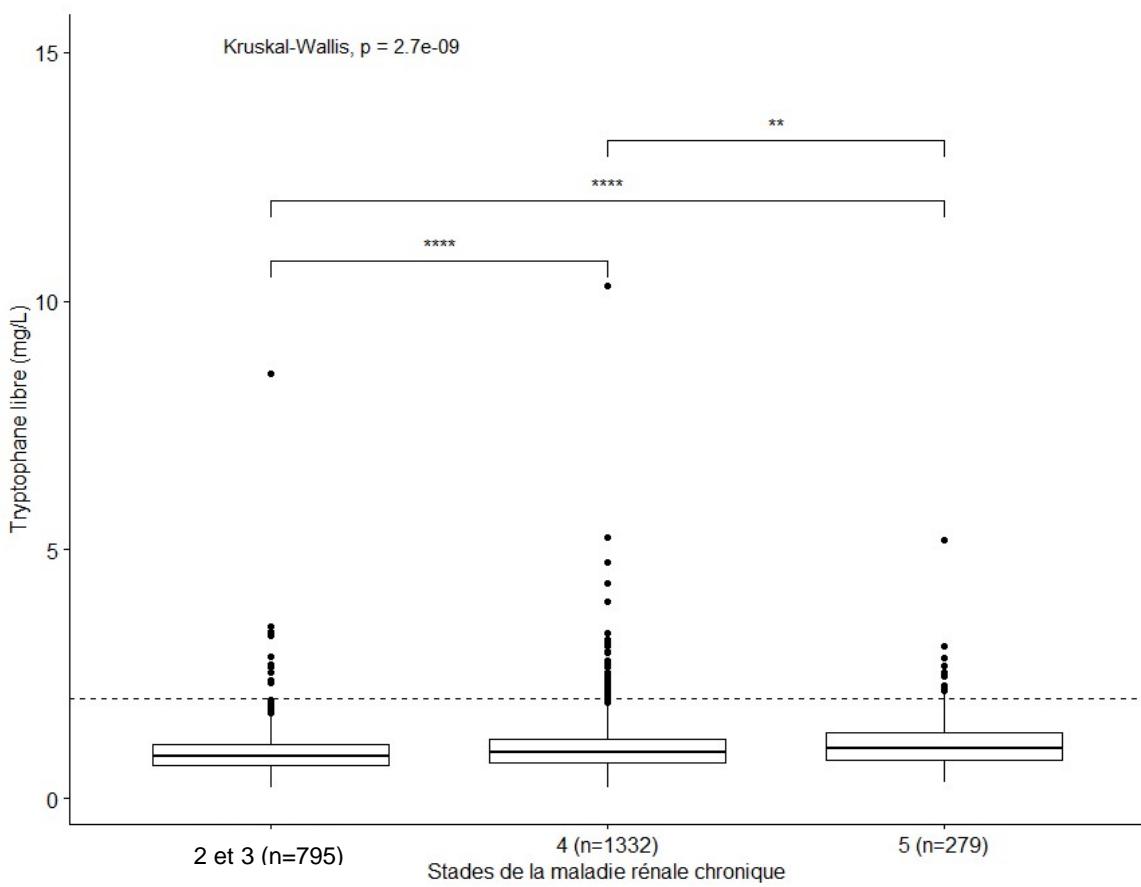


Figure 20 : Distribution du tryptophane selon les stades de la maladie rénale chronique.

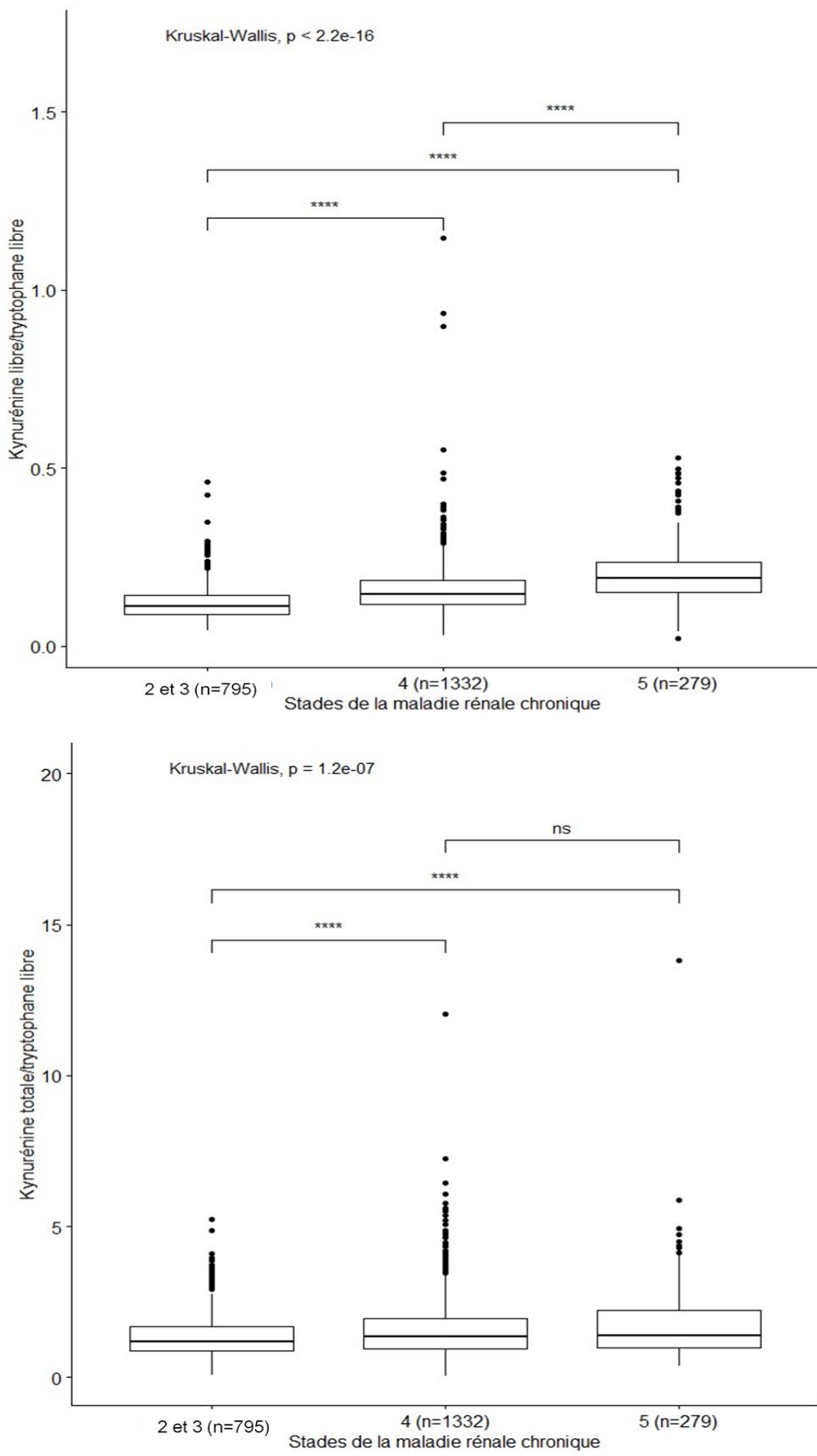
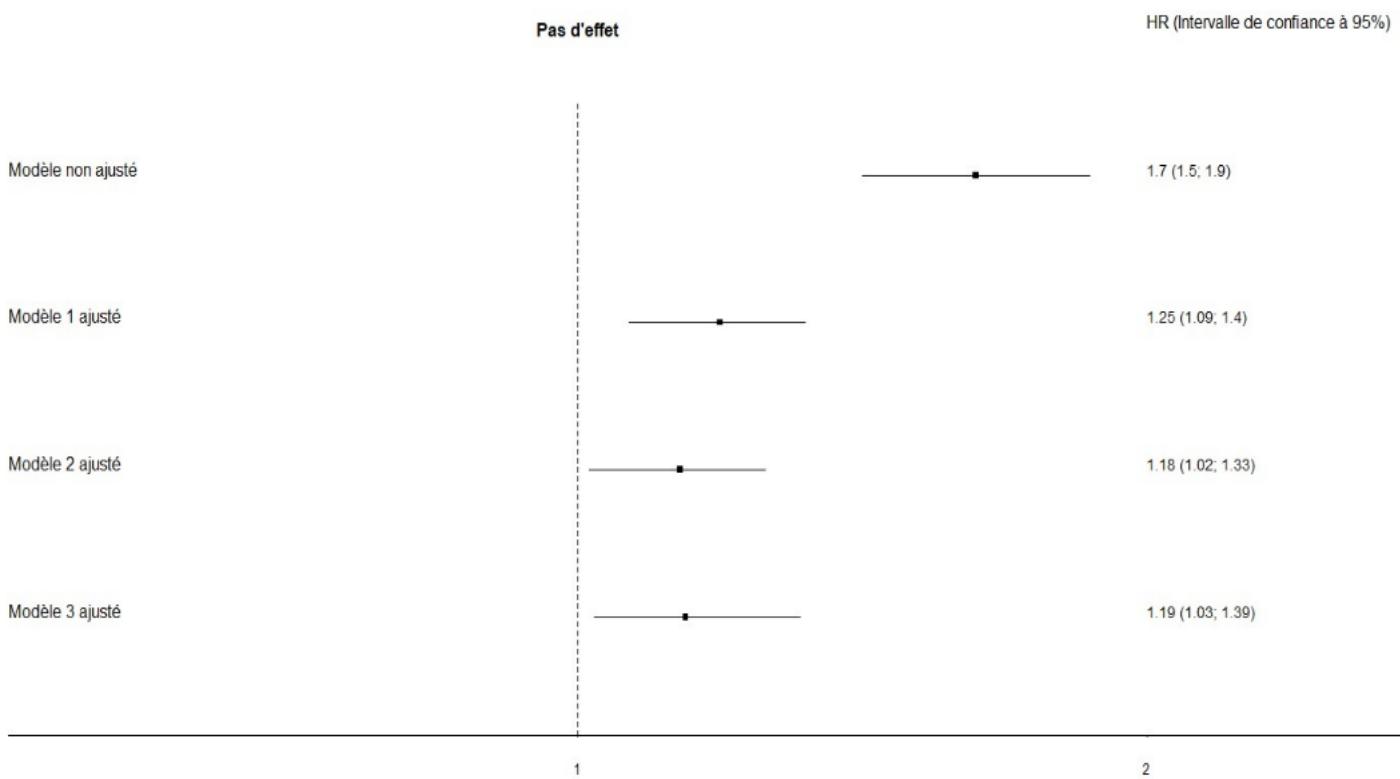


Figure 21 : Distribution du rapport kynurénine/tryptophane libre selon les stades de la maladie rénale chronique.

3.4.2 Evènements cardiovasculaires fatals ou non fatals

Durant une durée médiane de suivi [Q1-Q3] de 5 [4,6-5,2] ans, 466 des 2406 patients ont connu un premier évènement cardiovasculaire (fatal ou non fatal). L'analyse univariable a montré qu'un doublement des concentrations sériques de kynurénine libre était associé à une augmentation de 70 % du rapport de risque instantané d'évènement cardiovasculaire (HR[IC 95 %]: 1,7 [1,5-1,9], **Figure 22**). Cette association a été atténuée mais est restée significative après plusieurs ajustements statistiques (**Figure 22**) : un doublement des concentrations sériques de kynurénine libre était associé à une augmentation de 19 % du rapport de risque instantané d'évènements cardiovasculaires (HR ajusté [IC 95 %]: 1,19 [1,03-1,39]), indépendamment de la fonction rénale (DFGe), de la concentration sérique d'autres TUs, des médicaments cardioprotecteurs et des facteurs de risque cardiovasculaires traditionnels ; et à une augmentation de 18% du rapport de risque instantané d'évènements cardiovasculaires après ajustement pour le tryptophane libre à la place des autres TUs (HR ajusté [IC 95 %]: 1,18 [1,02-1,33]).



Modèle 1 ajusté sur l'âge à l'inclusion, le sexe, le statut tabagique, l'albumine sérique, l'urée, l'indice de masse corporelle, le diabète, la dyslipidémie, la protéine C réactive à haute sensibilité, la pression artérielle systolique, le rapport albumine ou protéine/créatinine, le débit de filtration glomérulaire estimé, la prescription : de diurétique, d'antihypertenseurs, d'hypolipémiants et d'antidiabétiques.

Modèle 2 = modèle 1 + tryptophane sérique libre.

Modèle 3 = modèle 1 + indoxyl sulfate, p-cresyl sulfate, et acide indole 3-acétique libres.

HR : Hazard ratio/ Rapport de risque.

*Les HR obtenus des modèles de Cox ont été transformés en échelles non logarithmiques en appliquant la formule exponentielle (β du modèle de Cox * $\log(y)$) (avec $y=2$).

Figure 22 : Hazard Ratio des évènements cardiovasculaires associé à un doublement des concentrations sériques de kynurénine libre (mg/L).

Les résultats étaient en ligne avec ceux de l'association avec les concentrations sériques de kynurénine totale : un doublement de ces dernières était associée à une augmentation de 20 % du rapport de risque instantané d'évènements cardiovasculaires, indépendamment du DFGe et de la concentration sérique de tryptophane libre ou des TUs dérivées du tryptophane (HR ajusté [IC 95 %]: 1,2 [1,05-1,4]) (**Annexe 7**).

3.4.3 Analyse par sous-groupes des événements athéromateux et non-athéromateux

3.4.3.1 *Evènements cardiovasculaires athéromateux*

Au cours du suivi, 215 patients ont présenté des événements cardiovasculaires athéromateux fatals ou non fatals. Nous n'avons trouvé aucune association significative entre les concentrations sériques de kynurénine libre et la survenue d'évènements cardiovasculaires athéromateux après ajustement sur les différents facteurs de confusion (**Tableau 6**). L'ajout de tryptophane libre au modèle ajusté n'a pas affecté ces résultats.

Cependant, les concentrations sériques de kynurénine totale étaient significativement associés aux évènements cardiovasculaires athéromateux même après les ajustements statistiques (**Annexe 8**).

Tableau 6: Hazard Ratio des évènements cardiovasculaires athéromateux associé à un doublement des concentrations sériques de kynurénine libre (mg/L).

	Kynurénine libre (mg/L)
Évènements cardiovasculaires athéromateux	
HR non ajusté [IC95%] – p-value	1,4* [1,17-1,69] – 0,0002
HR ajusté¹ [IC95%] – p-value	1,15* [0,9-1,4] – 0,2
HR ajusté² [IC95%] – p-value	1,15* [0,89-1,5] – 0,2
HR ajusté³ [IC95%] – p-value	1,08* [0,86-1,4] – 0,5

¹Modèle ajusté sur l'âge à l'inclusion, le sexe, le statut tabagique, l'albumine sérique, l'urée, l'indice de masse corporelle, le diabète, la dyslipidémie, la protéine C réactive à haute sensibilité, la pression artérielle systolique, le rapport albumine ou protéine/créatinine, le débit de filtration glomérulaire estimé, la prescription : d'antihypertenseurs, d'hypolipémiants et d'antidiabétiques.

²1+tryptophane sérique libre.

³1+indoxylo sulfate, p-cresyl sulfate, et acide indole 3-acétique libres.

IC : intervalle de confiance ; HR : Hazard ratio/ Rapport de risque.

*Les HR obtenus des modèles de Cox ont été transformés en échelles non logarithmiques en appliquant la formule exponentielle (bêta du modèle de Cox * log(y)) (avec y=2).

3.4.3.2 *Evènements cardiovasculaires non-athéromateux*

313 patients ont eu des évènements cardiovasculaires non-athéromateux fatals ou non fatals au cours de la période de suivi. Un doublement des concentrations sériques de kynurénine libre était significativement associée à une augmentation de 31 % du rapport de risque instantané d'évènements cardiovasculaires non-athéromateux après les ajustements multivariables, y compris les autres TUs (HR ajusté [IC 95 %]: 1,31 [1,09-1,6]); et de 26% en ajustant sur le tryptophane libre à la place des autres TUs (HR ajusté [IC 95 %]: 1,26 [1,03-1,5]) (**Tableau 7**).

Les résultats étaient similaires lors de l'évaluation de la kynurénine totale sérique, présentant une association significative avec la survenue d'évènements cardiovasculaires non-athéromateux (**Annexe 9**).

Tableau 7 : Hazard Ratio des évènements cardiovasculaires non-athéromateux associé à un doublement des concentrations sériques de kynurénine libre (mg/L).

	Kynurénine libre (mg/L)
Évènements cardiovasculaires non-athéromateux	
HR non ajusté [IC95%] – p-value	1,97* [1,7-2,27] -- <0,0001
HR ajusté¹ [IC95%] – p-value	1,36* [1,14-1,61] – 0,0007
HR ajusté² [IC95%] – p-value	1,26* [1,03-1,5] – 0,02
HR ajusté³ [IC95%] – p-value	1,31* [1,09-1,6] – 0,003

¹Modèle ajusté sur l'âge à l'inclusion, le sexe, le statut tabagique, l'albumine sérique, l'urée, l'indice de masse corporelle, le diabète, la protéine C réactive à haute sensibilité, la pression artérielle systolique, le rapport albumine ou protéine/créatinine, le débit de filtration glomérulaire estimé, la prescription : d'antihypertenseurs, de diurétiques et d'antidiabétiques.

²1+tryptophane sérique libre.

³1+indoxyl sulfate, p-cresyl sulfate libre, et acide indole 3-acétique libres.

IC : intervalle de confiance ; HR : Hazard ratio/ Rapport de risque.

*Les HR obtenus des modèles de Cox ont été transformés en échelles non logarithmiques en appliquant la formule

exponentielle (bêta du modèle de Cox * log(y)) (avec y=2).

3.4.4 Mortalité toute cause

311 patients sont décédés avant défaillance rénale au cours de la période de suivi de 5 ans. Un doublement des concentrations sériques de kynurénine libre était significativement associée à une augmentation de 22 % du risque de mortalité toutes causes confondues (HR ajusté [IC 95 %] : 1,22 [1,02-1,50] ; **Tableau 8**), indépendamment du DFGe. Cependant, l'association des concentrations sériques de kynurénine libre avec la mortalité toute cause s'est avérée dépendre du tryptophane libre ; nous n'avons pas pu trouver d'association significative après avoir ajouté le tryptophane libre ou les TUs dérivées du tryptophane au modèle d'ajustement (**Tableau 8**).

Tableau 8 : Hazard Ratio de la mortalité toute cause associé à un doublement des concentrations sériques de kynurénine libre (mg/L).

	Kynurénine libre (mg/L)
Mortalité toute cause	
HR non ajusté [IC95%] – p-value	1,7* [1,5-1,9] -- <0,0001
HR ajusté¹ [IC95%] – p-value	1,22* [1,02-1,5] – 0,03
HR ajusté² [IC95%] – p-value	1,12* [0,9-1,4] – 0,3
HR ajusté³ [IC95%] – p-value	1,18* [0,9-1,4] – 0,07

¹Modèle ajusté sur l'âge à l'inclusion, le sexe, le statut tabagique, l'albumine sérique, l'urée, l'indice de masse corporelle, le diabète, dyslipidémie, la protéine C réactive à haute sensibilité, la pression artérielle systolique, le rapport albumine ou protéine/créatinine, le débit de filtration glomérulaire estimé, la prescription : d'antihypertenseurs, de diurétiques, d'hypolipémiants et d'antidiabétiques.

²1+tryptophane sérique libre.

³1+indoxyl sulfate, p-cresyl sulfate libre, et acide indole 3-acétique libres.

IC : intervalle de confiance ; HR : Hazard ratio/ Rapport de risque.

*Les HR obtenus des modèles de Cox ont été transformés en échelles non logarithmiques en appliquant la formule exponentielle (bêta du modèle de Cox * log(y)) (avec y=2).

Dans les analyses multivariables, il n'y avait aucune association significative avec les concentrations sériques de kynurénine totale dans le risque de mortalité toutes causes confondues avant défaillance rénale. Le HR ajusté pour la mortalité toute cause était de 1,04 [0,90-1,30] (**Annexe 11**).

3.4.5 Analyse par sous-groupes de mortalité cardiovasculaire et non cardiovasculaire

Au cours du suivi de 5 ans, nous avons observé 215 décès non cardiovasculaires et 87 décès cardiovasculaires avant défaillance rénale.

3.4.5.1 Mortalité non cardiovasculaire

Aucune association significative n'a été montré entre la kynurénine sérique libre et le risque de mortalité non cardiovasculaire avant défaillance rénale après ajustement sur le DFGe, le tryptophane sérique libre et d'autres facteurs de risque de mortalité (**Tableau 9**).

Les résultats étaient comparables lors de l'évaluation de l'association avec les concentrations sériques de kynurénine totale (**Annexe 13**).

Tableau 9 : Hazard Ratio de la mortalité non cardiovasculaire associé à un doublement des concentrations sériques de kynurénine libre (mg/L).

	Kynurénine libre (mg/L)
Mortalité non cardiovasculaire	
HR non ajusté [IC95%] – p-value	1,5* [1,3-1,8] – <0,0001
HR ajusté¹ [IC95%] – p-value	1,1* [0,9-1,4] – 0,3
HR ajusté² [IC95%] – p-value	1,03* [0,8-1,32] – 0,8
HR ajusté³ [IC95%] – p-value	1,1* [0,9-1,4] – 0,3

¹Modèle ajusté sur l'âge à l'inclusion, le sexe, le statut tabagique, l'albumine sérique, l'urée, l'indice de masse corporelle, le diabète, dyslipidémie, la protéine C réactive à haute sensibilité, la pression artérielle systolique, le rapport albumine ou protéine/créatinine, le débit de filtration glomérulaire estimé, la prescription : d'antihypertenseurs, de diurétiques, d'hypolipémiants et d'antidiabétiques.

²1+tryptophane sérique libre.

³1+indoxyl sulfate, p-cresyl sulfate libre, et acide indole 3-acétique libres.

IC : intervalle de confiance ; HR : Hazard ratio/ Rapport de risque.

*Les HR obtenus des modèles de Cox ont été transformés en échelles non logarithmiques en appliquant la formule exponentielle (bêta du modèle de Cox * log(y)) (avec y=2).

3.4.5.2 Mortalité cardiovasculaire

Les concentrations sériques de kynurénine libre étaient associés de manière significative à la survenue de mortalité cardiovasculaire, même après ajustement sur le DFGe, le tryptophane libre sérique et d'autres facteurs de confusion. Un doublement des concentrations sériques de kynurénine libre était associé à une augmentation de 64 % du rapport de risque instantané de mortalité cardiovasculaire (HR ajusté [IC 95 %] : 1,64 [1,10-2,40] , **Tableau 10**).

Il n'existait pas d'association significative entre les concentrations sériques de kynurénine totale et la mortalité cardiovasculaire dans les analyses multivariables (**Annexe 15**).

Tableau 10 : Hazard Ratio de la mortalité cardiovasculaire associé à un doublement des concentrations sériques de kynurénine libre (mg/L).

	Kynurénine libre (mg/L)
Mortalité cardiovasculaire	
HR non ajusté [IC95%] – p-value	2,3* [1,7-3,03] – <0,0001
HR ajusté¹ [IC95%] – p-value	1,8* [1,3-2,5] – 0,0001
HR ajusté² [IC95%] – p-value	1,66* [1,1-2,5] – 0,01
HR ajusté³ [IC95%] – p-value	1,64* [1,1-2,4] – 0,007

¹Modèle ajusté sur l'âge à l'inclusion, le sexe, le statut tabagique, l'albumine sérique, l'urée, l'indice de masse corporelle, le diabète, dyslipidémie, la protéine C réactive à haute sensibilité, la pression artérielle systolique, le rapport albumine ou protéine/créatinine, le débit de filtration glomérulaire estimé, la prescription : d'antihypertenseurs, de diurétiques, d'hypolipémiants et d'antidiabétiques.

²1+tryptophane sérique libre.

³1+indoxyl sulfate, p-cresyl sulfate libre, et acide indole 3-acétique libres.

IC : intervalle de confiance ; HR : Hazard ratio/ Rapport de risque.

*Les HR obtenus des modèles de Cox ont été transformés en échelles non logarithmiques en appliquant la formule exponentielle (β du modèle de Cox * log(y)) (avec y=2).

3.5 DISCUSSION

Dans une large cohorte nationale de patients atteints de MRC avant défaillance rénale, nous avons pu montrer pour la première fois que des concentrations sériques plus élevées de la kynurénine libre étaient associées à une incidence plus élevée de MCV qu'elles soient fatales ou non fatales; avec une association particulièrement significative avec les MCV non-athéromateuses, indépendamment de la fonction rénale, des concentrations sériques de tryptophane libre et des facteurs de risque cardiovasculaires traditionnels. En ce qui concerne la mortalité, nous avons observé que des concentrations sériques plus élevées de la fraction libre de la kynurénine étaient significativement associées à un risque de mortalité cardiovasculaire plus élevé, mais non pas à un risque de mortalité non cardiovasculaire ou de mortalité toute cause.

Comme précédemment exposé dans l'introduction, la kynurénine sérique s'accumule parallèlement à la dégradation de la fonction rénale du fait de l'augmentation de la production de cette molécule, et de la diminution de son élimination. Nous avons pu observer ceci dans nos résultats, qui ont montré que le rapport kynurénine/tryptophane était significativement plus élevé aux stades plus avancés de la MRC par rapport aux stades 2 et 3 (**Figure 21**) (donc nous pouvons supposer l'augmentation de la production de kynurénine à partir du tryptophane). Nos résultats ont montré aussi que les patients aux stades plus avancés de MRC présentaient des concentrations significativement plus élevées de kynurénine libre et totale (**Figure 18**) (donc nous pouvons supposer la diminution de leur élimination). Comme mentionné précédemment, la kynurénine est une molécule liée aux protéines. Nous pouvons noter aussi à partir de nos résultats que le rapport kynurénine libre/totale augmentait avec le stade avancé de la MRC (**Figure 19**). Étant donné que la kynurénine est fortement liée à l'albumine, cette augmentation de la fraction libre pourrait s'expliquer par la baisse des concentrations d'albumine sérique avec un stade de MRC plus avancé²⁹⁶ et par la compétition de la kynurénine avec d'autres TUs liées aux protéines

(comme l'IS et l'IAA) dont les concentrations augmentent également avec le déclin de la fonction rénale²⁹⁷.

En ce qui concerne les mécanismes impliqués pouvant expliquer l'association entre kynurénine et risque cardiovasculaire, des études expérimentales ont montré que les actions de la kynurénine sont principalement médiées par l'activation directe de l'AhR^{97,102,103}. Ce récepteur interagit avec diverses protéines régulatrices et protéines de signalisation, telles que le facteur nucléaire kappa B, impliquées dans la prolifération cellulaire et les réponses immunitaires⁹⁷. L'activité de l'AhR peut être modulée par divers agents, y compris des ligands endogènes tels que les métabolites du tryptophane : l'IS, l'IAA, le KA et la kynurénine. Ces molécules peuvent induire une inflammation vasculaire, une cardiotoxicité et un état prothrombotique des cellules vasculaires, comme démontré à la fois chez les souris et chez l'Homme^{97,101,103,298}. Kolachalama et al.²²⁰ ont montré que la kynurénine favorisait la thrombose après une lésion vasculaire chez la souris en augmentant l'expression du facteur tissulaire dans la paroi vasculaire via l'activation de l'AhR. Arinze et al. ont conclu pour une association entre la kynurénine et la maladie artérielle périphérique. Ils ont rapporté que la kynurénine renforçait l'activité de l'AhR dans les CE, conduisant à une angiogenèse altérée^{101,102}. Massy et al. ont suggéré que l'activation de l'AhR par la kynurénine pourrait également induire la thrombose et, par conséquent, participer à la genèse de la maladie artérielle périphérique¹⁰¹.

Des études antérieures portant sur de petites cohortes ont examiné l'effet de la kynurénine totale sur le risque cardiovasculaire, principalement chez des patients dialysés, sans toutefois tenir compte de la fraction libre et active de la kynurénine^{102,228,278}. Par conséquent, elles ont probablement sous-estimé l'impact réel de la kynurénine. Les concentrations de kynurénine totale ont également été associées à des marqueurs de dysfonctionnement des CE, d'inflammation et de stress oxydatif. Le rapport kynurénine/tryptophane était lié à des anomalies du facteur tissulaire, contribuant à un risque élevé de complications thrombotiques et d'athérosclérose chez les patients atteints de MRC sous traitement conservateur^{244,275–280,299}. Toutes ces études ont bien été présentées et expliquées dans la revue de littérature du chapitre précédent 2.3.2.3. Nos résultats ont

confirmé ces observations précédentes avec la fraction totale et étendue l'analyse à la fraction libre. De plus, nous avons inclus un échantillon important et représentatif de patients atteints de MRC, mais avant défaillance rénale. Et nous avons ajusté les résultats en tenant compte du DFG (représentant la fonction rénale), des concentrations sériques de tryptophane libre et d'autres TUs montrées comme étant associées avec les MCV.

Une cohorte récente de 184 patients atteints de MRC a démontré une association significative entre les concentrations de tryptophane et les MCV incidentes²²⁸. Comme expliqué précédemment (dans l'introduction partie 1.2.3.1), l'acide aminé **tryptophane** est le précurseur de plusieurs métabolites et TUs, notamment la kynurénine, l'IS et l'IAA, dérivées de différentes voies métaboliques. Nous pouvons observer ceci dans nos résultats (**Figure 20**), en montrant que les concentrations de tryptophane total étaient significativement plus faibles dans les stades plus avancés de MRC. Nous pouvons supposer que le tryptophane s'est métabolisé au niveau intestinal en d'autres métabolites avant d'être absorbé et continue même à être métabolisé en kynurénine après absorption, et que cette transformation augmente plus le DFG diminue potentiellement à cause de l'aggravation de la dysbiose intestinale et l'augmentation de l'activation de l'IDO^{97,300}. Comme expliqué pour la kynurénine libre au début de la partie **Discussion**, nous avons observé que les concentrations du tryptophane libre étaient aussi plus élevées dans les stades plus avancés de la MRC (**Figure 20**) pour les mêmes raisons. Le tryptophane lié aux protéines diminue nettement chez les patients hypoalbuminémiques ou chez ceux ayant des concentrations élevées en TUs liées aux protéines (en entrant en compétition avec elles)²⁹⁷. Ainsi, plus le DFG diminue, plus la fraction libre du tryptophane augmentera³⁰⁰. Il est bien connu que les métabolites du tryptophane jouent un rôle clé dans les MCV, notamment l'IM, l'athérosclérose, les événements coronariens majeurs et les AVC ischémiques, dans la population générale et chez les patients présentant des anomalies cardiaques (angor stable, suspicion de maladie coronarienne stable, insuffisance cardiaque, post-arrêt cardiaque)³⁰¹. Cela a également été démontré chez les patients atteints de MRC. D'où la nécessité et l'importance d'inclure pour la première fois le tryptophane sérique libre dans les modèles d'ajustement de notre analyse afin d'isoler la véritable association de la kynurénine sérique

libre sur les MCV chez les patients atteints de MRC en pré dialyse, au-delà des effets du tryptophane.

Comme présenté dans cette thèse, les MCV peuvent être classées en MCV athéromateuses ou non-athéromateuses, toutes les deux fréquemment observées chez les patients atteints de MRC, avec une prévalence plus élevée d'évènements non-athéromateux^{36,59}. Notre étude a montré une association significative entre la kynurénine et les MCV non-athéromateuses. Cette association pourrait s'expliquer en partie par un effet inhibiteur de la kynurénine sur l'activité des CE essentielle à l'angiogenèse¹⁰¹. Les raisons expliquant l'association indépendante de la kynurénine libre avec des évènements cardiovasculaires non-athéromateux, mais pas avec ceux athéromateux, restent à explorer. Les explications possibles sont un manque de puissance dû à relativement peu d'évènements cardiovasculaires athéromateux observés dans notre étude et/ou à des mécanismes d'action spécifiques.

Étant donné que la kynurénine induit une inflammation et un stress oxydatif, nous pourrions raisonnablement supposer qu'elle a possiblement un impact sur la mortalité toute cause. Cependant, ce n'était pas le cas dans notre cohorte. Comparé à la littérature, une seule étude observationnelle avait évalué cette interaction possible et aussi n'avait pas réussi à trouver d'association significative entre la kynurénine et la mortalité chez des patients ayant bénéficié d'une transplantation rénale²⁸⁸. Aucune étude n'a examiné une telle association chez les patients non transplantés atteints de MRC. Toutefois, nos résultats ont prouvé un effet isolé et significatif de la kynurénine libre sur la mortalité cardiovasculaire ; sans prouver d'association significative avec la mortalité non cardiovasculaire qui constituait la principale cause de décès dans notre étude (215 décès non cardiovasculaires contre 87 décès cardiovasculaires). L'absence d'association avec la mortalité toute cause pourrait donc être expliquée par un manque de puissance. En plus, les résultats de notre analyse ont montré que les concentrations sériques de tryptophane libre semblaient expliquer l'association entre les concentrations sériques de kynurénine libre et la mortalité toute cause (nous n'avons plus observé d'association significative entre ces deux derniers après ajout du tryptophane libre au modèle d'ajustement). Nous n'avons donc pas prouvé un effet propre de la

kynurénine, mais une association qui semble être dépendante du tryptophane et de ses autres métabolites. La cohorte de Barreto et al. a montré que les concentrations sériques plus élevées d'IS étaient associées à une mortalité plus élevée chez les patients atteints de MRC, même après plusieurs ajustements multiples²⁶³. Indépendamment de l'âge, du sexe et de la fonction rénale, Post et al. ont conclu qu'une concentration plasmatique élevée de tryptophane était significativement associée à un risque de mortalité plus faible chez les patients hémodialysés³⁰². En résumé, nos résultats mettent en évidence le rôle critique de la toxicité urémique induite par la kynurénine dans la genèse des complications cardiovasculaires fatales ou non.

Notre étude a couvert des points forts importants. Premièrement, et à nos connaissances, la présente cohorte est la première à évaluer l'association entre les concentrations sériques de la fraction **libre** de la kynurénine et : les MCV d'une part et la mortalité toute cause d'autre part, chez les patients atteints de MRC avant défaillance rénale. L'approche stratifiée des MCV (selon les mécanismes athéromateux et non-athéromateux) et de la mortalité cardiovasculaire vs non cardiovasculaire constitue une première étape importante pour la compréhension de l'effet de la kynurénine sérique libre sur les complications cardiovasculaires liées à la MRC.

Deuxièmement, cette étude a inclus un large échantillon de personnes représentatives des pratiques de néphrologie et de la population de patients atteints de MRC au niveau national Français. Cela a permis d'obtenir une puissance statistique suffisamment élevée et d'effectuer des ajustements étendus pour les facteurs de confusion (y compris le DFGe) afin d'isoler l'effet de la kynurénine. Il s'agit de la première étude à avoir inclus le tryptophane sérique libre dans les modèles d'ajustement, qui a été montré à être associé avec le risque cardiovasculaire chez les patients atteints de MRC et qui est le précurseur de nombreuses autres TUs dont leur effet cardiovasculaire a été également prouvé par plusieurs études précédentes. En plus, nous avons ajusté sur les concentrations sériques libres de l'IS, et de l'IAA qui sont aussi dérivées du tryptophane, ainsi que sur les concentrations sériques libres du PCS dont son lien avec le risque cardiovasculaire a bien été mis en évidence chez les patients atteints de MRC.

Troisièmement, les quantifications des TUs ont été centralisées dans un même laboratoire, et ont été effectuées en utilisant la technique robuste et validée de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem à ultra haute performance. Quatrièmement, une évaluation précise des événements cardiovasculaires a été réalisée à l'aide de définitions standardisées⁶⁸ avec deux cardiologues évaluant les décès cardiovasculaires.

Enfin, l'analyse statistique de nos données a pris en compte les événements à risque compétitif pour chaque événement d'intérêt évalué.

Cependant, la présente étude présente également certaines limites à prendre en compte. Tout d'abord, nous n'avons pas étudié l'effet temps-dépendant des concentrations sériques de kynurénine libre sur chacun des événements d'intérêts étudiés. En plus, nous ne pouvons pas exclure la possibilité d'un biais de confusion résiduelle. Nous n'avons inclus les facteurs diététiques dans aucun modèle d'ajustement : l'apport en protéines, en fibres et en biotiques (pré- et probiotiques) n'était pas disponible dans les données récoltées dans cette cohorte. Ces facteurs pourraient avoir une influence sur les concentrations sériques de la kynurénine puisque cette TU est dérivée du métabolisme intestinal d'un acide aminé. Cependant, l'importance du régime alimentaire sur les concentrations sériques de kynurénine n'est toujours pas déterminée et validée dans la littérature et ses effets sont peut-être limités.

Enfin, notre étude sert en tant qu'évaluation étiologique, visant principalement à améliorer notre compréhension de l'association entre la kynurénine sérique libre et les MCV, plutôt que de réaliser des analyses prédictives. Cependant, nous n'avons ni exploré le potentiel de la kynurénine en tant que biomarqueur prédictif du risque cardiovasculaire, ni comparé la valeur prédictive des autres TUs connues pour être associés aux MCV. Cela nécessiterait une analyse distincte utilisant des méthodologies d'analyse prédictive et une validation externe. Il est important de noter que la MRC est une condition complexe ayant divers facteurs contribuant aux MCV. La kynurénine ne constitue qu'une pièce du puzzle.

En conclusion, notre large étude prospective a montré que des concentrations sériques élevées de kynurénine libre étaient associées à un risque accru de survenue d'événements

cardiovasculaires mortels ou non, en particulier les événements cardiovasculaires non-athéromateux, chez les patients atteints de MRC avant défaillance rénale. Cette association était indépendante de la fonction rénale, des concentrations sériques libres du tryptophane, de l'IS, du PCS et de l'IAA. En explorant cette association, nous avons cherché à contribuer aux connaissances existantes et à mettre en évidence le rôle potentiel de la kynurénine dans le développement et la progression des MCV. De futures recherches devraient considérer des méthodologies d'analyse prédictive pour explorer davantage le potentiel des TUs, y compris la kynurénine, en tant que biomarqueurs prédictifs du risque cardiovasculaire. De telles analyses pourraient fournir des informations importantes sur les capacités prédictives des TUs quant aux événements cliniques observés durant la MRC. De plus, des études expérimentales sont nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les complications cardiovasculaires liées à la MRC et les interventions thérapeutiques potentielles ciblant la kynurénine.

4 CHAPITRE 4: INHIBITEURS DE POMPE A PROTONS ET TOXINES UREMIQUES

4.1 RESUME

Contexte : L'utilisation d'IPP est courante chez les patients atteints de MRC. Les IPP et de nombreuses TUs sont éliminés par le système de transport d'anions organiques tubulaires du rein. Dans une étude transversale, nous avons cherché à évaluer l'association entre la prescription d'IPP et les concentrations sériques de diverses TUs.

Méthodes : Nous avons étudié des participants sélectionnés au hasard de la cohorte CKD-REIN, ayant des échantillons disponibles de TUs congelées collectés à l'inclusion. La prescription d'IPP a été enregistrée à l'inclusion. Les concentrations sériques de 10 TUs ont été mesurées à l'aide de la technique validée de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Une régression linéaire multiple a été réalisée, avec les concentrations de TUs log-normalisées comme variable dépendante.

Résultats : Parmi les 680 patients inclus (âge médian : 68 ans ; DFGe médian : 32 mL/min/1,73 m²), 31 % avaient des prescriptions d'IPP à l'inclusion. Les patients utilisant des IPP présentaient des concentrations plus élevées de certaines TUs par rapport aux autres patients, notamment l'IS total et libre, le PCS total et libre, le PCG total et libre, la PAG, la kynurénine libre, et l'HA libre. Après ajustement pour des comorbidités à l'inclusion, du nombre de médicaments co-prescrits et des données de laboratoire, y compris le DFGe, les associations entre la prescription d'IPP et les concentrations sériques élevées d'IS libre et total, de PCG libre et total et de PAG sont restées significatives.

Conclusion : Nos résultats indiquent que la prescription d'IPP est indépendamment associée à la rétention sérique de certaines TUs. Ces résultats sont intéressants pour mieux comprendre les facteurs susceptibles de moduler les concentrations sériques des TUs chez les patients atteints de MRC, mais ils devront être confirmés par des études longitudinales.

4.2 INTRODUCTION

Les TUs constituent l'un des facteurs de risques non traditionnels associés à la progression de la MRC, à une incidence élevée de MCV, de neurotoxicité et/ou de maladies osseuses⁶³. D'où la nécessité fondamentale d'identifier les facteurs pouvant impacter les concentrations sériques des TUs. Certains médicaments pourraient moduler ces concentrations (cf Chapitre 1.3).

Comme déjà expliqué, de nombreux TUs et médicaments administrés aux patients atteints de MRC sont des anions organiques, qui sont éliminés de manière physiologique par les OATs^{121,303,304}. Par conséquent, une éventuelle compétition entre les TUs et les médicaments pourrait expliquer les variations des concentrations de certaines TUs et accentuer la cascade de leurs effets toxiques. Ceci a bien été démontré par quelques études précédentes^{113,304} (cf Chapitre 1.3).

Les patients avec une MRC sont des patients qui présentent de nombreuses comorbidités conduisant à une polypharmacie. Cette polypharmacie ainsi que le risque accru d'hémorragie digestive observé chez ces patients sont très souvent associés à une prescription d'IPP. Les effets indésirables associés à l'utilisation des IPPs chez les patients atteints de MRC ont été étudiés, avec des associations significatives trouvées entre la prescription d'IPP et l'insuffisance rénale aiguë, la progression vers la défaillance rénale et la mortalité^{305,306}. Ces médicaments, très fréquemment prescrits dans la MRC, sont connus pour être des inhibiteurs des OAT1/OAT3^{113,305} (**Tableau 11**). De plus, ces IPP peuvent également avoir une influence sur le microbiote intestinal à l'origine de la production d'un certains nombres de TUs^{96,307} (cf Chapitre 1). En outre, il a été montré que les IPPs peuvent diminuer la capacité d'assimilation des protéines au niveau de l'intestin grêle qui vont donc progresser vers le côlon présentant la grande densité en microbiote altéré, et augmentant donc la production des TUs à ce niveau³⁰⁸. Nous pouvons donc raisonnablement émettre l'hypothèse que les IPPs pourraient moduler les concentrations sériques des TUs.

Tableau 11 : Types des inhibiteurs de pompe à protons, affinité aux OAT1/OAT3, et liaison aux protéines plasmatiques.

Types d'IPP ³⁰⁹⁻ 316	OAT1	OAT3	Liaison plasmatique aux protéines ³¹⁰
Oméprazole	haute affinité	haute affinité	95-96%
Esoméprazole	données limitées	haute affinité	97%
Pantoprazole	affinité modérée	haute affinité	92%
Lansoprazole	haute affinité	haute affinité	97%
Rabéprazole	données limitées	haute affinité	97%

IPP : inhibiteurs de pompe à protons ; OAT : organic anion transporter.

Notre hypothèse de recherche est que les patients traités par IPP pourraient avoir des concentrations de TUs plus importantes que ceux non traités par IPP et que ce lien est indépendant des autres facteurs de risque d'élévation des TUs, y compris le DFGe. À notre connaissance, l'association entre la prescription d'IPP et les concentrations sériques de TUs n'a pas été précédemment étudiée chez les patients atteints de MRC avant défaillance rénale. L'objectif principal de la présente étude transversale était d'évaluer une éventuelle association indépendante entre la prescription d'IPP et les concentrations sériques de divers TUs à l'inclusion chez des patients atteints de MRC avant défaillance rénale, après ajustement sur le DFGe et d'autres facteurs de confusion.

4.3 MÉTHODES

4.3.1 Population

Comme pour la première étude de ce travail de thèse, cette étude transversale se base sur les données de la cohorte CKD-REIN.

A noter que ce travail a été réalisé au début de la thèse. Du fait de la complexité, du coût, et du temps nécessaire aux dosages des TUs chez les 3033 patients de la cohorte CKD-

REIN, nous n'avions pas encore les résultats du dosage de toutes les TUs pour l'ensemble des patients au moment de l'analyse. Ainsi, et afin de profiter du temps jusqu'à l'obtention de l'ensemble des dosages, la présente étude a été menée dans un échantillon représentatif tiré au sort de la cohorte entière CKD-REIN. Cet échantillon est constitué à partir des patients ayant un échantillon biologique disponible à la biobanque, et représentait 680 patients dont les caractéristiques à l'inclusion sont comparables à celles des patients de l'ensemble de la cohorte (**Annexe 16**).

A noter que, comme pour le chapitre précédent, tous les patients inclus dans cet échantillon avaient la date de prélèvement des TUs le même jour que l'inclusion, ou bien au maximum 3 mois au-delà de l'inclusion (pour la minorité, que 5% des patients). Donc les TUs sont comparables par rapport aux caractéristiques à l'inclusion dans notre analyse.

4.3.2 Collection des données

Nous avons recueilli les caractéristiques des patients (âge, sexe, et statut tabagique), les données cliniques (IMC, CRP, créatinine sérique, hémoglobine sérique, albumine sérique, l'urée) ainsi que les antécédents médicaux détaillés, notamment les antécédents de diabète, d'HTA, de dyslipidémie, de MCV et d'insuffisance rénale aiguë. Les définitions de ces derniers et des données cliniques sont identiques à celles utilisées dans notre objectif précédent (cf Chapitre 3.2.2). Un dosage sanguin à l'inclusion a été réalisé afin de doser l'urée. Le rapport ACR a été classé conformément aux directives du groupe KDIGO ⁴. Le DFGe a été calculé à partir de la créatinine sérique en utilisant l'équation CKD-EPI (2009) ⁷, l'équation qui est montrée la plus précise pour estimer le DFG dans la population européenne ^{7,12} (cf Chapitre 1.1).

4.3.3 Prescription de médicaments

Les informations sur l'utilisation des médicaments (y compris les IPPs) ont été obtenues à partir des ordonnances de médicaments lors de l'entretien avec les patients à l'inclusion. Les IPPs inclus sont l'oméprazole, l'ésoméprazole, le pantoprazole, le lansoprazole et le rabéprazole. Les dates de prescription des IPPs coïncident avec les dates

de prélèvement des échantillons de sérum pour les TUs ; tous les patients considérés comme utilisateurs d'IPP ont une ordonnance d'IPP à la date du prélèvement de sérum.

4.3.4 Quantification des toxines urémiques

Les fractions de TUs ont été quantifiées à l'aide de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem comme expliqué dans le chapitre 3.2.3 de l'objectif précédent.

Dans la cohorte CKD-REIN, les concentrations sériques des 10 TUs suivants ont été évaluées : CMPF, IS, IAA, kynurénine, KA, PCS, PCG, PAG, HA, et TMAO, qui sont toutes dérivées de l'intestin sauf pour le CMPF. Parmi ces TUs, le TMAO et la PAG sont de petites molécules hydrosolubles, tandis que les autres sont des molécules liées aux protéines. Par conséquent, les concentrations sériques sont rapportées dans ce chapitre comme libres et totales uniquement pour les TUs liées aux protéines. Le KA libre n'est pas mesurable vu que la plupart des valeurs sont non détectables (<0.01 mg/L), donc il n'a pas pu être analysé dans notre étude.

4.3.5 Analyse statistique

Les variables continues sont exprimées en médiane [Q1-Q3] ou en moyenne (écart-type) si la distribution de la variable est normale, et les variables catégorielles sont exprimées en pourcentage. Le test de rang de Wilcoxon ou le test t de Student a été utilisé (selon l'adéquation) pour comparer les variables continues dans deux groupes, le test de khi-deux a été utilisé pour comparer deux variables catégorielles. Le test de Kruskal-Wallis a été utilisé pour comparer les concentrations de chaque TU entre les différents stades de la MRC, suivi d'une analyse post-hoc effectuée par le test de Dunn (**Annexe 17**).

Étant donné que la distribution des valeurs des TUs ne respecte pas une distribution Gaussienne, elles ont été log normalisées.

Pour chaque TU étudiée, une régression linéaire a été réalisée pour évaluer l'association brute entre la prescription d'IPP et les concentrations de TU. Chaque association

TU-IPP trouvée statistiquement significative en univariée a été ensuite évaluée par une analyse multiple. Une régression linéaire multiple a été réalisée pour chaque TU avec la concentration de TU log normalisée prise comme variable dépendante. Les variables cliniquement pertinentes préalablement sélectionnées suite à une revue de la littérature et celles avec une $p < 0,2$ dans l'analyse univariée ont été incluses dans le modèle d'analyse multiple : l'âge à l'inclusion, le sexe, la CRP, les antécédents d'insuffisance rénale aiguë, le statut tabagique, l'albuminémie, le diabète, l'IMC, le nombre total de médicaments co-prescrits, l'ACR et le DFGe à l'inclusion. Les hypothèses requises par l'analyse de régression linéaire ont été vérifiées et satisfaites.

Les patients dont les valeurs de concentration d'urée étaient considérées comme des valeurs aberrantes (urée sérique $<2,5$ mM ou >100 mM) ont été considérés comme des données manquantes.

En supposant que les données manquantes étaient au hasard, nous avons effectué une imputation multiple avec des équations enchaînées (MICE)²⁹⁴, mise en œuvre avec le package MICE dans le logiciel R²⁹⁵. Compte tenu du pourcentage de données manquantes, 32 jeux de données complets ont été créés et imputés. Le modèle d'imputation comprenait toutes les variables présentes dans les modèles (TU, IPP et les covariables de chaque modèle). Des modèles de régression linéaire ont été générés pour chaque jeu de données, et les coefficients de régression combinés ont été obtenus selon les règles de Rubin. $P < 0,05$ était considérée comme statistiquement significative, présentée en gras dans les tableaux. Toutes les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel R, version 4.1.2 (R Foundation for Statistical Computing, Vienne, Autriche)²⁹⁵.

4.4 RESULTATS

4.4.1 Caractéristiques des patients à l'inclusion

Un total de 680 patients a été analysé dans cette étude, avec leurs caractéristiques décrites dans le **Tableau 12**. L'âge médian [Q1-Q3] des participants était de 68 [61-77] ans, 31 % étaient des femmes et l'IMC médian était de 28 [25,2-31,4] kg/m². Presque tous les

participants souffraient d'HTA (96,6 %), et une grande proportion avait le diabète (40 %). 49 % étaient d'anciens fumeurs et 21 % présentaient des antécédents d'insuffisance rénale aiguë. Le DFGe médian était de 32 [23-41] ml/min/1,73 m².

31 % des patients avaient une prescription d'IPP à l'inclusion. Les utilisateurs d'IPP différaient de manière significative des non-utilisateurs en ce qui concerne les caractéristiques à l'inclusion (**Tableau 12**). Les patients avec une prescription d'IPP étaient significativement plus âgés, plus susceptibles d'être des femmes, avaient des concentrations de CRP plus élevées, une prévalence plus élevée de comorbidités, un nombre total médian de médicaments plus élevé, un DFGe plus faible, et des concentrations sériques plus faibles d'albumine et d'hémoglobine (P < 0,05).

La distribution des concentrations sériques des TUs en fonction du stade de la MRC est présentée dans **l'Annexe 17**. Les patients atteints de MRC à un stade plus avancé présentaient des concentrations de TUs significativement plus élevées, à l'exception de la fraction libre du CMF.

Tableau 12 : Caractéristiques à l'inclusion de la population étudiée selon l'utilisation ou pas des inhibiteurs de pompe à protons.

Caractéristique	Total (N=680) ¹	Utilisation d'IPP (n=211) ¹	Pas d'utilisation d'IPP (n=469) ¹	P- valeur ²	Données imputées
Age à l'inclusion (années)	68 [61-77]	71 [65-78]	67 [59-75]	<0,0001	0%
Femme	31%	37%	28%	0,02	0%
DFGe à l'inclusion (ml/min/1,73 m²)	32 [23-41]	30 [22-39]	32 [24-42]	0,02	0%

Rapport albumine ou protéine/créatinine				0,38	8%
A1 (Normale à légèrement augmentée)	30%	27%	31%		
A2 (Modérément augmentée)	30%	33,5%	28%		
A3 (Sévèrement augmentée)	40%	39,5%	41%		
Antécédents d'insuffisance rénale aiguë	21%	28%	17,5%	0,002	7,5%
Statut de fumeur					
Jamais fumeur	38%	39,5%	37,5%	0,69	0,7%
Fumeur actuel	13%	13,5%	12%		
Ancien fumeur	49%	47%	50,5%		
Hypertension artérielle	96,6%	98%	96%	0,16	0,3%
Diabète	40%	44%	38,5%	0,16	0,3%
Dyslipidémie	73%	79,4%	69,6%	0,008	0,4%
Antécédents de maladies cardiovasculaires	52%	63,5%	47,3%	<0,0001	0,6%

Albuminémie (g/L)	40,5 [37,8-43]	40 [37,5-42]	41 [38-43]	0,03	14%
Hémoglobine (g/dL)	13,1 (1,64)	12,8 (1,7)	13,2 (1,5)	0,002	0,6%
CRP (mg/L)	2 [1-6]	4 [2-8]	2 [1-5]	<0,0001	0%
Indice de masse corporelle (kg/m²)	28 [25,2-31,4]	28,5 [25,1-32,4]	27,8 [25,2-31]	0,38	1,1%
Nombre total de médicaments	8 [5-10]	10 [8-12]	7 [4-9]	<0,0001	0,29%

¹ Médiane [Q1-Q3] ou moyenne (écart type) ; %.

² Test de somme de rangs de Wilcoxon ou test de Student ; test de khi-deux.

DFGe: débit de filtration glomérulaire estimé; CRP: protéine C-réactive; IPP: inhibiteurs de pompe à protons.

Les IPPs les plus prescrits dans notre étude sont respectivement l'ésoméprazole, le lansoprazole et l'oméprazole (**Tableau 13**).

Tableau 13 : Description des types de prescription des inhibiteurs de pompe à protons.

Types d'IPP	Prescription d'IPP (N=211)¹
Oméprazole	41 (19,5%)
Esoméprazole	100 (47,5%)
Pantoprazole	11 (5%)
Lansoprazole	48 (23%)
Rabéprazole	11 (5%)

¹ n (%)

IPP: inhibiteurs de pompe à protons.

4.4.2 Analyses univariées

Associations entre les toxines urémiques et les inhibiteurs de pompe à protons.

Le **Tableau 14** résume les concentrations sériques respectives de chaque TU dans la population de l'étude et les compare en fonction de l'utilisation d'IPP. Les deux fractions libres et totales des TUs sont présentées pour les TUs liées aux protéines. Les concentrations sériques médianes de l'IS libre et total, de la kynurénine libre, du PCS libre et total, du PCG libre et total, de la PAG et de l'HA libre étaient significativement plus élevées chez les patients qui utilisent des IPPs que chez les autres. Nous n'avons pas observé de différences significatives entre les groupes d'utilisation d'IPP pour l'IAA libre et total, la kynurénine totale, le KA total, l'HA total, le CMPF libre et total, le TMAO ou l'urée. Par conséquent, les éventuelles associations entre ces variables et l'utilisation d'IPP n'ont pas été évaluées davantage dans l'analyse de régression multiple.

La distribution des toxines urémiques en fonction de l'utilisation des inhibiteurs de pompe à protons est également présentée dans **l'annexe 18**.

Tableau 14 : Concentrations sériques médianes des toxines urémiques selon l'utilisation d'inhibiteurs de pompe à protons à l'inclusion.

Toxines urémiques	Total (N=680) ¹	Utilisation d'IPP (n=211) ¹	Pas d'utilisation d'IPP (n=469) ¹	P-valeur ²	Données imputées
Indoxyl sulfate (mg/l)					
Libre	0,06 [0,03-0,1]	0,08 [0,04-0,14]	0,05 [0,03-0,1]	<0,0001	0%
Total	4,7 [2,7-8,0]	5,7 [3,3-10,60]	4,3 [2,4-7,20]	<0,0001	
Acide indole-3-				0,31	0%

acétique (mg/l)				0,60	
Libre	0,034 [0,023-0,053]	0,035 [0,024-0,056]	0,034 [0,023-0,05]		
Total	0,59 [0,38-0,88]	0,57 [0,37-0,80]	0,6 [0,4-0,90]		
Kynurénine (mg/l)					
Libre	0,15 [0,10-0,20]	0,2 [0,1-0,22]	0,15 [0,1-0,2]	0,04	0%
Totale	1,40 [1,07-1,86]	1,44 [1,04-1,90]	1,38 [1,08-1,80]	0,97	
Acide kynurénique (mg/l)					
Libre	<LDD	NA	NA		0%
Total	0,03 [0,02-0,04]	0,03 [0,02-0,04]	0,03 [0,02-0,04]	0,54	
P-crésyl sulfate (mg/l)					
Libre	0,22 [0,11-0,47]	0,31 [0,15-0,57]	0,20 [0,09-0,41]	<0,0001	0%
Total	16 [8-27]	18 [11-30]	15 [8-25]	0,003	
P-crésyl glucuronide (mg/l)					
Libre	0,06 [0,02-0,13]	0,09 [0,04-0,17]	0,05 [0,02-0,11]	<0,0001	0%
Total	0,08 [0,03-0,19]	0,13 [0,05-0,24]	0,06 [0,03-0,16]	<0,0001	
Acide hippurique (mg/l)					
Libre	0,91 [0,44-1,91]	1,05 [0,50-2,07]	0,86 [0,42-1,78]	0,025	0%

Total	3,7 [1,9-7,8]	4,2 [2,1-8,2]	3,5 [1,8-7,3]	0,17	
Acide 3-carboxy-4-éthyl-5-propyl-2-furanpropanoïque (mg/l)					
Libre	0,011 [0,006-0,017]	0,010 [0,005-0,016]	0,011 [0,006-0,017]	0,11	0%
Total	2,9 [1,4-5,5]	2,6 [1,2-5,2]	3,0 [1,6-5,7]	0,06	
Phénylacetylglutamine (mg/l)	2,55 [1,31-4,25]	3,21 [1,87-5,44]	2,22 [1,17-3,74]	<0,0001	0%
Trimethylamine N-oxide (mg/l)	1,48 [0,87-2,56]	1,49 [0,86-2,54]	1,48 [0,87-2,56]	0,9	0%
Urée (mmol/l)	12,6 [9,5-17,5]	12,8 [9,8-17,3]	12,4 [9,5-17,5]	0,57	6,1%

¹Médiane [Q1-Q3].

²Test de somme de rangs de Wilcoxon.

IPP: inhibiteurs de pompe à protons; LDD : limite de détection (0,01 mg/L). NA : non applicable.

4.4.3 Analyses multiples

Associations entre les toxines urémiques et les inhibiteurs de pompe à protons.

L'analyse de régression linéaire multiple (présentée dans le **Tableau 15**) a confirmé l'association entre les IPPs et les concentrations sériques élevées d'IS libre et total, de PCG libre et total, et de PAG, même après ajustement sur l'âge, le sexe, le nombre total de médicaments co-prescrits, des antécédents d'insuffisance rénale aiguë, des concentrations sériques de CRP et d'albumine, de diabète, d'IMC, du statut tabagique, d'ACR et de DFGe.

Cependant, après ajustement sur les mêmes facteurs de confusion, la kynurénine libre, le PCS libre et total, et l'HA libre n'étaient plus significativement associés à l'utilisation d'IPP (**Tableau 15**).

Tableau 15 : Coefficients bruts et ajustés des concentrations des toxines urémiques log-normalisées associées aux inhibiteurs de la pompe à protons.

Toxines urémiques log-normalisées	Analyse univariée		Analyse multivariée	
	Beta brut [IC 95%]	P-valeur	Beta ajusté [IC 95%]	P-valeur ¹
Indoxyl sulfate libre	0,40 [0,24;0,57]	< 0,001	0,19 [0,02;0,35]	0,02
Indoxyl sulfate total	0,37 [0,22;0,51]	< 0,001	0,24 [0,1;0,3]	0,001
Kynurénine libre	0,10 [0,02;0,18]	0,02	0,01 [-0,1;0,07]	0,7
P-crésyl sulfate libre	0,38 [0,19;0,58]	< 0,001	0,05 [-0,1;0,2]	0,6
P-crésyl sulfate total	0,23 [0,06;0,39]	0,003	0,002[-0,17;0,17]	0,9
P-crésyl glucuronide libre	0,51 [0,33;0,70]	< 0,001	0,24 [0,05;0,4]	0,01
P-crésyl glucuronide total	0,52 [0,33;0,72]	< 0,001	0,23 [0,02;0,4]	0,02
Acide hippurique libre	0,20 [0,03;0,37]	0,02	0,13 [-0,04;0,3]	0,1
Phénylacetylglutamine	0,36 [0,22;0,50]	< 0,001	0,14 [0,09;0,2]	0,03

¹Chaque modèle a été ajusté en fonction de : l'âge, le sexe, le nombre total de médicaments co-prescrits, les antécédents d'insuffisance rénale aiguë, la protéine C réactive à haute sensibilité, l'albumine sérique, le diabète, l'indice de masse corporelle, le statut tabagique, le rapport albumine ou protéine/créatinine, le débit de filtration glomérulaire estimé. IC : intervalle de confiance.

4.5 DISCUSSION

Dans cette étude transversale, nous avons cherché à évaluer l'association entre l'utilisation d'IPP (bien connus pour être des inhibiteurs d'OAT1/OAT3) et les concentrations sériques de TUs à l'inclusion dans un sous-groupe de patients de la cohorte française

nationale CKD-REIN constituée de patients atteints de MRC modérée à avancée. Notre étude est la première à montrer que (i) les concentrations sériques de PAG, d'IS libre et total, et de PCG libre et total étaient significativement plus élevées chez les patients prenant des IPPs que chez ceux qui n'en prennent pas et (ii) cette association reste statistiquement significative après ajustement sur le DFGe, l'âge, le sexe, les antécédents d'insuffisance rénale aiguë, les concentrations sériques de CRP et d'albumine, le diabète, l'IMC, le statut tabagique, l'ACR et le nombre total de médicaments co-prescrits.

Plusieurs études ont montré que les TUs sont associées à la progression de la MRC et à plusieurs autres complications comme celles cardiovasculaires, ainsi qu'à une augmentation des taux de mortalité⁸². En outre, un nombre croissant de preuves montre que certaines TUs ont un rôle dans le développement des MCV athéromateuses et/ou non-athéromateuses – la première cause de mortalité chez les patients atteints de MRC¹⁷.

En conséquence, une meilleure compréhension des facteurs responsables de la modulation des concentrations sériques des TUs (indépendamment de l'effet de la dysfonction rénale) est indispensable pour limiter les effets nocifs de ces TUs, permettant une meilleure prise en charge des patients dans le but d'améliorer leur morbi-mortalité.

Les IPPs comptent parmi les médicaments les plus fréquemment prescrits dans le monde, en particulier chez les patients souffrant de MRC, avec une prévalence qui varie entre 30 % et 45 %^{305,317}. 31 % des patients de CKD-REIN avaient une prescription d'IPP à l'inclusion. L'utilisation des IPPs par les patients avec une MRC est généralement associée à une polypharmacie et/ou à un traitement concomitant par des médicaments antithrombotiques³⁰⁵. Toutefois, les IPPs peuvent être surprescrits et sont souvent utilisés de manière inappropriée³¹⁸. Bien que les IPPs soient considérés comme efficaces et importants sur le plan médical pour de nombreux patients, la prescription à long terme de ces médicaments doit être réévaluée afin d'éviter ses effets indésirables³¹⁹. Diverses études ont décrit de potentielles toxicités des IPPs. Leur utilisation à long terme est associée à l'ostéoporose, l'hypomagnésémie, l'insuffisance rénale aiguë, la progression de la MRC, les interactions médicamenteuses, et la mortalité^{306,320,321}. Notre groupe a récemment

démontré qu'une nouvelle prise de d'IPPs était associée à un risque accru d'insuffisance rénale aiguë et de progression vers la défaillance rénale³⁰⁵. Xie et al. ont également montré que la prise d'IPP est significativement associée à une augmentation du risque de mortalité³²². Dans le présent article, nous nous sommes intéressé à un potentiel nouvel effet délétère des IPPs à savoir l'interaction avec les TUs.

A noter que l'affinité pour les OAT varie entre les TUs¹²⁰ et selon le type et/ou la dose de l'IPP^{309–311,313–315} (**Tableaux 4 et 11**). Les trois IPPs les plus prescrits dans notre étude semblent avoir une affinité élevée pour l'OAT3 et deux d'entre eux ont une forte affinité pour l'OAT1, d'où leur potentiel effet dans la modulation des concentrations sériques des TUs qui sont également éliminées par le système de transport OAT1/3. Dans notre présente analyse, nous avons rapporté que les IPPs étaient associés aux concentrations sériques de certaines TUs, mais l'interaction potentielle entre les IPPs et les TUs était très peu étudiée dans la littérature. Une étude récente menée chez des patients avec une MRC transplantés rénaux a montré que l'utilisation d'au moins un inhibiteur OAT1/OAT3 était associée à l'accumulation de certaines TUs, substrats de ces transporteurs¹¹³. De même, les résultats de quelques études sur des animaux montrent que certains médicaments inhibiteurs de l'OAT1/OAT3 diminuent l'excrétion des TUs (notamment l'IS)^{121,127,128}.

Parmi les TUs connues pour être transportées par les OAT1/OAT3 et qui sont évaluées dans notre étude, nous avons montré que seules les concentrations sériques de l'IS ont été significativement élevées chez les patients utilisant des IPPs, même après avoir considéré des facteurs de confusion comme le DFGe. Aucune étude préclinique ou clinique antérieure n'a encore démontré cette association spécifique. Toutefois, les rares études ayant évalué l'interaction entre les médicaments et les TUs au niveau des OATs ont conclu que la clairance rénale de l'IS est diminuée suite à l'administration de certains médicaments transportés par l'OAT1 ou l'OAT3^{127–129}. Les médicaments qui interagissent avec les OAT1 et OAT3 comprennent les antibiotiques β-lactamines, les diurétiques, les agents uricosuriques et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (par contre ces derniers sont très rarement prescrits dans la MRC)³²³. Comme déjà mentionné, les IPPs sont également considérés comme des inhibiteurs de l'OAT; par conséquent, on peut raisonnablement émettre une hypothèse que

les IPPs et l'IS interagissent au niveau des OATs et donc que l'utilisation des IPPs augmente les concentrations sériques de l'IS.

Cependant, nous n'avons trouvé aucune association indépendante significative avec certaines autres TUs connues pour être transportées par les OAT1/OAT3 inclus dans notre étude (IAA, kynurénine, KA, PCS, HA et CMPF) et la prescription d'IPP. Ces résultats pourraient être influencés par la dose de chaque IPP, un facteur qui n'a pas été inclus dans notre analyse et qui pourrait interagir différemment avec chaque concentration sérique de TU. Les IPPs ont un effet dépendant de la dose et une manière dépendante de la concentration pour bloquer les OATs³⁰⁹. Indépendamment, chaque IPP et TU a une affinité différente pour les OATs et de différentes sites de liaison. L'affinité spécifique des TUs pour les OATs pourrait également être modulée par d'autres médicaments inhibiteurs d'OAT, tels que les diurétiques qui peuvent avoir une capacité différente d'interaction avec les OATs¹¹³.

Une étude a montré que le probénécide réduit significativement le transport du PCS par les cellules rénales³²⁴. L'accumulation de PCS a également été confirmée par une étude clinique récente menée par André et al.¹¹³, qui a conclu que la prescription d'au moins un inhibiteur de l'OAT1/OAT3 était indépendamment associée à l'accumulation sérique du PCS après ajustement sur le DFG, l'âge, la concentration plasmatique d'albumine et le temps depuis la transplantation. Notre étude a révélé une association brute significative entre la prescription d'IPP et les concentrations sériques élevées de PCS, mais cette association n'était plus significative après les ajustements multiples. La rétention de PCS causée par des médicaments excrétés par les OATs autres que les IPPs pourrait expliquer cette différence entre les résultats d'André et al.¹¹³ et notre résultat.

En outre, nous avons montré que la prescription d'IPP était significativement associée à des concentrations sériques élevées de PAG et de PCG libre et total, après ajustement sur les facteurs de confusion. A notre connaissance, il n'a pas été démontré jusqu'à présent que le PCG et la PAG sont transportés par les OATs. Néanmoins, plusieurs études ont démontré que les IPPs peuvent moduler la composition et le métabolisme du microbiote intestinal¹⁰⁹. Ces changements pourraient ainsi moduler les concentrations des TUs formées dans

l'intestin, telles que le PCG, la PAG et l'IS⁹⁶. Cependant, les enzymes impliquées dans le métabolisme du microbiote intestinal altéré n'ont pas encore été étudiées, et des études précliniques sont nécessaire afin d'expliquer et de valider ce mécanisme possible. En ce qui concerne les autres TUs inclus dans notre analyse qui sont dérivées de l'intestin mais qui ne sont pas des substrats d'OAT, aucune association n'a été trouvée avec l'IPP, en supposant que d'autres facteurs pourraient influencer leurs concentrations sériques, tel que le régime alimentaire. Les concentrations plasmatiques des TUs issues du microbiote intestinale peuvent être modulées par la quantité et la qualité de l'apport alimentaire (protéines et fibres)³²⁵.

Notre étude actuelle présente des points forts. Bien que nous n'avons pas évalué tous les participants de la cohorte CKD-REIN (en raison du coût et de la nature chronophage du dosage des TUs), le nombre de patients analysés était encore suffisamment grand pour permettre l'inclusion d'un nombre suffisant de facteurs de confusion dans l'analyse multiple et de disposer d'une puissance statistique suffisante. En plus, toutes les TUs ont été quantifiées dans le même laboratoire par une méthode validée utilisant une technique robuste de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

Lors de l'analyse de nos données, il est important de garder à l'esprit quelques limites. Premièrement, compte tenu du type de notre étude transversale observationnel, nous ne pouvons pas conclure pour aucune relation de causalité entre les associations observées. De prochaines études longitudinales sont donc nécessaires pour confirmer nos résultats et des études précliniques doivent être menées pour expliquer les mécanismes pathogènes sous-jacents. Deuxièmement, nos résultats pourraient être influencés par un biais de confusion résiduelle, si des facteurs de risque inconnus n'avaient peut-être pas été inclus dans nos analyses. Néanmoins, en évaluant l'association indépendante de l'IPP avec les concentrations sériques de TUs, nous avons ajusté pour de nombreux paramètres principaux, y compris la fonction rénale, connus pour avoir une influence sur les TUs, la prescriptions d'IPPs et le microbiote intestinale. Enfin, notre définition de l'exposition aux IPPs était basée sur des prescriptions qui pourrait conduire à une sous-estimation des associations parce que les IPPs sont parfois utilisés en automédication, et nous n'avons pas analysé un éventuel effet

de la dose³⁰⁹ ou de la durée du traitement avant l'inclusion.

En conclusion, cette étude est la première à indiquer que les IPPs souvent prescrits aux patients atteints de MRC sont liés à des concentrations sériques élevées de TUs (à savoir l'IS, le PCG et la PAG, dans le travail actuel). Ces résultats sont préliminaires, et ce travail est surtout générateur d'hypothèse et ouvre la voie à de futurs travaux. Nos résultats sont intéressants afin de mieux comprendre les facteurs potentiels qui peuvent moduler les concentrations sériques des TUs dans la MRC, cependant, ils devront être confirmés par des études longitudinales.

5 DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

5.1 PRINCIPAUX RESULTATS

Le travail de cette thèse a comme objectif principal de mieux comprendre les facteurs de risque cardiovasculaires spécifiques à la MRC. Ainsi, ce travail a permis de mettre en lumière l'influence potentielle de certaines TUs, des molécules qui s'accumulent durant la MRC, sur la morbi-mortalité cardiovasculaire chez les patients atteints de MRC. Les deux derniers objectifs se basent sur les données issues de la cohorte nationale CKD-REIN, incluant des patients avec une MRC modérée-à-avancée qui sont représentatifs des patients suivis par un néphrologue en France. Le premier objectif de la thèse était de faire une revue narrative exhaustive concernant les effets des TUs sur les événements cardiovasculaires, permettant d'identifier des facteurs de risque cardiovasculaires non traditionnels dans la MRC. Suite aux résultats de cet objectif, nous avons pu élaborer le deuxième objectif qui était d'évaluer l'association entre la kynurénine et la survenue d'événements cardiovasculaires et de mortalité toute cause sur une durée médiane de suivi de 5 ans. Après avoir identifié des facteurs de risque cardiovasculaires non traditionnels dans la MRC, il semble intéressant de déterminer les facteurs qui pourraient moduler les concentrations sériques en TUs. Ainsi le troisième objectif était d'évaluer l'association entre les IPPs et les concentrations sériques en TUs. Une hypothèse sous-jacente était une potentielle compétition entre les IPPs (médicaments fréquemment prescrits aux patients atteints de MRC) et les TUs au niveau des OATs. De plus, l'influence des IPPs sur le microbiote intestinal, à l'origine de la production de certaines TUs, pourrait conduire à une augmentation des concentrations sériques en TUs chez les patients atteints de MRC utilisant l'IPP.

Le premier objectif de cette thèse a permis de montrer que les TUs constituent des facteurs de risque cardiovasculaires non traditionnels dans la MRC, tout en expliquant différents mécanismes identifiés illustrant cet effet. Cet objectif a consisté en une revue narrative regroupant 138 articles originaux regroupant toutes les études *in vitro*, *in vivo*, et observationnelles publiées entre 2002 et 2022 sur le sujet. Les TUs en question étaient celles

ayant démontré la plus grande toxicité aux niveaux expérimentaux⁸⁶, et attirant l'attention et l'intérêt des chercheurs actuellement vu que leur effet clinique est toujours en cours d'exploration. Ceci comprend des TUs dérivées de l'alimentation et de l'intestin : **le CMPPF, le phosphate, l'urée, l'IS, l'IAA, la kynurénine, le KA, le PCS, le PCG, la PAG, l'HA, et le TMAO.** L'accumulation de ces TUs a été impliquée **directement ou indirectement (via l'inflammation chronique et le stress oxydatif)** dans les MCV athéromateuses et non-athéromateuses. La plupart des TUs les plus néfastes sont dérivées du métabolisme intestinal des acides aminés, comme le tryptophane qui est l'acide aminé le plus étudié dans des travaux antérieurs. Cet objectif nous a permis de conclure que la kynurénine, une des TUs dérivée du métabolisme du tryptophane, est celle la moins étudiée en clinique et surtout chez les patients **pré-dialysés**. Une telle étude revêt une importance particulière, étant donné que la toxicité cardiovasculaire de la kynurénine a été démontrée dans des études expérimentales, et qu'une association entre concentration sérique de kynurénine et MCV a été montrée dans la population générale. Par conséquent, nous avons opté pour l'évaluation des effets de cette toxine sur la morbi-mortalité cardiovasculaire chez les pré-dialysés en tant que prochain objectif.

La kynurénine est une molécule liée aux protéines, elle dispose donc de sa partie libre et de celle liée aux protéines. Notre étude est la première à évaluer l'effet de la fraction **libre** de la kynurénine, qui est celle active, sur les évènements cardiovasculaires et la mortalité chez les patients avec MRC avant défaillance rénale. Les résultats de notre deuxième objectif ont mis en évidence une association significative entre la kynurénine libre ou total et la survenue des MCV chez les patients pré-dialysés. Nous avons montré pour la première fois qu'un doublement des concentrations sériques de **kynurénine libre** était indépendamment associée à une augmentation de 18 % du rapport de risque instantané d'évènements **cardiovasculaires fatals ou non fatals** ; avec une association particulièrement significative avec les MCV non-athéromateuses, indépendamment de la fonction rénale, des concentrations sériques de tryptophane libre et des facteurs de risque cardiovasculaires traditionnels. Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence un lien significatif entre la kynurénine libre et la mortalité non cardiovasculaire ou la mortalité toute cause. Ainsi, en

ce qui concerne la mortalité, les concentrations sériques plus élevées de la kynurénine libre étaient significativement associées uniquement à un risque de mortalité **cardiovasculaire** plus élevé. Ce travail a montré l'importance d'évaluer la fraction libre des TUs étant donné qu'il s'agit de la fraction active, et a notamment souligné l'association de la kynurénine avec les évènements cardiovasculaires chez les pré-dialysés au-delà des facteurs de risque traditionnels et de la fonction rénale.

Dans le dernier objectif de la thèse, nous avons mis en évidence pour la première fois que les concentrations sériques d'IS libre et total, de PAG, et de PCG libre et total étaient significativement plus élevées chez les patients prenant des IPPs que chez ceux qui n'en prennent pas même après ajustement pour de nombreux facteurs de confusion y compris le DFGe, l'âge, le sexe, les antécédents d'insuffisance rénale aiguë, les concentrations sériques de CRP et d'albumine, le diabète, l'IMC, le statut tabagique, l'ACR et le nombre total de médicaments co-prescrits. Ce travail est notamment génératrice d'hypothèse et a souligné l'importance de mieux comprendre par de futurs travaux les facteurs qui pourront moduler les concentrations sériques des TUs dans la MRC afin de limiter leurs effets délétères.

5.2 FORCES ET LIMITES

La présente thèse se caractérise par plusieurs forces qui soulignent son importance et sa place dans le monde de la néphrologie. Le fait que nos travaux sont basés sur la cohorte Française nationale CKD-REIN engendre plusieurs forces. CKD-REIN est une cohorte prospective qui inclut plus de 3000 patients atteints de MRC modérée à avancée avant défaillance rénale, formant un **large** échantillon qui permet d'obtenir une puissance statistique suffisamment élevée, permettant d'effectuer des analyses prenant en compte un grand nombre de facteurs de confusion. Les patients de CKD-REIN ont été recrutés à partir de 40 consultations de néphrologie réparties sur toute la France, ce qui fait qu'ils sont **représentatifs** des pratiques néphrologiques et de la population de patients atteints de MRC avec un suivi néphrologique au niveau **national** Français. En plus, l'étude CKD-REIN dispose de **données exhaustives**, y compris les caractéristiques sociodémographiques des patients, les antécédents médicaux, la prise en charge pharmacologique, des résultats

biologiques sanguins et urinaires en lien avec la MRC, et les dosages de TUs, permettant d'ajuster sur un grand nombre de facteurs de confusion ayant peu de données manquantes. Le suivi actif sur 5 ans nous a permis d'observer la survenue de plusieurs évènements chez ces patients, dont un grand nombre d'évènements cardiovasculaires. Le recueil de données de différentes sources dans cette cohorte dont les dossiers médicaux, les interviews et les questionnaires..., nous a permis d'avoir accès à une exhaustivité de données utiles à la réalisation de nos travaux. L'évaluation précise et **standardisée** des évènements cardiovasculaires par des spécialistes permette également l'utilisation de données de qualité concernant le critère de jugement d'une de nos études. Le dosage **centralisé** des TUs dans CKD-REIN en utilisant une technique **robuste et validée** est un point fort à ne pas négliger. En outre, la fraction libre des TUs liées aux protéines est la partie active de la molécule et porte donc un plus grand intérêt clinique. En revanche, le dosage de cette fraction est généralement la plus complexe à effectuer, ce qui fait que CKD-REIN se caractérise par la disponibilité de données relatives au dosage de la fraction **libre** en plus des fractions liées, sans aucune donnée manquante observée pour toutes les TUs incluses dans nos travaux. Cela nous a permis d'étudier la fraction libre des TUs dans le dernier objectif, et d'évaluer pour la première fois la place de la kynurénine libre dans les complications cardiovasculaires dans la MRC dans le deuxième objectif. En plus des multiples points forts liés à la cohorte CKD-REIN, cette thèse présente une vue d'ensemble détaillée sur les dernières mises à jour concernant l'association entre TUs et MCV dans la MRC grâce à la revue narrative présentée dans le premier objectif. Enfin, l'évaluation de la prise d'IPPs en tant que facteur qui pourra moduler les concentrations sériques en TUs dans la MRC ainsi que l'association entre les concentrations sériques de la kynurénine libre et la survenue de MCV dans la MRC sont des sujets qui sont abordés pour la première fois dans la littérature scientifique et ouvrent des perspectives importantes pour le monde de la recherche sur les TUs.

Cependant, cette thèse présente quelques limites. En raison de la **nature chronophage et du coût liés au dosage des TUs, nous n'avions pas la quantification des TUs** pour la majorité des participants de la cohorte CKD-REIN au début de la thèse. Nous avons donc réalisé l'étude évaluant l'association entre la prescription d'IPP et les concentrations sériques

de divers TUs dans un **échantillon** aléatoire de la cohorte CKD-REIN, sans donc considérer tous les participants de la cohorte entière. En revanche, cet échantillon était bien représentatif de la cohorte entière et incluait un nombre de participants suffisamment élevé pour permettre l'inclusion d'un nombre suffisant de facteurs de confusion. Bien que nos résultats sont très intéressants, mais le type **transversal** de cette étude ne permet pas de conclure pour aucun lien de causalité entre l'utilisation d'IPP et les concentrations sériques élevées de TUs. Concernant notre 2^e objectif que nous avons pu atteindre après obtention de la quantification des TUs pour l'ensemble des participants de CKD-REIN, l'évaluation de l'effet des TUs est basée sur leurs **concentrations sériques à l'inclusion** de l'étude, sans évaluer leur effet après 2 et 5 ans. En plus, nous n'avons mis en lumière que l'effet de la kynurénine qui n'est qu'une partie de plusieurs autres TUs délétères à la santé cardiovasculaire, **sans explorer son rôle en tant que biomarqueur prédictif** du risque cardiovasculaire ni trouver sa place par rapport aux autres TUs impliquées. Nous pouvons noter aussi quelques biais, notamment le **biais de sélection** lié au design de l'étude CKD-REIN qui pourra limiter la généralisabilité de nos résultats. Déjà, les patients inclus dans l'étude sont uniquement ceux qui ont été suivis par un néphrologue. Par conséquent, leurs profils peuvent différer des patients non suivis pour leur maladie (à plusieurs niveaux, y compris la gravité de la MRC, leurs caractéristiques cliniques, les atteintes cardiovasculaires...). De même, les patients inclus sont ceux qui ont pu fournir un consentement libre et éclairé, ce qui implique l'exclusion des patients atteints de démence avancée. Ces derniers présentent possiblement des problèmes de compréhension et de suivi des traitements, une mobilité réduite, et/ou une alimentation altérée et d'autres facteurs de mode de vie ; des caractéristiques qui diffèrent par rapport aux patients non atteints de démence et qui pourront affecter les MCV, la prescription et la prise de médicaments, ainsi que les concentrations sanguines des TUs dérivées de l'alimentation et de l'intestin qui font l'objet de la présente thèse. En outre, nos critères d'éligibilité lors de l'inclusion étaient des patients atteints de MRC avec un DFGe inférieur à 60 ml/min/1,73 m², excluant ainsi tous les patients dont le DFGe dépassait ce seuil. Cependant, les patients avec un DFGe supérieur à 60 ml/min/1,73 m² peuvent toujours présenter une albuminurie élevée (>30 mg/g) ou d'autres marqueurs de lésions rénales, qui correspondent également aux critères de la MRC

selon les directives KDIGO⁵. De plus, malgré la prise en compte de nombreux facteurs dans les analyses réalisées, nous ne pouvons pas écarter la possibilité d'un biais de confusion résiduelle vu que des facteurs de risque inconnus ou non mesurés n'étaient pas inclus dans nos analyses.

5.3 IMPLICATION ET PERSPECTIVES

Ce travail a montré que mener de larges études de cohortes prospectives tels que CKD-REIN est crucial pour mettre en évidence les déterminants et les facteurs de risque des complications dans la MRC, tout en soulignant des questions pertinentes liées à la santé publique ainsi qu'à la prise en charge des patients par les cliniciens. Durant cette thèse, nous avons cherché à identifier des facteurs de risques cardiovasculaires spécifiques à la MRC. Une bonne exploration et validation des biomarqueurs (comme les TUs) pouvant prédire le risque cardiovasculaire dans la MRC, et l'exploration des facteurs pouvant affecter ces biomarqueurs, sont alors indispensables. En outre, il est important de continuer à mener des recherches pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de ces effets toxiques et pour développer de nouveaux traitements efficaces, surtout que ces TUs présentent de nombreux effets négatifs au-delà des MCV tels que la neurotoxicité, la progression de la MRC, les maladies osseuses, et les dysfonctionnements métaboliques. Enfin, viser les patients atteints de MRC dans les essais cliniques est nécessaire afin de pouvoir mieux gérer ou prévenir la progression et les complications de ce fardeau sanitaire et économique.

Les implications et perspectives de chacun de nos trois objectifs seront bien détaillées dans les sous-parties ci-dessous.

Toxines urémiques et maladies cardiovasculaires dans la maladie rénale chronique

Nous avons élaboré tout au long de cette thèse que les TUs pourraient jouer un rôle critique dans l'augmentation de la prévalence et de l'incidence des événements cardiovasculaires et de la mortalité chez les patients atteints de MRC. Des interventions ciblant les TUs pourraient contribuer à prévenir ou réduire les complications

cardiovasculaires dans cette population. Étant donné que les TUs incluses dans notre travail sont dérivées de l'alimentation ou de l'intestin, nous nous concentrerons uniquement sur les possibles interventions pouvant cibler spécifiquement ces types de TUs. Les diverses options thérapeutiques actuelles reposent sur des études de faible niveau de preuve et ayant des résultats discordants.

Modifier la composition du microbiote intestinal ou cibler les enzymes impliquées dans les voies de génération des TUs d'origine intestinal semblent être des solutions intéressantes à explorer. La modification des habitudes alimentaires et l'utilisation de **prébiotiques, probiotiques et symbiotiques** pourraient réduire la production de TUs dérivées du microbiote intestinal^{82,89,326}, mais ceci doit encore être confirmée par des essais contrôlés randomisés avant de pouvoir les recommander dans la pratique clinique³²⁷. Le rôle de ces biotiques dans la MRC et leur effet sur la progression de la maladie n'a encore été approuvé par aucune agence pharmaceutique et les études ont rapporté de nombreux résultats contradictoires³²⁸. L'apport alimentaire influence la composition et l'activité des microbiotes intestinales, et il a été montré que les régimes hypoprotéiques, végétariens et méditerranéens réduisent les concentrations sériques des TUs d'origine alimentaire et intestinale^{89,329,330}. Les polyphénols (à partir d'un régime à base de plantes) pourront contrecarrer l'effet néfaste de l'IS par exemple en modulant l'activité de l'AhR³²⁸. Généralement, les néphrologues conseillent aux patients atteints de MRC avancée de limiter leur apport en fruits et légumes afin de réduire le risque d'hyperkaliémie. Cependant, ce type de régime pourrait potentiellement affecter négativement la dysbiose intestinale. **De futurs études évaluant les interactions entre alimentation et microbiote intestinal chez des patients avec une MRC sont nécessaires.**

Les chélateurs du phosphate sont largement utilisés pour réguler l'hyperphosphatémie^{89,282}. Les chélateurs du phosphate, du fait de leur mécanisme d'action, pourraient également affecter la composition du microbiote intestinal et donc la production de TUs dérivées de l'intestin. Cependant, les données de la littérature sur ce sujet font l'objet de débats. Dans deux essais cliniques randomisés portant sur des patients atteints de MRC, le sévélamer n'était pas associé à des changements significatifs dans les concentrations

sériques de TUs dérivées de l'intestin^{331,332}. Par conséquent, il n'a pas encore été démontré que les chélateurs du phosphate peuvent réduire efficacement les concentrations de ces composés²⁸².

Les résultats des études animales et des essais cliniques ont démontré que le recours à des molécules absorbantes telles que **l'AST-120** permettra une diminution, plus efficacement que les interventions mentionnées ci-dessus, des concentrations de TUs (principalement l'IS)²⁸². L'AST-120 diminue l'absorption des TUs par le tractus gastro-intestinal, prévenant ainsi leur accumulation dans le sérum^{89,326}. Bien que l'AST-120 réduise efficacement les concentrations sériques des TUs d'origine intestinale, il faut noter que cette molécule est uniquement commercialisée en Asie et que **de futurs essais cliniques thérapeutiques sont nécessaires pour évaluer l'impact de cette molécule absorbante orale sur la survenue de MCV et la mortalité**³³³.

Kynurénine dans la maladie rénale chronique

Nous avons présenté ci-dessus les perspectives concernant la modulation des concentrations sériques des TUs en général. Nous allons détailler ci-après ceux relatives à la kynurénine spécifiquement, une TU qui a fait l'objet de notre 2^e objectif de thèse.

Bien que la voie métabolique kynurénique exerce des effets antioxydants, anti-inflammatoires, et neuroprotecteurs dans des conditions physiologiques, elle a des effets néfastes dans des conditions d'inflammation et de stress comme la MRC et ce d'autant plus quand la concentration sérique de ses métabolites augmente⁹⁹.

Les études expérimentales ont montré que la kynurénine provoquait une dysfonction des CE, une angiogenèse anormale et une thrombose vasculaire. Cependant, très peu d'études cliniques ont démontré l'association entre les concentrations sériques de kynurénine totale et les MCV chez les patients atteints de MRC en pré-dialyse. En plus, aucune étude n'a évalué la fraction libre de la kynurénine étant donné que son dosage est généralement très complexe nécessitant des méthodes sophistiquées et une expertise technique. Etant donné l'intérêt d'évaluer cette fraction qui représente la forme active de la

kynurénine et qui exerce spécifiquement les effets responsables des réponses cellulaires et moléculaires, nous avons étudié pour la première fois l'association entre la kynurénine libre et les MCV dans la MRC, montrant une association significative indépendante entre ces deux. Par conséquent, la kynurénine est un candidat prometteur pour comprendre l'interaction complexe entre la MRC et les MCV.

Nos résultats constituent une première étape afin de mettre en évidence la place de la kynurénine libre dans la MCV chez les patients pré-dialysés. Des analyses longitudinales seront nécessaires afin de confirmer nos résultats. Une fois le dosage des TUs à 2 ans et à 5 ans de l'inclusion seront bien achevés dans l'étude CKD-REIN, nous pourrions reprendre notre analyse tout en prenant compte de ces **mesures longitudinales** et donc de l'effet temps-dépendant de kynurénine en réalisant des **modèles joints**. Ainsi, nous pourrions confirmer nos résultats précédents sur l'association entre la kynurénine et la survenue de MCV chez les patients pré-dialysés. Cette confirmation d'une association étiologique entre la kynurénine et les MCV mérite d'être exploré davantage dans de futurs travaux afin d'explorer le rôle de la kynurénine en tant que **biomarqueur prédictif** du risque cardiovasculaire dans la MRC. Une analyse distincte utilisant des méthodologies **d'analyse prédictive et une validation externe** permettront de conclure pour le rôle de la kynurénine en tant que biomarqueur de la MCV, et puis de comparer **la valeur prédictive des autres TUs** connues pour être associées aux MCV puisque la kynurénine ne constitue qu'un facteur parmi plusieurs autres impliqués. **L'intérêt de ces travaux sera de permettre une meilleure compréhension de la physiopathologie des MCV dans la MRC, et nécessitera de futurs travaux expérimentaux et des essais contrôlés randomisés permettant de mettre en place des solutions thérapeutiques correspondantes pour réduire les concentrations sériques des TUs et donc mieux gérer le risque cardiovasculaire dans la MRC.**

Comme précédemment expliqué, dans un contexte de MRC, la kynurénine est dérivée du métabolisme du **tryptophane** initialement dans **l'intestin**, puis dans différents autres types de cellules en activant exceptionnellement l'enzyme **IDO**, entraînant des complications cardiovasculaires en activant principalement la voie de **l'AhR**. Par conséquent, des stratégies

ciblant chacune de ces étapes pourraient être envisagées comme des pistes pour le développement de nouvelles solutions plus efficaces, permettant ainsi de réguler les concentrations sériques de la kynurénine et d'améliorer donc leurs effets délétères dans la MRC^{101,108,327,328,334,335}.

Un régime **pauvre en acides aminés aromatiques** (tout en restant normoprotéique) pourrait réduire la production des TUs dérivées du métabolisme des acides aminés aromatiques, dont la kynurénine³³⁴. Bien que le tryptophane soit aussi le précurseur du neurotransmetteur souvent appelé « hormone du bonheur », la sérotonine, le régime pauvre en acides aminés aromatiques n'était pas totalement dépourvu de tryptophane et les niveaux d'apport étaient suffisants pour la production de sérotonine.

Malgré le fait que la kynurénine ne soit pas dérivée directement du microbiote intestinal comme précédemment expliqué, il est important de noter que les interférons de type I (qui affectent la voie métabolique kynurénique) sont eux-mêmes régulés par le microbiote^{107,108}. Ainsi, une autre cible intéressante pourrait être la **modulation du microbiote intestinal**, qui pourra aussi affecter l'ensemble des TUs dérivées du microbiote intestinal.

L'AhR pourrait être une autre cible et qui permet également de cibler plusieurs toxines surtout celles dérivées du métabolisme du tryptophane. Massy et Drueke¹⁰¹ ont suggéré que les inhibiteurs de l'AhR seraient probablement indiqués comme solution via le blocage de plusieurs voies communes. **L'inhibition de l'AhR** par son inhibiteur spécifique CH223191 a inhibé l'expression du facteur tissulaire induit par la kynurénine dans les macrophages activés³³⁵. Cependant, l'efficacité et la sécurité des inhibiteurs de l'AhR chez les patients atteints de MRC doivent faire l'objet de futurs études, surtout que les AhR présentent divers ligands avec des effets diversifiés. En d'autres termes, l'activation de l'AhR et les métabolites dérivés du tryptophane peuvent avoir des effets à la fois bénéfiques et/ou délétères¹⁰⁵. Comme déjà expliqué dans l'introduction, le tryptophane est métabolisé à travers plusieurs voies et peut être un précurseur des TUs et/ou de molécules non toxiques telles que la mélatonine, prouvée pour avoir des effets immunorégulateurs et anti-inflammatoires chez les patients hémodialysés³³⁶. Ainsi, l'AhR est activée par plusieurs métabolites, entre autres ceux bénéfiques qui sont essentiels à la détoxification et à la régulation immunitaire et métabolique¹⁰⁵. Par conséquent, les futures interventions devraient spécifiquement bloquer

les voies néfastes activées par l'AhR tout en préservant celles bénéfiques. Pour aller encore plus loin dans ce sujet et discuter d'autres TUs que la kynurénine, des effets diversifiés des métabolites dérivés d'autres acides aminés que le tryptophane, tels que la tyrosine et la phénylalanine, devraient faire l'objet d'exploration par de futurs recherches plus poussées étant donné que les solutés dérivés du même précurseur que celui des TUs pourraient être bénéfiques, voire essentiels, pour le bon fonctionnement du corps. Les résultats pourraient à leur tour aboutir à une réévaluation des options thérapeutiques, en stimulant par exemple certaines voies métaboliques spécifiques et en inhibant d'autres, ou en essayant non seulement d'influencer la génération intestinale des TUs mais aussi leur absorption.

Enfin, les **inhibiteurs de l'IDO** pourraient être utilisés dans des essais cliniques cardiovasculaires afin d'être évalués comme stratégie thérapeutique potentielle³³⁷. Ainsi, la voie kynurénique sera contrôlée tout en préservant les autres voies bénéfiques du tryptophane. Des études animales ont démontré que l'inhibition de l'IDO peut réduire les MCV³³⁸. Il a été démontré que l'inhibition de l'IDO par l'epacadostat a significativement réduit le rapport Kynurénine/Tryptophane³³⁵. Une autre étude préclinique récente avait montré que le traitement par CER-001, un mimétique de la HDL, a atténué l'inflammation systémique et régulé l'IDO³³⁹, partant d'une hypothèse que la HDL exerce des effets anti-inflammatoires et assure une protection endothéliale. Ces données pourraient suggérer que l'usage de CER-001 peut avoir le potentiel d'améliorer les fonctions rénales et la santé cardiovasculaire. Cependant cette étude a été menée dans les cas d'insuffisance rénale aiguë induite par le sepsis, et devra être réévaluée dans la MRC. A noter que l'efficacité des inhibiteurs de l'IDO reste discutable du fait d'une potentielle existence d'une voie alternative qui produit de la kynurénine.

Concernant nos résultats sur les sous-groupes de MCV, montrant une association indépendante significative entre les concentrations sériques élevées de kynurénine libre et la survenue d'évènements cardiovasculaires non-athéromateux dans la MRC sans pouvoir mettre en évidence une association significative avec les MCV athéromateuses, ils devront être aussi confirmés par de prochaines **études longitudinales** qui prennent en compte les différentes mesures de kynurénine. De même, ces résultats soulignent l'importance de

mettre en place des **études précliniques** qui pourront expliquer des mécanismes d'action spécifiques, et explorer le rôle de la kynurénine libre dans **la calcification vasculaire** en tant que potentielle explication intéressante d'effet sur les MCV non-athéromateuses.

Inhibiteurs de pompe à protons et toxines urémiques dans la maladie rénale chronique

En raison des impacts néfastes (cardiovasculaire, rénale, neurologique...) des concentrations élevées de TUs dans la MRC, il semble essentiel et pertinent d'explorer les facteurs susceptibles d'influencer les concentrations sériques de TUs (autres que le DFGe). Ceci vise à limiter leurs concentrations sériques afin de réduire potentiellement leurs effets délétères sur la santé chez les patients avec MRC. Certaines études antérieures ont montré une interaction entre les médicaments inhibiteurs des OAT1/3 (tels que la ciprofloxacine, le furosémide...) et les TUs^{113,127,130,304}, partant d'une hypothèse qu'une potentielle compétition existe entre TU et médicament au niveau de ces transporteurs, entravant ainsi l'élimination rénale des TUs et pouvant expliquer les variations de concentration de certaines TUs. Nous avons évalué cette hypothèse en ciblant spécifiquement les IPPs. Ces derniers sont très fréquemment prescrits dans la MRC, et sont connus pour être des inhibiteurs des OAT1/OAT3^{113,305}. Nos travaux ont montré pour la première fois que les IPPs étaient significativement associés à des concentrations sériques élevées de quelques TUs (l'IS, le PCG et la PAG).

Mais il faut noter que nous avons évalué l'association transversale entre l'utilisation d'IPP et les concentrations sériques de TUs à l'inclusion de l'étude chez des patients atteints de MRC tiré au sort de la cohorte CKD-REIN. Nos résultats sont **préliminaires**, et ce travail est surtout génératrice d'hypothèse. Nos résultats constituent une première étape permettant d'ouvrir la voie à de futurs travaux. Il sera intéressant que cette analyse soit réévaluée sur **l'ensemble des patients de la cohorte** CKD-REIN en premier. Ensuite, une **analyse longitudinale** permettra de confirmer nos résultats. Une fois le dosage des TUs à 2 ans et à 5 ans de l'inclusion seront bien achevés dans l'étude CKD-REIN, nous pourrions comparer les concentrations sériques des TUs entre l'inclusion à l'étude, et puis à 2 et 5 ans

après, chez des patients utilisateurs incidents d'IPPs. Comme évoqué dans la discussion du chapitre 4, les IPPs peuvent être surprescrits souvent sans indications et sont souvent utilisés de manière inappropriée. Leur utilisation à long terme est associée à différents effets délétères tels que l'ostéoporose, l'insuffisance rénale aiguë, ou la progression de la MRC. Notre présent travail rajoute un potentiel nouvel effet délétère des IPPs : l'interaction avec les TUs.

5.4 CONCLUSION

Cette présente thèse a permis de mettre en lumière l'impact significatif des TUs sur la santé cardiovasculaire des patients atteints de MRC. La revue narrative nous a permis de conclure que ces patients ont un risque plus élevé de subir des événements cardiovasculaires fatals ou non en raison direct ou indirect (par l'inflammation chronique et le stress oxydatif) de l'accumulation des TUs. A partir des données de la cohorte CKD-REIN, nous avons montré que les concentrations sériques élevées de kynurénine libre étaient indépendamment associées à un risque accru de survenue d'événements cardiovasculaires fatals ou non, en particulier les événements cardiovasculaires non-athéromateux. Nos travaux ont également mis en évidence l'importance de considérer dans les futurs projets de recherche les facteurs qui peuvent influencer les concentrations sériques des TUs dans cette population avec MRC afin de pouvoir prévenir ou gérer les complications associées à cette maladie. Nos résultats préliminaires ont montré que les concentrations sériques d'IS libre et total, de PAG, et de PCG libre et total étaient significativement et indépendamment plus élevées chez les patients prenant des IPPs que chez ceux qui n'en prennent pas. Les résultats de cette thèse ont des implications pertinentes pour la pratique clinique de néphrologie et la santé publique. Cette thèse souligne la nécessité de mener davantage de recherches pour comprendre les mécanismes sous-jacents de l'effet des TUs sur la santé cardiovasculaire et la mortalité chez les patients atteints de MRC et développer de nouveaux traitements et approches pour réduire leur impact sur la santé de ces patients. Les MCV peuvent à leur tour avoir un impact sur la santé rénale, causant des lésions rénales et la progression de la maladie. Etant donné que de multiples facteurs complexes agissent ensemble pour causer la survenue de MCV, une approche combinée, ciblant à la fois les TUs et d'autres aspects de la MCV, sera

nécessaire pour prévenir ces complications.

BIBLIOGRAPHIE

1. El Chamieh C, Liabeuf S, Massy Z. Uremic Toxins and Cardiovascular Risk in Chronic Kidney Disease: What Have We Learned Recently beyond the Past Findings? *Toxins*. 2022;14(4):280. doi:10.3390/toxins14040280
2. El Chamieh C, Larabi IA, Alencar De Pinho N, et al. Study of the association between serum levels of kynurenine and cardiovascular outcomes and overall mortality in chronic kidney disease. *Clin Kidney J*. 2024;17(1):sfad248. doi:10.1093/ckj/sfad248
3. El Chamieh C, Larabi IA, Laville SM, et al. Proton-Pump Inhibitors and Serum Concentrations of Uremic Toxins in Patients with Chronic Kidney Disease. *Toxins*. 2023;15(4):276. doi:10.3390/toxins15040276
4. Levey AS, Eckardt KU, Dorman NM, et al. Nomenclature for kidney function and disease: report of a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Consensus Conference. *Kidney Int*. 2020;97(6):1117-1129. doi:10.1016/j.kint.2020.02.010
5. Levin A, Stevens PE. Summary of KDIGO 2012 CKD Guideline: behind the scenes, need for guidance, and a framework for moving forward. *Kidney Int*. 2014;85(1):49-61. doi:10.1038/ki.2013.444
6. evaluation_du_debit_de_filtration_globerulaire_et_du dosage_de_la_creatininemie_dans_le_diagnostic_de_la_maladie_renale_chronique_chez_ladulte_-_fiche_buts.pdf. Accessed October 14, 2022. https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2012-10/evaluation_du_debit_de_filtration_globerulaire_et_du dosage_de_la_creatininemie_dans_le_diagnostic_de_la_maladie_renale_chronique_chez_ladulte_-_fiche_buts.pdf
7. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med*. 2009;150(9):604-612. doi:10.7326/0003-4819-150-9-200905050-00006
8. The measured glomerular filtration rate (mGFR) before and 6 months after bariatric surgery: A pilot study - PubMed. Accessed October 17, 2022. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/28161263/>
9. Inker LA, Schmid CH, Tighiouart H, et al. Estimating Glomerular Filtration Rate from Serum Creatinine and Cystatin C. *N Engl J Med*. 2012;367(1):20-29. doi:10.1056/NEJMoa1114248
10. Lees JS, Welsh CE, Celis-Morales CA, et al. Glomerular filtration rate by differing measures, albuminuria and prediction of cardiovascular disease, mortality and end-stage kidney disease. *Nat Med*. 2019;25(11):1753-1760. doi:10.1038/s41591-019-0627-8

11. Inker LA, Eneanya ND, Coresh J, et al. New Creatinine- and Cystatin C-Based Equations to Estimate GFR without Race. *N Engl J Med.* 2021;385(19):1737-1749. doi:10.1056/NEJMoa2102953
12. Pottel H, Björk J, Rule AD, et al. Cystatin C-Based Equation to Estimate GFR without the Inclusion of Race and Sex. *N Engl J Med.* 2023;388(4):333-343. doi:10.1056/NEJMoa2203769
13. Maladie rénale chronique et insuffisance rénale: définition et causes. Accessed October 17, 2022. <https://www.ameli.fr/assure/sante/themes/maladie-renale-chronique/comprendre-maladie-renale-chronique>
14. C C, Ah F. Chronic Kidney Disease. *Prim Care.* 2020;47(4). doi:10.1016/j.pop.2020.08.001
15. Webster AC, Nagler EV, Morton RL, Masson P. Chronic Kidney Disease. *Lancet Lond Engl.* 2017;389(10075):1238-1252. doi:10.1016/S0140-6736(16)32064-5
16. Tangri N, Moriyama T, Schneider MP, et al. Prevalence of undiagnosed stage 3 chronic kidney disease in France, Germany, Italy, Japan and the USA: results from the multinational observational REVEAL-CKD study. *BMJ Open.* 2023;13(5):e067386. doi:10.1136/bmjopen-2022-067386
17. Hill NR, Fatoba ST, Oke JL, et al. Global Prevalence of Chronic Kidney Disease – A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE.* 2016;11(7):e0158765. doi:10.1371/journal.pone.0158765
18. Sundström J, Bodegard J, Bollmann A, et al. Prevalence, outcomes, and cost of chronic kidney disease in a contemporary population of 2·4 million patients from 11 countries: The CaReMe CKD study. *Lancet Reg Health - Eur.* 2022;20. doi:10.1016/j.lanepe.2022.100438
19. Xie Y, Bowe B, Mokdad AH, et al. Analysis of the Global Burden of Disease study highlights the global, regional, and national trends of chronic kidney disease epidemiology from 1990 to 2016. *Kidney Int.* 2018;94(3):567-581. doi:10.1016/j.kint.2018.04.011
20. Jager KJ, Kovesdy C, Langham R, Rosenberg M, Jha V, Zoccali C. A single number for advocacy and communication—worldwide more than 850 million individuals have kidney diseases. *Nephrol Dial Transplant.* 2019;34(11):1803-1805. doi:10.1093/ndt/gfz174
21. Kovesdy CP. Epidemiology of chronic kidney disease: an update 2022. *Kidney Int Suppl.* 2022;12(1):7-11. doi:10.1016/j.kisu.2021.11.003
22. admin ISN. New global kidney health report sheds light on current capacity around the world to deliver kidney care. International Society of Nephrology. Published March 30, 2023. Accessed June 23, 2023. <https://www.theisn.org/blog/2023/03/30/new-global->

[kidney-health-report-sheds-light-on-current-capacity-around-the-world-to-deliver-kidney-care/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9300000/)

23. Bongard V, Dallongeville J, Arveiler D, et al. Estimation et caractérisation de l'insuffisance rénale chronique en France. *Ann Cardiol Angéiologie*. 2012;61(4):239-244. doi:10.1016/j.ancard.2012.03.003
24. Stengel B, Metzger M, Froissart M, et al. Epidemiology and prognostic significance of chronic kidney disease in the elderly--the Three-City prospective cohort study. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26(10):3286-3295. doi:10.1093/ndt/gfr323
25. Olié V, Cheddani L, Stengel B, et al. Prévalence de la maladie rénale chronique en France, Esteban 2014–2016. *Néphrologie Thérapeutique*. 2021;17(7):526-531. doi:10.1016/j.nephro.2021.05.006
26. MGAUFFRE. Insuffisance rénale, les derniers chiffres en France. Objectif rein santé. Published June 10, 2022. Accessed June 23, 2023. <https://objectifreinsante.org/insuffisance-renale-les-derniers-chiffres-en-france/>
27. Maladie rénale chronique - Ministère de la Santé et de la Prévention. Accessed October 18, 2022. <https://solidarites-sante.gouv.fr/soins-et-maladies/maladies/article/maladie-renale-chronique>
28. Nathalie - 2021 - Guide du parcours de soins – Maladie rénale chroni.pdf. Accessed October 19, 2022. https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2021-09/guide_mrc.pdf
29. Chronic Kidney Disease in the United States, 2023. Published June 19, 2023. Accessed June 22, 2023. <https://www.cdc.gov/kidneydisease/publications-resources/ckd-national-facts.html>
30. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Lond Engl*. 2020;395(10225):709-733. doi:10.1016/S0140-6736(20)30045-3
31. Mills KT, Xu Y, Zhang W, et al. A systematic analysis of world-wide population-based data on the global burden of chronic kidney disease in 2010. *Kidney Int*. 2015;88(5):950-957. doi:10.1038/ki.2015.230
32. Kazes I, Béchade C, Lobbedez T, Couchoud C, Lassalle M. Incidence de la maladie rénale chronique stade 5 traitée par suppléance et contexte d'initiation de la dialyse. *Néphrologie Thérapeutique*. 2022;18(5, Supplement 2):18/5S-e9. doi:10.1016/S1769-7255(22)00562-4
33. Neindre CL, Bricard D, Sermet C, et al. *Atlas de l'insuffisance Rénale Chronique Terminale En France*. Institut de recherche et documentation en économie de la santé; 2018. <http://www.irdes.fr/recherche/2018/ouvrage-004-atlas-de-l-insuffisance-renale->

34. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Lond Engl.* 2018;392(10159):1736-1788. doi:10.1016/S0140-6736(18)32203-7
35. Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium, Matsushita K, van der Velde M, et al. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *Lancet Lond Engl.* 2010;375(9731):2073-2081. doi:10.1016/S0140-6736(10)60674-5
36. Gansevoort RT, Correa-Rotter R, Hemmelgarn BR, et al. Chronic kidney disease and cardiovascular risk: epidemiology, mechanisms, and prevention. *Lancet Lond Engl.* 2013;382(9889):339-352. doi:10.1016/S0140-6736(13)60595-4
37. Levey AS, Stevens LA, Coresh J. Conceptual model of CKD: applications and implications. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* 2009;53(3 Suppl 3):S4-16. doi:10.1053/j.ajkd.2008.07.048
38. Hannedouche T, Fouque D, Joly D. Complications métaboliques en insuffisance rénale chronique: hyperphosphatémie, hyperkaliémie et anémie. *Néphrologie Thérapeutique.* 2018;14(6, Supplement):6S17-6S25. doi:10.1016/S1769-7255(18)30647-3
39. Hailpern SM, Melamed ML, Cohen HW, Hostetter TH. Moderate chronic kidney disease and cognitive function in adults 20 to 59 years of age: Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Am Soc Nephrol JASN.* 2007;18(7):2205-2213. doi:10.1681/ASN.2006101165
40. James MT, Laupland KB, Tonelli M, et al. Risk of bloodstream infection in patients with chronic kidney disease not treated with dialysis. *Arch Intern Med.* 2008;168(21):2333-2339. doi:10.1001/archinte.168.21.2333
41. Levey AS, Coresh J. Chronic kidney disease. *The Lancet.* 2012;379(9811):165-180. doi:10.1016/S0140-6736(11)60178-5
42. Hallan SI, Matsushita K, Sang Y, et al. Age and Association of Kidney Measures With Mortality and End-stage Renal Disease. *JAMA.* 2012;308(22):2349-2360. doi:10.1001/jama.2012.16817
43. Tsai WC, Wu HY, Peng YS, et al. Risk Factors for Development and Progression of Chronic Kidney Disease. *Medicine (Baltimore).* 2016;95(11):e3013. doi:10.1097/MD.0000000000003013
44. L. Knight E, J. Stampfer M, E. Hankinson S, Spiegelman D, C. Curhan G. The Impact of Protein Intake on Renal Function Decline in Women with Normal Renal Function or Mild Renal Insufficiency. *Ann Intern Med.* Published online March 18, 2003. Accessed

November 15, 2022. <https://www.acpjournals.org/doi/10.7326/0003-4819-138-6-200303180-00009>

45. Babitt JL, Lin HY. Molecular mechanisms of hepcidin regulation: implications for the anemia of CKD. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* 2010;55(4):726-741. doi:10.1053/j.ajkd.2009.12.030
46. Hanna RM, Streja E, Kalantar-Zadeh K. Burden of Anemia in Chronic Kidney Disease: Beyond Erythropoietin. *Adv Ther.* 2021;38(1):52-75. doi:10.1007/s12325-020-01524-6
47. Stauffer ME, Fan T. Prevalence of anemia in chronic kidney disease in the United States. *PLoS One.* 2014;9(1):e84943. doi:10.1371/journal.pone.0084943
48. Iron Deficiency in Chronic Kidney Disease: Updates on Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment | American Society of Nephrology. Accessed October 26, 2022. <https://jasn.asnjournals.org/content/31/3/456>
49. Jean G, Chazot C. Complications et prises en charge thérapeutiques des anomalies du métabolisme phosphocalcique de l'insuffisance rénale chronique. *Néphrologie Thérapeutique.* 2019;15(4):242-258. doi:10.1016/j.nephro.2019.05.001
50. Dobre M, Yang W, Pan Q, et al. Persistent high serum bicarbonate and the risk of heart failure in patients with chronic kidney disease (CKD): A report from the Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) study. *J Am Heart Assoc.* 2015;4(4):e001599. doi:10.1161/JAHA.114.001599
51. Lemann J, Litzow JR, Lennon EJ. Studies of the mechanism by which chronic metabolic acidosis augments urinary calcium excretion in man. *J Clin Invest.* 1967;46(8):1318-1328. doi:10.1172/JCI105624
52. de Brito-Ashurst I, Varagunam M, Raftery MJ, Yaqoob MM. Bicarbonate supplementation slows progression of CKD and improves nutritional status. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2009;20(9):2075-2084. doi:10.1681/ASN.2008111205
53. Weiner DE, Tighiouart H, Elsayed EF, Griffith JL, Salem DN, Levey AS. Uric acid and incident kidney disease in the community. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2008;19(6):1204-1211. doi:10.1681/ASN.2007101075
54. Joosten H, van Eersel MEA, Gansevoort RT, Bilo HJG, Slaets JPJ, Izaks GJ. Cardiovascular risk profile and cognitive function in young, middle-aged, and elderly subjects. *Stroke.* 2013;44(6):1543-1549. doi:10.1161/STROKEAHA.111.000496
55. Liabeuf S, Pepin M, Franssen CFM, et al. Chronic kidney disease and neurological disorders: are uremic toxins the missing piece of the puzzle? *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2021;37(Suppl 2):ii33-ii44. doi:10.1093/ndt/gfab223

56. Bugnicourt JM, Godefroy O, Chillon JM, Choukroun G, Massy ZA. Cognitive disorders and dementia in CKD: the neglected kidney-brain axis. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2013;24(3):353-363. doi:10.1681/ASN.2012050536
57. Heart Disease and Stroke Statistics—2020 Update: A Report From the American Heart Association | Circulation. Accessed October 27, 2022. <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIR.0000000000000757>
58. Jankowski J, Floege J, Fliser D, Böhm M, Marx N. Cardiovascular Disease in Chronic Kidney Disease: Pathophysiological Insights and Therapeutic Options. *Circulation*. 2021;143(11):1157-1172. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.120.050686
59. Villain C, Metzger M, Combe C, et al. Prevalence of atherosomatous and non-atherosomatous cardiovascular disease by age in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2020;35(5):827-836. doi:10.1093/ndt/gfy277
60. Kidney Disease as a Risk Factor for Development of Cardiovascular Disease | Circulation. Accessed October 27, 2022. <https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/01.CIR.0000095676.90936.80>
61. Valdivielso JM, Rodríguez-Puyol D, Pascual J, et al. Atherosclerosis in Chronic Kidney Disease: More, Less, or Just Different? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019;39(10):1938-1966. doi:10.1161/ATVBAHA.119.312705
62. Tanner RM, Shimbo D, Irvin MR, et al. Chronic kidney disease and incident apparent treatment-resistant hypertension among blacks: Data from the Jackson Heart Study. *J Clin Hypertens Greenwich Conn*. 2017;19(11):1117-1124. doi:10.1111/jch.13065
63. Liabeuf S, Drüeke TB, Massy ZA. Protein-bound uremic toxins: new insight from clinical studies. *Toxins*. 2011;3(7):911-919. doi:10.3390/toxins3070911
64. Betriu A, Martinez-Alonso M, Arcidiacono MV, et al. Prevalence of subclinical atherosclerosis and associated risk factors in chronic kidney disease: the NEFRONA study. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2014;29(7):1415-1422. doi:10.1093/ndt/gfu038
65. London GM, Marchais SJ, Guerin AP, Metivier F, Adda H. Arterial structure and function in end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17(10):1713-1724. doi:10.1093/ndt/17.10.1713
66. Schwarz U, Buzello M, Ritz E, et al. Morphology of coronary atherosclerotic lesions in patients with end-stage renal failure. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2000;15(2):218-223. doi:10.1093/ndt/15.2.218
67. Herzog CA, Asinger RW, Berger AK, et al. Cardiovascular disease in chronic kidney disease. A clinical update from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO).

Kidney Int. 2011;80(6):572-586. doi:10.1038/ki.2011.223

68. Hicks KA, Mahaffey KW, Mehran R, et al. 2017 Cardiovascular and Stroke Endpoint Definitions for Clinical Trials. *Circulation.* 2018;137(9):961-972. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.033502
69. Laville SM, Couturier A, Lambert O, et al. Urea levels and cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2022;38(1):184-192. doi:10.1093/ndt/gfac045
70. Masson P, Webster AC, Hong M, Turner R, Lindley RI, Craig JC. Chronic kidney disease and the risk of stroke: a systematic review and meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2015;30(7):1162-1169. doi:10.1093/ndt/gfv009
71. Chen J, Mohler ER, Xie D, et al. Traditional and non-traditional risk factors for incident peripheral arterial disease among patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2016;31(7):1145-1151. doi:10.1093/ndt/gfv418
72. Wattanakit K, Folsom AR, Selvin E, Coresh J, Hirsch AT, Weatherley BD. Kidney function and risk of peripheral arterial disease: results from the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2007;18(2):629-636. doi:10.1681/ASN.2005111204
73. Silverberg D, Wexler D, Blum M, Schwartz D, Iaina A. The association between congestive heart failure and chronic renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2004;13(2):163-170. doi:10.1097/00041552-200403000-00004
74. Odutayo A, Wong CX, Hsiao AJ, Hopewell S, Altman DG, Emdin CA. Atrial fibrillation and risks of cardiovascular disease, renal disease, and death: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2016;354:i4482. doi:10.1136/bmj.i4482
75. Pannier B, Guérin AP, Marchais SJ, Safar ME, London GM. Stiffness of capacitive and conduit arteries: prognostic significance for end-stage renal disease patients. *Hypertens Dallas Tex 1979.* 2005;45(4):592-596. doi:10.1161/01.HYP.0000159190.71253.c3
76. Briet M, Bozec E, Laurent S, et al. Arterial stiffness and enlargement in mild-to-moderate chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2006;69(2):350-357. doi:10.1038/sj.ki.5000047
77. London GM. Arterial Stiffness in Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease. *Blood Purif.* 2018;45(1-3):154-158. doi:10.1159/000485146
78. Lee SJ, Lee IK, Jeon JH. Vascular Calcification-New Insights Into Its Mechanism. *Int J Mol Sci.* 2020;21(8):2685. doi:10.3390/ijms21082685
79. Kaya B, Paydas S, Aikimbaev K, et al. Prevalence of cardiac arrhythmia and risk factors in chronic kidney disease patients. *Saudi J Kidney Dis Transplant Off Publ Saudi Cent Organ*

Transplant Saudi Arab. 2018;29(3):567-577. doi:10.4103/1319-2442.235178

80. Bonato FOB, Canziani MEF. Ventricular arrhythmia in chronic kidney disease patients. *J Bras Nefrol.* 2017;39(2):186-195. doi:10.5935/0101-2800.20170033
81. Ozcan C. Conduction Intervals and Atrial Fibrillation in Chronic Kidney Disease. *Am J Nephrol.* 2021;52(5):354-355. doi:10.1159/000516153
82. Lim YJ, Sidor NA, Tonial NC, Che A, Urquhart BL. Uremic Toxins in the Progression of Chronic Kidney Disease and Cardiovascular Disease: Mechanisms and Therapeutic Targets. *Toxins.* 2021;13(2):142. doi:10.3390/toxins13020142
83. Duranton F, Cohen G, De Smet R, et al. Normal and Pathologic Concentrations of Uremic Toxins. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2012;23(7):1258-1270. doi:10.1681/ASN.2011121175
84. Falconi CA, Junho CV da C, Fogaça-Ruiz F, et al. Uremic Toxins: An Alarming Danger Concerning the Cardiovascular System. *Front Physiol.* 2021;12:686249. doi:10.3389/fphys.2021.686249
85. Dhondt A, Vanholder R, Van Biesen W, Lameire N. The removal of uremic toxins. *Kidney Int Suppl.* 2000;76:S47-59. doi:10.1046/j.1523-1755.2000.07606.x
86. Pieniazek A, Bernasinska-Slomczewska J, Gwozdzinski L. Uremic Toxins and Their Relation with Oxidative Stress Induced in Patients with CKD. *Int J Mol Sci.* 2021;22(12):6196. doi:10.3390/ijms22126196
87. Vanholder R, De Smet R, Glorieux G, et al. Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int.* 2003;63(5):1934-1943. doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00924.x
88. Rosner MH, Reis T, Husain-Syed F, et al. Classification of Uremic Toxins and Their Role in Kidney Failure. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN.* 2021;16(12):1918-1928. doi:10.2215/CJN.02660221
89. Graboski AL, Redinbo MR. Gut-Derived Protein-Bound Uremic Toxins. *Toxins.* 2020;12(9):590. doi:10.3390/toxins12090590
90. Vanholder R, Gryp T, Glorieux G. Urea and chronic kidney disease: the comeback of the century? (in uraemia research). *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2018;33(1):4-12. doi:10.1093/ndt/gfx039
91. Vanholder R, Pletinck A, Schepers E, Glorieux G. Biochemical and Clinical Impact of Organic Uremic Retention Solutes: A Comprehensive Update. *Toxins.* 2018;10(1):33. doi:10.3390/toxins10010033
92. Duque EJ, Elias RM, Moysés RMA. Phosphate balance during dialysis and after kidney transplantation in patients with chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.*

2022;31(4):326-331. doi:10.1097/MNH.0000000000000802

93. Luce M, Bouchara A, Pastural M, et al. Is 3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionate (CMPF) a Clinically Relevant Uremic Toxin in Haemodialysis Patients? *Toxins*. 2018;10(5):205. doi:10.3390/toxins10050205
94. Dai L, Massy ZA, Stenvinkel P, et al. The association between TMAO, CMPF, and clinical outcomes in advanced chronic kidney disease: results from the European QUALity (EQUAL) Study. *Am J Clin Nutr*. Published online September 27, 2022:nqac278. doi:10.1093/ajcn/nqac278
95. Wang Z, Zhao Y. Gut microbiota derived metabolites in cardiovascular health and disease. *Protein Cell*. 2018;9(5):416-431. doi:10.1007/s13238-018-0549-0
96. Rysz J, Franczyk B, Ławiński J, Olszewski R, Ciałkowska-Rysz A, Gluba-Brzózka A. The Impact of CKD on Uremic Toxins and Gut Microbiota. *Toxins*. 2021;13(4):252. doi:10.3390/toxins13040252
97. Sallée M, Dou L, Cerini C, Poitevin S, Brunet P, Burtey S. The aryl hydrocarbon receptor-activating effect of uremic toxins from tryptophan metabolism: a new concept to understand cardiovascular complications of chronic kidney disease. *Toxins*. 2014;6(3):934-949. doi:10.3390/toxins6030934
98. Green AR, Aronson JK, Curzon G, Woods HF. Metabolism of an oral tryptophan load. I: Effects of dose and pretreatment with tryptophan. *Br J Clin Pharmacol*. 1980;10(6):603-610.
99. Tanaka M, Vécsei L. Monitoring the kynurenine system: Concentrations, ratios or what else? *Adv Clin Exp Med Off Organ Wroclaw Med Univ*. 2021;30(8):775-778. doi:10.17219/acem/139572
100. Zakrocka I, Załuska W. Kynurene pathway in kidney diseases. *Pharmacol Rep PR*. 2022;74(1):27-39. doi:10.1007/s43440-021-00329-w
101. Massy ZA, Druke TB. Role of uremic toxins in vascular disease-the end of nihilism? *Kidney Int*. 2022;101(6):1100-1102. doi:10.1016/j.kint.2022.01.024
102. Arinze NV, Yin W, Lotfollahzadeh S, et al. Tryptophan metabolites suppress the Wnt pathway and promote adverse limb events in chronic kidney disease. *J Clin Invest*. 2022;132(1):e142260. doi:10.1172/jci142260
103. Addi T, Dou L, Burtey S. Tryptophan-Derived Uremic Toxins and Thrombosis in Chronic Kidney Disease. *Toxins*. 2018;10(10):412. doi:10.3390/toxins10100412
104. Dou L, Poitevin S, Sallée M, et al. Aryl hydrocarbon receptor is activated in patients and mice with chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2018;93(4):986-999. doi:10.1016/j.kint.2017.11.010

105. Vanholder R, Nigam SK, Burtey S, Glorieux G. What If Not All Metabolites from the Uremic Toxin Generating Pathways Are Toxic? A Hypothesis. *Toxins*. 2022;14(3):221. doi:10.3390/toxins14030221
106. Fryc J, Naumnik B. Thrombolome and Its Emerging Role in Chronic Kidney Diseases. *Toxins*. 2021;13(3):223. doi:10.3390/toxins13030223
107. Kennedy PJ, Cryan JF, Dinan TG, Clarke G. Kynurenone pathway metabolism and the microbiota-gut-brain axis. *Neuropharmacology*. 2017;112:399-412. doi:10.1016/j.neuropharm.2016.07.002
108. Paeslack N, Mimmler M, Becker S, et al. Microbiota-derived tryptophan metabolites in vascular inflammation and cardiovascular disease. *Amino Acids*. 2022;54(10):1339-1356. doi:10.1007/s00726-022-03161-5
109. Bruno G, Zaccari P, Rocco G, et al. Proton pump inhibitors and dysbiosis: Current knowledge and aspects to be clarified. *World J Gastroenterol*. 2019;25(22):2706-2719. doi:10.3748/wjg.v25.i22.2706
110. Hasan N, Yang H. Factors affecting the composition of the gut microbiota, and its modulation. *PeerJ*. 2019;7:e7502. doi:10.7717/peerj.7502
111. Gui X, Yang Z, Li MD. Effect of Cigarette Smoke on Gut Microbiota: State of Knowledge. *Front Physiol*. 2021;12:673341. doi:10.3389/fphys.2021.673341
112. Al Bander Z, Nitert MD, Mousa A, Naderpoor N. The Gut Microbiota and Inflammation: An Overview. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(20):7618. doi:10.3390/ijerph17207618
113. André C, Mernissi T, Choukroun G, et al. The Prescription of Drugs That Inhibit Organic Anion Transporters 1 or 3 Is Associated with the Plasma Accumulation of Uremic Toxins in Kidney Transplant Recipients. *Toxins*. 2021;14(1):15. doi:10.3390/toxins14010015
114. Laville SM, Metzger M, Stengel B, et al. Evaluation of the adequacy of drug prescriptions in patients with chronic kidney disease: results from the CKD-REIN cohort. *Br J Clin Pharmacol*. 2018;84(12):2811-2823. doi:10.1111/bcp.13738
115. Laville SM, Gras-Champel V, Moragny J, et al. Adverse Drug Reactions in Patients with CKD. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. 2020;15(8):1090-1102. doi:10.2215/CJN.01030120
116. Revue générale de la pharmacocinétique - Pharmacologie clinique. Édition professionnelle du Manuel MSD. Accessed October 11, 2023. <https://www.msdmanuals.com/fr/professional/pharmacologie-clinique/pharmacocin%C3%A9tique/revue-g%C3%A9n%C3%A9rale-de-la-pharmacocin%C3%A9tique>
117. Naud J, Dumayne C, Nolin TD, Leblond FA, Pichette V. Pharmacocinétique des

- médicaments en insuffisance rénale : nouveautés. *Néphrologie Thérapeutique*. 2015;11(3):144-151. doi:10.1016/j.nephro.2014.12.006
118. VanWert AL, Gionfriddo MR, Sweet DH. Organic anion transporters: discovery, pharmacology, regulation and roles in pathophysiology. *Biopharm Drug Dispos*. 2010;31(1):1-71. doi:10.1002/bdd.693
119. Neuhoff S, Gaohua L, Burt H, et al. Accounting for Transporters in Renal Clearance: Towards a Mechanistic Kidney Model (Mech KiM). In: Sugiyama Y, Steffansen B, eds. *Transporters in Drug Development: Discovery, Optimization, Clinical Study and Regulation*. AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences Series. Springer; 2013:155-177. doi:10.1007/978-1-4614-8229-1_7
120. Wu W, Bush KT, Nigam SK. Key Role for the Organic Anion Transporters, OAT1 and OAT3, in the in vivo Handling of Uremic Toxins and Solutes. *Sci Rep*. 2017;7(1):4939. doi:10.1038/s41598-017-04949-2
121. Nigam SK, Wu W, Bush KT, Hoenig MP, Blantz RC, Bhatnagar V. Handling of Drugs, Metabolites, and Uremic Toxins by Kidney Proximal Tubule Drug Transporters. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. 2015;10(11):2039-2049. doi:10.2215/CJN.02440314
122. Hsueh CH, Yoshida K, Zhao P, et al. Identification and Quantitative Assessment of Uremic Solutes as Inhibitors of Renal Organic Anion Transporters, OAT1 and OAT3. *Mol Pharm*. 2016;13(9):3130-3140. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.6b00332
123. Deguchi T, Takemoto M, Uehara N, Lindup WE, Suenaga A, Otagiri M. Renal clearance of endogenous hippurate correlates with expression levels of renal organic anion transporters in uremic rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;314(2):932-938. doi:10.1124/jpet.105.085613
124. Deguchi T, Kouno Y, Terasaki T, Takadate A, Otagiri M. Differential contributions of rOat1 (Slc22a6) and rOat3 (Slc22a8) to the in vivo renal uptake of uremic toxins in rats. *Pharm Res*. 2005;22(4):619-627. doi:10.1007/s11095-005-2486-x
125. Wikoff WR, Nagle MA, Kouznetsova VL, Tsigelny IF, Nigam SK. Untargeted metabolomics identifies enterobiome metabolites and putative uremic toxins as substrates of organic anion transporter 1 (Oat1). *J Proteome Res*. 2011;10(6):2842-2851. doi:10.1021/pr200093w
126. Nigam SK, Granados JC. OAT, OATP, and MRP Drug Transporters and the Remote Sensing and Signaling Theory. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2023;63:637-660. doi:10.1146/annurev-pharmtox-030322-084058
127. Luo SS, Yu CP, Hsieh YW, et al. Effects of antibiotics on the pharmacokinetics of indoxyl sulfate, a nephro-cardiovascular toxin. *Xenobiotica Fate Foreign Compd Biol Syst*. 2020;50(5):588-592. doi:10.1080/00498254.2019.1660433

128. Yu CP, Sweet DH, Peng YH, et al. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the renal excretion of indoxyl sulfate, a nephro-cardiovascular toxin, in rats. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci.* 2017;101:66-70. doi:10.1016/j.ejps.2017.02.007
129. Granados JC, Richelle A, Gutierrez JM, et al. Coordinate regulation of systemic and kidney tryptophan metabolism by the drug transporters OAT1 and OAT3. *J Biol Chem.* 2021;296:100575. doi:10.1016/j.jbc.2021.100575
130. Li DY, Wang Z, Jia X, et al. Loop Diuretics Inhibit Renal Excretion of Trimethylamine N-Oxide. *JACC Basic Transl Sci.* 2021;6(2):103-115. doi:10.1016/j.jacbts.2020.11.010
131. Eckardt KU, Bärthlein B, Baid-Agrawal S, et al. The German Chronic Kidney Disease (GCKD) study: design and methods. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2012;27(4):1454-1460. doi:10.1093/ndt/gfr456
132. Stengel B, Combe C, Jacquelinet C, et al. The French Chronic Kidney Disease-Renal Epidemiology and Information Network (CKD-REIN) cohort study. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2014;29(8):1500-1507. doi:10.1093/ndt/gft388
133. de Oliveira RB, Lopes AA, Sesso R, et al. The chronic kidney disease outcomes and practice patterns study Brazil (CKDopps-Brazil): design, data and methodology. *J Bras Nefrol.* 2014;36(1):96-101. doi:10.5935/0101-2800.20140016
134. Hoshino J, Nagai K, Kai H, et al. A nationwide prospective cohort study of patients with advanced chronic kidney disease in Japan: The Reach-J CKD cohort study. *Clin Exp Nephrol.* 2018;22(2):309-317. doi:10.1007/s10157-017-1453-2
135. Mariani L, Stengel B, Combe C, et al. The CKD Outcomes and Practice Patterns Study (CKDopps): Rationale and Methods. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* 2016;68(3):402-413. doi:10.1053/j.ajkd.2016.03.414
136. Stengel B, Metzger M, Combe C, et al. Risk profile, quality of life and care of patients with moderate and advanced CKD: The French CKD-REIN Cohort Study. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2019;34(2):277-286. doi:10.1093/ndt/gfy058
137. Lv JC, Zhang LX. Prevalence and Disease Burden of Chronic Kidney Disease. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1165:3-15. doi:10.1007/978-981-13-8871-2_1
138. E W, U OJ, M K, T G, J M. Uremic Toxins, Oxidative Stress, Atherosclerosis in Chronic Kidney Disease, and Kidney Transplantation. *Oxid Med Cell Longev.* 2021;2021. doi:10.1155/2021/6651367
139. Zhu H, Pan L, Dai Y, Zheng D, Cai S. Role of TLR4/MyD88 Signaling Pathway in the Occurrence and Development of Uremia-Induced Myocardial Hypertrophy and Possible Mechanism. *Evid-Based Complement Altern Med ECAM.* 2021;2021:7883643.

140. Rapa SF, Di Iorio BR, Campiglia P, Heidland A, Marzocco S. Inflammation and Oxidative Stress in Chronic Kidney Disease-Potential Therapeutic Role of Minerals, Vitamins and Plant-Derived Metabolites. *Int J Mol Sci.* 2019;21(1):263. doi:10.3390/ijms21010263
141. Gremmel T, Müller M, Steiner S, et al. Chronic kidney disease is associated with increased platelet activation and poor response to antiplatelet therapy. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2013;28(8):2116-2122. doi:10.1093/ndt/gft103
142. Folsom AR, Lutsey PL, Astor BC, et al. Chronic kidney disease and venous thromboembolism: a prospective study. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2010;25(10):3296-3301. doi:10.1093/ndt/gfq179
143. Ocak G, Verduijn M, Vossen CY, et al. Chronic kidney disease stages 1-3 increase the risk of venous thrombosis. *J Thromb Haemost JTH.* 2010;8(11):2428-2435. doi:10.1111/j.1538-7836.2010.04048.x
144. Kimura T, Morimoto T, Kozuma K, et al. Comparisons of baseline demographics, clinical presentation, and long-term outcome among patients with early, late, and very late stent thrombosis of sirolimus-eluting stents: Observations from the Registry of Stent Thrombosis for Review and Reevaluation (RESTART). *Circulation.* 2010;122(1):52-61. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.903955
145. Cohen G, Glorieux G, Thornalley P, et al. Review on uraemic toxins III: recommendations for handling uraemic retention solutes in vitro--towards a standardized approach for research on uraemia. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2007;22(12):3381-3390. doi:10.1093/ndt/gfm210
146. Muteliefu G, Enomoto A, Jiang P, Takahashi M, Niwa T. Indoxyl sulphate induces oxidative stress and the expression of osteoblast-specific proteins in vascular smooth muscle cells. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2009;24(7):2051-2058. doi:10.1093/ndt/gfn757
147. Dou L, Sallée M, Cerini C, et al. The cardiovascular effect of the uremic solute indole-3 acetic acid. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2015;26(4):876-887. doi:10.1681/ASN.2013121283
148. Watanabe H, Miyamoto Y, Enoki Y, et al. p-Cresyl sulfate, a uremic toxin, causes vascular endothelial and smooth muscle cell damages by inducing oxidative stress. *Pharmacol Res Perspect.* 2015;3(1):e00092. doi:10.1002/prp2.92
149. Di Marco GS, Hausberg M, Hillebrand U, et al. Increased inorganic phosphate induces human endothelial cell apoptosis in vitro. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008;294(6):F1381-1387. doi:10.1152/ajprenal.00003.2008
150. d'Apolito M, Colia AL, Manca E, et al. Urea Memory: Transient Cell Exposure to Urea

Causes Persistent Mitochondrial ROS Production and Endothelial Dysfunction. *Toxins*. 2018;10(10):410. doi:10.3390/toxins10100410

151. D'Apolito M, Colia AL, Lasalvia M, et al. Urea-induced ROS accelerate senescence in endothelial progenitor cells. *Atherosclerosis*. 2017;263:127-136. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2017.06.028
152. D'Apolito M, Du X, Pisanelli D, et al. Urea-induced ROS cause endothelial dysfunction in chronic renal failure. *Atherosclerosis*. 2015;239(2):393-400. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.01.034
153. Huang M, Wei R, Wang Y, Su T, Li P, Chen X. The uremic toxin hippurate promotes endothelial dysfunction via the activation of Drp1-mediated mitochondrial fission. *Redox Biol*. 2018;16:303-313. doi:10.1016/j.redox.2018.03.010
154. Schepers E, Meert N, Glorieux G, Goeman J, Van der Eycken J, Vanholder R. P-cresylsulphate, the main in vivo metabolite of p-cresol, activates leucocyte free radical production. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2007;22(2):592-596. doi:10.1093/ndt/gfl584
155. Itoh Y, Ezawa A, Kikuchi K, Tsuruta Y, Niwa T. Protein-bound uremic toxins in hemodialysis patients measured by liquid chromatography/tandem mass spectrometry and their effects on endothelial ROS production. *Anal Bioanal Chem*. 2012;403(7):1841-1850. doi:10.1007/s00216-012-5929-3
156. Shang F, Wang SC, Hsu CY, et al. MicroRNA-92a Mediates Endothelial Dysfunction in CKD. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2017;28(11):3251-3261. doi:10.1681/ASN.2016111215
157. Tumur Z, Shimizu H, Enomoto A, Miyazaki H, Niwa T. Indoxyl sulfate upregulates expression of ICAM-1 and MCP-1 by oxidative stress-induced NF-kappaB activation. *Am J Nephrol*. 2010;31(5):435-441. doi:10.1159/000299798
158. Ito S, Osaka M, Higuchi Y, Nishijima F, Ishii H, Yoshida M. Indoxyl sulfate induces leukocyte-endothelial interactions through up-regulation of E-selectin. *J Biol Chem*. 2010;285(50):38869-38875. doi:10.1074/jbc.M110.166686
159. Yamamoto H, Tsuruoka S, Ioka T, et al. Indoxyl sulfate stimulates proliferation of rat vascular smooth muscle cells. *Kidney Int*. 2006;69(10):1780-1785. doi:10.1038/sj.ki.5000340
160. Gross P, Massy ZA, Henaut L, et al. Para-cresyl sulfate acutely impairs vascular reactivity and induces vascular remodeling. *J Cell Physiol*. 2015;230(12):2927-2935. doi:10.1002/jcp.25018
161. Meijers BKI, Van Kerckhoven S, Verbeke K, et al. The uremic retention solute p-cresyl sulfate and markers of endothelial damage. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found*. 2009;54(5):891-901. doi:10.1053/j.ajkd.2009.04.022

162. Dou L, Bertrand E, Cerini C, et al. The uremic solutes p-cresol and indoxyl sulfate inhibit endothelial proliferation and wound repair. *Kidney Int.* 2004;65(2):442-451. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00399.x
163. Rahabi-Layachi H, Orouda R, Boullier A, Massy ZA, Amant C. Distinct Effects of Inorganic Phosphate on Cell Cycle and Apoptosis in Human Vascular Smooth Muscle Cells. *J Cell Physiol.* 2015;230(2):347-355. doi:10.1002/jcp.24715
164. Di Marco GS, König M, Stock C, et al. High phosphate directly affects endothelial function by downregulating annexin II. *Kidney Int.* 2013;83(2):213-222. doi:10.1038/ki.2012.300
165. Six I, Maizel J, Barreto FC, et al. Effects of phosphate on vascular function under normal conditions and influence of the uraemic state. *Cardiovasc Res.* 2012;96(1):130-139. doi:10.1093/cvr/cvs240
166. Shigematsu T, Kono T, Satoh K, et al. Phosphate overload accelerates vascular calcium deposition in end-stage renal disease patients. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2003;18 Suppl 3:iii86-89. doi:10.1093/ndt/gfg1022
167. Lee HW, Nizet V, An JN, et al. Uremic serum damages endothelium by provoking excessive neutrophil extracellular trap formation. *Sci Rep.* 2021;11(1):21439. doi:10.1038/s41598-021-00863-w
168. Maciel RAP, Cunha RS, Busato V, et al. Uremia Impacts VE-Cadherin and ZO-1 Expression in Human Endothelial Cell-to-Cell Junctions. *Toxins.* 2018;10(10):404. doi:10.3390/toxins10100404
169. Trécherel E, Godin C, Louandre C, et al. Upregulation of BAD, a pro-apoptotic protein of the BCL2 family, in vascular smooth muscle cells exposed to uremic conditions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;417(1):479-483. doi:10.1016/j.bbrc.2011.11.144
170. Sun JT, Yang K, Lu L, et al. Increased carbamylation level of HDL in end-stage renal disease: carbamylated-HDL attenuated endothelial cell function. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2016;310(6):F511-517. doi:10.1152/ajprenal.00508.2015
171. Zhang X, Li Y, Yang P, et al. Trimethylamine-N-Oxide Promotes Vascular Calcification Through Activation of NLRP3 (Nucleotide-Binding Domain, Leucine-Rich-Containing Family, Pyrin Domain-Containing-3) Inflammasome and NF- κ B (Nuclear Factor κ B) Signals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2020;40(3):751-765. doi:10.1161/ATVBAHA.119.313414
172. Ma G, Pan B, Chen Y, et al. Trimethylamine N-oxide in atherosclerosis: impairing endothelial self-repair capacity and enhancing monocyte adhesion. *Biosci Rep.* 2017;37(2):BSR20160244. doi:10.1042/BSR20160244
173. Boini KM, Hussain T, Li PL, Koka S. Trimethylamine-N-Oxide Instigates NLRP3

Inflammasome Activation and Endothelial Dysfunction. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol.* 2017;44(1):152-162. doi:10.1159/000484623

174. Sun X, Jiao X, Ma Y, et al. Trimethylamine N-oxide induces inflammation and endothelial dysfunction in human umbilical vein endothelial cells via activating ROS-TXNIP-NLRP3 inflammasome. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;481(1-2):63-70. doi:10.1016/j.bbrc.2016.11.017
175. He X, Jiang H, Gao F, Liang S, Wei M, Chen L. Indoxyl sulfate-induced calcification of vascular smooth muscle cells via the PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway. *Microsc Res Tech.* 2019;82(12):2000-2006. doi:10.1002/jemt.23369
176. Chen J, Zhang X, Zhang H, et al. Indoxyl Sulfate Enhance the Hypermethylation of Klotho and Promote the Process of Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease. *Int J Biol Sci.* 2016;12(10):1236-1246. doi:10.7150/ijbs.15195
177. Bouabdallah J, Zibara K, Issa H, et al. Endothelial cells exposed to phosphate and indoxyl sulphate promote vascular calcification through interleukin-8 secretion. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2019;34(7):1125-1134. doi:10.1093/ndt/gfy325
178. Jover E, Silvente A, Marín F, et al. Inhibition of enzymes involved in collagen cross-linking reduces vascular smooth muscle cell calcification. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2018;32(8):4459-4469. doi:10.1096/fj.201700653R
179. Zhang D, Bi X, Liu Y, et al. High Phosphate-Induced Calcification of Vascular Smooth Muscle Cells is Associated with the TLR4/NF- κ b Signaling Pathway. *Kidney Blood Press Res.* 2017;42(6):1205-1215. doi:10.1159/000485874
180. Alesutan I, Voelkl J, Feger M, et al. Involvement Of Vascular Aldosterone Synthase In Phosphate-Induced Osteogenic Transformation Of Vascular Smooth Muscle Cells. *Sci Rep.* 2017;7(1):2059. doi:10.1038/s41598-017-01882-2
181. M'Baya-Moutoula E, Louvet L, Metzinger-Le Meuth V, Massy ZA, Metzinger L. High inorganic phosphate concentration inhibits osteoclastogenesis by modulating miR-223. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1852(10 Pt A):2202-2212. doi:10.1016/j.bbadis.2015.08.003
182. Ciceri P, Elli F, Cappelletti L, et al. A new in vitro model to delay high phosphate-induced vascular calcification progression. *Mol Cell Biochem.* 2015;410(1-2):197-206. doi:10.1007/s11010-015-2552-6
183. Guerrero F, Montes de Oca A, Aguilera-Tejero E, Zafra R, Rodríguez M, López I. The effect of vitamin D derivatives on vascular calcification associated with inflammation. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2012;27(6):2206-2212. doi:10.1093/ndt/gfr555
184. Shroff RC, McNair R, Skepper JN, et al. Chronic mineral dysregulation promotes

vascular smooth muscle cell adaptation and extracellular matrix calcification. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2010;21(1):103-112. doi:10.1681/ASN.2009060640

185. Tang WH, Wang CP, Chung FM, et al. Uremic retention solute indoxyl sulfate level is associated with prolonged QTc interval in early CKD patients. *PloS One*. 2015;10(3):e0119545. doi:10.1371/journal.pone.0119545
186. Lekawanvijit S, Adrahtas A, Kelly DJ, Kompa AR, Wang BH, Krum H. Does indoxyl sulfate, a uraemic toxin, have direct effects on cardiac fibroblasts and myocytes? *Eur Heart J*. 2010;31(14):1771-1779. doi:10.1093/eurheartj/ehp574
187. Liu S, Wang BH, Kompa AR, Lekawanvijit S, Krum H. Antagonists of organic anion transporters 1 and 3 ameliorate adverse cardiac remodelling induced by uremic toxin indoxyl sulfate. *Int J Cardiol*. 2012;158(3):457-458. doi:10.1016/j.ijcard.2012.05.022
188. Lano G, Laforêt M, Von Kotze C, et al. Aryl Hydrocarbon Receptor Activation and Tissue Factor Induction by Fluid Shear Stress and Indoxyl Sulfate in Endothelial Cells. *Int J Mol Sci*. 2020;21(7):2392. doi:10.3390/ijms21072392
189. Chitalia VC, Shivanna S, Martorell J, et al. Uremic serum and solutes increase post-vascular interventional thrombotic risk through altered stability of smooth muscle cell tissue factor. *Circulation*. 2013;127(3):365-376. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.118174
190. Gondouin B, Cerini C, Dou L, et al. Indolic uremic solutes increase tissue factor production in endothelial cells by the aryl hydrocarbon receptor pathway. *Kidney Int*. 2013;84(4):733-744. doi:10.1038/ki.2013.133
191. Gao C, Ji S, Dong W, et al. Indolic uremic solutes enhance procoagulant activity of red blood cells through phosphatidylserine exposure and microparticle release. *Toxins*. 2015;7(11):4390-4403. doi:10.3390/toxins7114390
192. Nagy E, Liu Y, Prentice KJ, et al. Synthesis and Characterization of Urofuranic Acids: In Vivo Metabolism of 2-(2-Carboxyethyl)-4-methyl-5-propylfuran-3-carboxylic Acid (CMF) and Effects on in Vitro Insulin Secretion. *J Med Chem*. 2017;60(5):1860-1875. doi:10.1021/acs.jmedchem.6b01668
193. D'Apolito M, Du X, Zong H, et al. Urea-induced ROS generation causes insulin resistance in mice with chronic renal failure. *J Clin Invest*. 2010;120(1):203-213. doi:10.1172/JCI37672
194. Hung SC, Kuo KL, Huang HL, et al. Indoxyl sulfate suppresses endothelial progenitor cell-mediated neovascularization. *Kidney Int*. 2016;89(3):574-585. doi:10.1016/j.kint.2015.11.020
195. Matsumoto T, Kojima M, Takayanagi K, Taguchi K, Kobayashi T. Trimethylamine-N-oxide Specifically Impairs Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor-Type Relaxation in

Rat Femoral Artery. *Biol Pharm Bull*. 2020;43(3):569-573. doi:10.1248/bpb.b19-00957

196. Han H, Chen Y, Zhu Z, et al. p-Cresyl sulfate promotes the formation of atherosclerotic lesions and induces plaque instability by targeting vascular smooth muscle cells. *Front Med*. 2016;10(3):320-329. doi:10.1007/s11684-016-0463-x
197. Geng J, Yang C, Wang B, et al. Trimethylamine N-oxide promotes atherosclerosis via CD36-dependent MAPK/JNK pathway. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother*. 2018;97:941-947. doi:10.1016/j.biopha.2017.11.016
198. Seldin MM, Meng Y, Qi H, et al. Trimethylamine N-Oxide Promotes Vascular Inflammation Through Signaling of Mitogen-Activated Protein Kinase and Nuclear Factor- κ B. *J Am Heart Assoc*. 2016;5(2):e002767. doi:10.1161/JAHA.115.002767
199. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med*. 2013;19(5):576-585. doi:10.1038/nm.3145
200. Massy ZA, Ivanovski O, Nguyen-Khoa T, et al. Uremia accelerates both atherosclerosis and arterial calcification in apolipoprotein E knockout mice. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2005;16(1):109-116. doi:10.1681/ASN.2004060495
201. Kuo KL, Zhao JF, Huang PH, Guo BC, Tarng DC, Lee TS. Indoxyl sulfate impairs valsartan-induced neovascularization. *Redox Biol*. 2020;30:101433. doi:10.1016/j.redox.2020.101433
202. Opdebeeck B, Maudsley S, Azmi A, et al. Indoxyl Sulfate and p-Cresyl Sulfate Promote Vascular Calcification and Associate with Glucose Intolerance. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2019;30(5):751-766. doi:10.1681/ASN.2018060609
203. Muteliefu G, Shimizu H, Enomoto A, Nishijima F, Takahashi M, Niwa T. Indoxyl sulfate promotes vascular smooth muscle cell senescence with upregulation of p53, p21, and prelamin A through oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012;303(2):C126-134. doi:10.1152/ajpcell.00329.2011
204. Adijiang A, Higuchi Y, Nishijima F, Shimizu H, Niwa T. Indoxyl sulfate, a uremic toxin, promotes cell senescence in aorta of hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;399(4):637-641. doi:10.1016/j.bbrc.2010.07.130
205. Adijiang A, Goto S, Uramoto S, Nishijima F, Niwa T. Indoxyl sulphate promotes aortic calcification with expression of osteoblast-specific proteins in hypertensive rats. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2008;23(6):1892-1901. doi:10.1093/ndt/gfm861
206. Crouthamel MH, Lau WL, Leaf EM, et al. Sodium-dependent phosphate cotransporters and phosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells: redundant roles for PiT-1 and PiT-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(11):2625-2632.

207. Lau WL, Linnes M, Chu EY, et al. High phosphate feeding promotes mineral and bone abnormalities in mice with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2013;28(1):62-69. doi:10.1093/ndt/gfs333
208. El-Abbad MM, Pai AS, Leaf EM, et al. Phosphate feeding induces arterial medial calcification in uremic mice: role of serum phosphorus, fibroblast growth factor-23, and osteopontin. *Kidney Int.* 2009;75(12):1297-1307. doi:10.1038/ki.2009.83
209. Yamada S, Tokumoto M, Tatsumoto N, et al. Phosphate overload directly induces systemic inflammation and malnutrition as well as vascular calcification in uremia. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2014;306(12):F1418-1428. doi:10.1152/ajprenal.00633.2013
210. Graciolli FG, Neves KR, dos Reis LM, et al. Phosphorus overload and PTH induce aortic expression of Runx2 in experimental uraemia. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2009;24(5):1416-1421. doi:10.1093/ndt/gfn686
211. Hosaka N, Mizobuchi M, Ogata H, et al. Elastin degradation accelerates phosphate-induced mineralization of vascular smooth muscle cells. *Calcif Tissue Int.* 2009;85(6):523-529. doi:10.1007/s00223-009-9297-8
212. Yisireyili M, Shimizu H, Saito S, Enomoto A, Nishijima F, Niwa T. Indoxyl sulfate promotes cardiac fibrosis with enhanced oxidative stress in hypertensive rats. *Life Sci.* 2013;92(24-26):1180-1185. doi:10.1016/j.lfs.2013.05.008
213. Lekawanvijit S, Kompa AR, Manabe M, et al. Chronic kidney disease-induced cardiac fibrosis is ameliorated by reducing circulating levels of a non-dialysable uremic toxin, indoxyl sulfate. *PLoS One.* 2012;7(7):e41281. doi:10.1371/journal.pone.0041281
214. Chen WT, Chen YC, Hsieh MH, et al. The uremic toxin indoxyl sulfate increases pulmonary vein and atrial arrhythmogenesis. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2015;26(2):203-210. doi:10.1111/jce.12554
215. Hu MC, Shi M, Cho HJ, et al. Klotho and phosphate are modulators of pathologic uremic cardiac remodeling. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2015;26(6):1290-1302. doi:10.1681/ASN.2014050465
216. Prommer HU, Maurer J, von Websky K, et al. Chronic kidney disease induces a systemic microangiopathy, tissue hypoxia and dysfunctional angiogenesis. *Sci Rep.* 2018;8(1):5317. doi:10.1038/s41598-018-23663-1
217. Carmona AA, Rigon BG da S, Barroso MPBS, et al. Induction of systemic inflammation and thickening of subepicardiac arteries in an animal model of uremia. *J Bras Nefrol.* 2011;33(4):408-412.
218. Han H, Zhu J, Zhu Z, et al. p-Cresyl sulfate aggravates cardiac dysfunction associated

- with chronic kidney disease by enhancing apoptosis of cardiomyocytes. *J Am Heart Assoc.* 2015;4(6):e001852. doi:10.1161/JAHA.115.001852
219. Yang K, Du C, Wang X, et al. Indoxyl sulfate induces platelet hyperactivity and contributes to chronic kidney disease-associated thrombosis in mice. *Blood.* 2017;129(19):2667-2679. doi:10.1182/blood-2016-10-744060
220. Kolachalama VB, Shashar M, Alousi F, et al. Uremic Solute-Aryl Hydrocarbon Receptor-Tissue Factor Axis Associates with Thrombosis after Vascular Injury in Humans. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2018;29(3):1063-1072. doi:10.1681/ASN.2017080929
221. Zhu W, Gregory JC, Org E, et al. Gut Microbial Metabolite TMAO Enhances Platelet Hyperreactivity and Thrombosis Risk. *Cell.* 2016;165(1):111-124. doi:10.1016/j.cell.2016.02.011
222. Koppe L, Nyam E, Vivot K, et al. Urea impairs β cell glycolysis and insulin secretion in chronic kidney disease. *J Clin Invest.* 2016;126(9):3598-3612. doi:10.1172/JCI86181
223. Carracedo J, Buendía P, Merino A, et al. Cellular senescence determines endothelial cell damage induced by uremia. *Exp Gerontol.* 2013;48(8):766-773. doi:10.1016/j.exger.2013.04.004
224. Li T, Gua C, Wu B, Chen Y. Increased circulating trimethylamine N-oxide contributes to endothelial dysfunction in a rat model of chronic kidney disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;495(2):2071-2077. doi:10.1016/j.bbrc.2017.12.069
225. Koppe L, Alix PM, Croze ML, et al. p-Cresyl glucuronide is a major metabolite of p-cresol in mouse: in contrast to p-cresyl sulphate, p-cresyl glucuronide fails to promote insulin resistance. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2017;32(12):2000-2009. doi:10.1093/ndt/gfx089
226. Koppe L, Pillon NJ, Vella RE, et al. p-Cresyl sulfate promotes insulin resistance associated with CKD. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2013;24(1):88-99. doi:10.1681/ASN.2012050503
227. Fan PC, Chang JCH, Lin CN, et al. Serum indoxyl sulfate predicts adverse cardiovascular events in patients with chronic kidney disease. *J Formos Med Assoc Taiwan Yi Zhi.* 2019;118(7):1099-1106. doi:10.1016/j.jfma.2019.03.005
228. Konje VC, Rajendiran TM, Bellovich K, et al. Tryptophan levels associate with incident cardiovascular disease in chronic kidney disease. *Clin Kidney J.* 2021;14(4):1097-1105. doi:10.1093/ckj/sfaa031
229. Wu IW, Hsu KH, Hsu HJ, et al. Serum free p-cresyl sulfate levels predict cardiovascular and all-cause mortality in elderly hemodialysis patients--a prospective cohort study. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2012;27(3):1169-1175. doi:10.1093/ndt/gfr453

230. Liabeuf S, Glorieux G, Lenglet A, et al. Does p-cresylglucuronide have the same impact on mortality as other protein-bound uremic toxins? *PLoS One*. 2013;8(6):e67168. doi:10.1371/journal.pone.0067168
231. McGovern AP, de Lusignan S, van Vlymen J, et al. Serum phosphate as a risk factor for cardiovascular events in people with and without chronic kidney disease: a large community based cohort study. *PLoS One*. 2013;8(9):e74996. doi:10.1371/journal.pone.0074996
232. Kimata N, Albert JM, Akiba T, et al. Association of mineral metabolism factors with all-cause and cardiovascular mortality in hemodialysis patients: the Japan dialysis outcomes and practice patterns study. *Hemodial Int Int Symp Home Hemodial*. 2007;11(3):340-348. doi:10.1111/j.1542-4758.2007.00190.x
233. Slinin Y, Foley RN, Collins AJ. Calcium, phosphorus, parathyroid hormone, and cardiovascular disease in hemodialysis patients: the USRDS waves 1, 3, and 4 study. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2005;16(6):1788-1793. doi:10.1681/ASN.2004040275
234. Young EW, Albert JM, Satayathum S, et al. Predictors and consequences of altered mineral metabolism: the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study. *Kidney Int*. 2005;67(3):1179-1187. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00185.x
235. Block GA, Klassen PS, Lazarus JM, Ofsthun N, Lowrie EG, Chertow GM. Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2004;15(8):2208-2218. doi:10.1097/01.ASN.0000133041.27682.A2
236. Shafi T, Powe NR, Meyer TW, et al. Trimethylamine N-Oxide and Cardiovascular Events in Hemodialysis Patients. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2017;28(1):321-331. doi:10.1681/ASN.2016030374
237. Six I, Flissi N, Lenglet G, et al. Uremic Toxins and Vascular Dysfunction. *Toxins*. 2020;12(6):404. doi:10.3390/toxins12060404
238. Berg AH, Drechsler C, Wenger J, et al. Carbamylation of serum albumin as a risk factor for mortality in patients with kidney failure. *Sci Transl Med*. 2013;5(175):175ra29. doi:10.1126/scitranslmed.3005218
239. Chen Y, Zelnick LR, Huber MP, et al. Association Between Kidney Clearance of Secretory Solutes and Cardiovascular Events: The Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) Study. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found*. 2021;78(2):226-235.e1. doi:10.1053/j.ajkd.2020.12.005
240. Shafi T, Sirich TL, Meyer TW, et al. Results of the HEMO Study suggest that p-cresol sulfate and indoxyl sulfate are not associated with cardiovascular outcomes. *Kidney Int*. 2017;92(6):1484-1492. doi:10.1016/j.kint.2017.05.012
241. Menon V, Greene T, Pereira AA, et al. Relationship of phosphorus and calcium-

- phosphorus product with mortality in CKD. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* 2005;46(3):455-463. doi:10.1053/j.ajkd.2005.05.025
242. Kaysen GA, Johansen KL, Chertow GM, et al. Associations of trimethylamine-N-oxide (TMAO) with nutritional and inflammatory biomarkers and cardiovascular outcomes in patients new to dialysis. *J Ren Nutr Off J Counc Ren Nutr Natl Kidney Found.* 2015;25(4):351-356. doi:10.1053/j.jrn.2015.02.006
243. Lin CJ, Pan CF, Liu HL, et al. The role of protein-bound uremic toxins on peripheral artery disease and vascular access failure in patients on hemodialysis. *Atherosclerosis.* 2012;225(1):173-179. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2012.07.012
244. Pawlak K, Myśliwiec M, Pawlak D. Kynurenone pathway - a new link between endothelial dysfunction and carotid atherosclerosis in chronic kidney disease patients. *Adv Med Sci.* 2010;55(2):196-203. doi:10.2478/v10039-010-0015-6
245. Shafi T, Meyer TW, Hostetter TH, et al. Free Levels of Selected Organic Solutes and Cardiovascular Morbidity and Mortality in Hemodialysis Patients: Results from the Retained Organic Solutes and Clinical Outcomes (ROSCO) Investigators. *PloS One.* 2015;10(5):e0126048. doi:10.1371/journal.pone.0126048
246. Lin CJ, Liu HL, Pan CF, et al. Indoxyl sulfate predicts cardiovascular disease and renal function deterioration in advanced chronic kidney disease. *Arch Med Res.* 2012;43(6):451-456. doi:10.1016/j.arcmed.2012.08.002
247. Taki K, Tsuruta Y, Niwa T. Indoxyl sulfate and atherosclerotic risk factors in hemodialysis patients. *Am J Nephrol.* 2007;27(1):30-35. doi:10.1159/000098542
248. Lin CJ, Wu CJ, Pan CF, Chen YC, Sun FJ, Chen HH. Serum protein-bound uraemic toxins and clinical outcomes in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2010;25(11):3693-3700. doi:10.1093/ndt/gfq251
249. Poesen R, Evenepoel P, de Loor H, Kuypers D, Augustijns P, Meijers B. Metabolism, Protein Binding, and Renal Clearance of Microbiota-Derived p-Cresol in Patients with CKD. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN.* 2016;11(7):1136-1144. doi:10.2215/CJN.00160116
250. Poesen R, Claes K, Evenepoel P, et al. Microbiota-Derived Phenylacetylglutamine Associates with Overall Mortality and Cardiovascular Disease in Patients with CKD. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2016;27(11):3479-3487. doi:10.1681/ASN.2015121302
251. Wang CP, Lu LF, Yu TH, et al. Serum levels of total p-cresylsulphate are associated with angiographic coronary atherosclerosis severity in stable angina patients with early stage of renal failure. *Atherosclerosis.* 2010;211(2):579-583. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2010.03.036
252. Nakamura S, Sasaki O, Nakahama H, Inenaga T, Kawano Y. Clinical characteristics and survival in end-stage renal disease patients with arteriosclerosis obliterans. *Am J Nephrol.*

2002;22(5-6):422-428. doi:10.1159/000065267

253. Merhi B, Shireman T, Carpenter MA, et al. Serum Phosphorus and Risk of Cardiovascular Disease, All-Cause Mortality, or Graft Failure in Kidney Transplant Recipients: An Ancillary Study of the FAVORIT Trial Cohort. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* 2017;70(3):377-385. doi:10.1053/j.ajkd.2017.04.014
254. Eddington H, Hoefield R, Sinha S, et al. Serum phosphate and mortality in patients with chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN.* 2010;5(12):2251-2257. doi:10.2215/CJN.00810110
255. Kestenbaum B, Sampson JN, Rudser KD, et al. Serum phosphate levels and mortality risk among people with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2005;16(2):520-528. doi:10.1681/ASN.2004070602
256. Stubbs JR, House JA, Ocque AJ, et al. Serum Trimethylamine-N-Oxide is Elevated in CKD and Correlates with Coronary Atherosclerosis Burden. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2016;27(1):305-313. doi:10.1681/ASN.2014111063
257. Kim RB, Morse BL, Djurdjev O, et al. Advanced chronic kidney disease populations have elevated trimethylamine N-oxide levels associated with increased cardiovascular events. *Kidney Int.* 2016;89(5):1144-1152. doi:10.1016/j.kint.2016.01.014
258. Melamed ML, Plantinga L, Shafi T, et al. Retained organic solutes, patient characteristics and all-cause and cardiovascular mortality in hemodialysis: results from the retained organic solutes and clinical outcomes (ROSCO) investigators. *BMC Nephrol.* 2013;14:134. doi:10.1186/1471-2369-14-134
259. Chinnappa S, Tu YK, Yeh YC, Glorieux G, Vanholder R, Mooney A. Association between Protein-Bound Uremic Toxins and Asymptomatic Cardiac Dysfunction in Patients with Chronic Kidney Disease. *Toxins.* 2018;10(12):520. doi:10.3390/toxins10120520
260. Cao XS, Chen J, Zou JZ, et al. Association of indoxyl sulfate with heart failure among patients on hemodialysis. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN.* 2015;10(1):111-119. doi:10.2215/CJN.04730514
261. Shimazu S, Hirashiki A, Okumura T, et al. Association between indoxyl sulfate and cardiac dysfunction and prognosis in patients with dilated cardiomyopathy. *Circ J Off J Jpn Circ Soc.* 2013;77(2):390-396. doi:10.1253/circj.cj-12-0715
262. Sato B, Yoshikawa D, Ishii H, et al. Relation of plasma indoxyl sulfate levels and estimated glomerular filtration rate to left ventricular diastolic dysfunction. *Am J Cardiol.* 2013;111(5):712-716. doi:10.1016/j.amjcard.2012.11.025
263. Barreto FC, Barreto DV, Liabeuf S, et al. Serum indoxyl sulfate is associated with vascular disease and mortality in chronic kidney disease patients. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN.* 2009;4(10):1551-1558. doi:10.2215/CJN.03980609

264. Liabeuf S, Barreto DV, Barreto FC, et al. Free p-cresylsulphate is a predictor of mortality in patients at different stages of chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2010;25(4):1183-1191. doi:10.1093/ndt/gfp592
265. Yu TH, Tang WH, Lu YC, et al. Association between hippuric acid and left ventricular hypertrophy in maintenance hemodialysis patients. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2018;484:47-51. doi:10.1016/j.cca.2018.05.022
266. Petchey WG, Hawley CM, Johnson DW, Haluska BA, Watkins TW, Isbel NM. Multimodality vascular imaging in CKD: divergence of risk between measured parameters. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2012;27(3):1004-1012. doi:10.1093/ndt/gfr397
267. Adeney KL, Siscovick DS, Ix JH, et al. Association of serum phosphate with vascular and valvular calcification in moderate CKD. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2009;20(2):381-387. doi:10.1681/ASN.2008040349
268. Ketteler M, Bongartz P, Westenfeld R, et al. Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study. *Lancet Lond Engl*. 2003;361(9360):827-833. doi:10.1016/S0140-6736(03)12710-9
269. Ix JH, De Boer IH, Peralta CA, et al. Serum phosphorus concentrations and arterial stiffness among individuals with normal kidney function to moderate kidney disease in MESA. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. 2009;4(3):609-615. doi:10.2215/CJN.04100808
270. Drechsler C, Kalim S, Wenger JB, et al. Protein carbamylation is associated with heart failure and mortality in diabetic patients with end stage renal disease. *Kidney Int*. 2015;87(6):1201-1208. doi:10.1038/ki.2014.429
271. Glorieux G, Vanholder R, Van Biesen W, et al. Free p-cresyl sulfate shows the highest association with cardiovascular outcome in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2021;36(6):998-1005. doi:10.1093/ndt/gfab004
272. Scholz A, Plate KH, Reiss Y. Angiopoietin-2: a multifaceted cytokine that functions in both angiogenesis and inflammation. *Ann N Y Acad Sci*. 2015;1347:45-51. doi:10.1111/nyas.12726
273. Wang CH, Lai YH, Kuo CH, Lin YL, Tsai JP, Hsu BG. Association between Serum Indoxyl Sulfate Levels and Endothelial Function in Non-Dialysis Chronic Kidney Disease. *Toxins*. 2019;11(10):589. doi:10.3390/toxins11100589
274. Jourde-Chiche N, Dou L, Sabatier F, et al. Levels of circulating endothelial progenitor cells are related to uremic toxins and vascular injury in hemodialysis patients. *J Thromb Haemost JTH*. 2009;7(9):1576-1584. doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03540.x

275. Pawlak K, Domaniewski T, Mysliwiec M, Pawlak D. The kynurenines are associated with oxidative stress, inflammation and the prevalence of cardiovascular disease in patients with end-stage renal disease. *Atherosclerosis*. 2009;204(1):309-314. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2008.08.014
276. Pawlak K, Kowalewska A, Pawlak D, Mysliwiec M. Kynurenic Acid and Anthranilic Acid are Associated With Soluble Endothelial Adhesion Molecules and Oxidative Status in Patients With Chronic Kidney Disease. *Am J Med Sci*. 2009;338(4):293-300. doi:10.1097/MAJ.0b013e3181aa30e6
277. Pawlak K, Tankiewicz J, Mysliwiec M, Pawlak D. Tissue factor/its pathway inhibitor system and kynurenines in chronic kidney disease patients on conservative treatment. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2009;20(7):590. doi:10.1097/MBC.0b013e32832da16d
278. Pawlak K, Mysliwiec M, Pawlak D. Haemostatic system, biochemical profiles, kynurenines and the prevalence of cardiovascular disease in peritoneally dialyzed patients. *Thromb Res*. 2010;125(2):e40-45. doi:10.1016/j.thromres.2009.08.009
279. Pawlak K, Domaniewski T, Mysliwiec M, Pawlak D. Kynurenines and oxidative status are independently associated with thrombomodulin and von Willebrand factor levels in patients with end-stage renal disease. *Thromb Res*. 2009;124(4):452-457. doi:10.1016/j.thromres.2009.04.011
280. Pawlak K, Mysliwiec M, Pawlak D. Hypercoagulability is independently associated with kynurene pathway activation in dialysed uraemic patients. *Thromb Haemost*. 2009;102(1):49-55. doi:10.1160/TH08-10-0696
281. Wu CC, Hsieh MY, Hung SC, et al. Serum Indoxyl Sulfate Associates with Postangioplasty Thrombosis of Dialysis Grafts. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2016;27(4):1254-1264. doi:10.1681/ASN.2015010068
282. Laville SM, Massy ZA, Kamel S, Chillon JM, Choukroun G, Liabeuf S. Intestinal Chelators, Sorbants, and Gut-Derived Uremic Toxins. *Toxins*. 2021;13(2):91. doi:10.3390/toxins13020091
283. Loftus TJ, Filiberto AC, Ozrazgat-Baslanti T, Gopal S, Bihorac A. Cardiovascular and Renal Disease in Chronic Critical Illness. *J Clin Med*. 2021;10(8):1601. doi:10.3390/jcm10081601
284. Castro-Portuguez R, Sutphin GL. Kynurenic pathway, NAD⁺ synthesis, and mitochondrial function: Targeting tryptophan metabolism to promote longevity and healthspan. *Exp Gerontol*. 2020;132:110841. doi:10.1016/j.exger.2020.110841
285. Zuo H, Ueland PM, Ulvik A, et al. Plasma Biomarkers of Inflammation, the Kynurenic Pathway, and Risks of All-Cause, Cancer, and Cardiovascular Disease Mortality: The Hordaland Health Study. *Am J Epidemiol*. 2016;183(4):249-258. doi:10.1093/aje/kwv242

286. Dugué PA, Hodge AM, Ulvik A, et al. Association of Markers of Inflammation, the Kynurenine Pathway and B Vitamins with Age and Mortality, and a Signature of Inflammaging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2022;77(4):826-836. doi:10.1093/gerona/glab163
287. Solvang SEH, Hodge A, Watne LO, et al. Kynurenine Pathway Metabolites in the Blood and Cerebrospinal Fluid Are Associated with Human Aging. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;2022:5019752. doi:10.1155/2022/5019752
288. Mor A, Kalaska B, Pawlak D. Kynurenine Pathway in Chronic Kidney Disease: What's Old, What's New, and What's Next? *Int J Tryptophan Res IJTR*. 2020;13:1178646920954882. doi:10.1177/1178646920954882
289. Vanholder R, Glorieux G. Introduction: Uremic Toxicity - State of the Art 2014. *Semin Nephrol*. 2014;34(2):85-86. doi:10.1016/j.semephrol.2014.02.001
290. Fabresse N, Uteem I, Lamy E, Massy Z, Larabi IA, Alvarez JC. Quantification of free and protein bound uremic toxins in human serum by LC-MS/MS: Comparison of rapid equilibrium dialysis and ultrafiltration. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2020;507:228-235. doi:10.1016/j.cca.2020.04.032
291. Stengel B, Combe C, Jacquelinet C, et al. [The French Chronic Kidney Disease-Renal Epidemiology and Information Network (CKD-REIN) cohort study: To better understand chronic kidney disease]. *Nephrol Ther*. 2016;12 Suppl 1:S49-56. doi:10.1016/j.nephro.2016.01.005
292. Sumida K, Nadkarni GN, Grams ME, et al. Conversion of Urine Protein-Creatinine Ratio or Urine Dipstick Protein to Urine Albumin-Creatinine Ratio for Use in Chronic Kidney Disease Screening and Prognosis: An Individual Participant-Based Meta-analysis. *Ann Intern Med*. 2020;173(6):426-435. doi:10.7326/M20-0529
293. Suttorp MM, Siegerink B, Jager KJ, Zoccali C, Dekker FW. Graphical presentation of confounding in directed acyclic graphs. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2015;30(9):1418-1423. doi:10.1093/ndt/gfu325
294. Buuren S, Groothuis-Oudshoorn C. MICE: Multivariate Imputation by Chained Equations in R. *J Stat Softw*. 2011;45. doi:10.18637/jss.v045.i03
295. R: The R Project for Statistical Computing. Accessed December 12, 2022. <https://www.r-project.org/>
296. Lang J, Katz R, Ix JH, et al. Association of serum albumin levels with kidney function decline and incident chronic kidney disease in elders. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2018;33(6):986-992. doi:10.1093/ndt/gfx229
297. Migrone G, De Smet R, Greco AV, et al. Serum uremic toxins from patients with chronic renal failure displace the binding of L-tryptophan to human serum albumin. *Clin*

Chim Acta Int J Clin Chem. 1997;260(1):27-34. doi:10.1016/s0009-8981(96)06504-7

298. Asai H, Hirata J, Watanabe-Akanuma M. Indoxyl glucuronide, a protein-bound uremic toxin, inhibits hypoxia-inducible factor-dependent erythropoietin expression through activation of aryl hydrocarbon receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;504(2):538-544. doi:10.1016/j.bbrc.2018.09.018
299. Pawlak K, Brzosko S, Mysliwiec M, Pawlak D. Kynurenone, quinolinic acid—The new factors linked to carotid atherosclerosis in patients with end-stage renal disease. *Atherosclerosis.* 2009;204(2):561-566. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2008.10.002
300. Cheng Y, Li Y, Benkowitz P, Lamina C, Köttgen A, Sekula P. The relationship between blood metabolites of the tryptophan pathway and kidney function: a bidirectional Mendelian randomization analysis. *Sci Rep.* 2020;10(1):12675. doi:10.1038/s41598-020-69559-x
301. Melhem NJ, Taleb S. Tryptophan: From Diet to Cardiovascular Diseases. *Int J Mol Sci.* 2021;22(18):9904. doi:10.3390/ijms22189904
302. Post A, Huberts M, Poppe E, et al. Tryptophan Intake and Tryptophan Losses in Hemodialysis Patients: A Balance Study. *Nutrients.* 2019;11(12):2851. doi:10.3390/nu11122851
303. Bush KT, Singh P, Nigam SK. Gut-derived uremic toxin handling in vivo requires OAT-mediated tubular secretion in chronic kidney disease. *JCI Insight.* 2020;5(7):e133817, 133817. doi:10.1172/jci.insight.133817
304. Mihaila SM, Faria J, Stefens MFJ, et al. Drugs Commonly Applied to Kidney Patients May Compromise Renal Tubular Uremic Toxins Excretion. *Toxins.* 2020;12(6):391. doi:10.3390/toxins12060391
305. Liabeuf S, Lambert O, Metzger M, et al. Adverse outcomes of proton pump inhibitors in patients with chronic kidney disease: The CKD-REIN cohort study. *Br J Clin Pharmacol.* 2021;87(7):2967-2976. doi:10.1111/bcp.14713
306. Pauksakon P, Fogo AB. Do Proton-Pump Inhibitors Cause CKD and Progression of CKD?: COMMENTARY. *Kidney360.* 2022;3(7):1141-1143. doi:10.34067/KID.0008302021
307. Imhann F, Bonder MJ, Vich Vila A, et al. Proton pump inhibitors affect the gut microbiome. *Gut.* 2016;65(5):740-748. doi:10.1136/gutjnl-2015-310376
308. Evenepoel P, Claus D, Geypens B, et al. Evidence for impaired assimilation and increased colonic fermentation of protein, related to gastric acid suppression therapy. *Aliment Pharmacol Ther.* 1998;12(10):1011-1019. doi:10.1046/j.1365-2036.1998.00377.x
309. Chioukh R, Noel-Hudson MS, Ribes S, Fournier N, Becquemont L, Verstuyft C. Proton pump inhibitors inhibit methotrexate transport by renal basolateral organic anion

- transporter hOAT3. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem.* 2014;42(12):2041-2048. doi:10.1124/dmd.114.058529
310. Wang Y, Ren J, Sun Q, et al. Organic anion transporter 3 (OAT3)-mediated transport of dicaffeoylquinic acids and prediction of potential drug-drug interaction. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci.* 2019;133:95-103. doi:10.1016/j.ejps.2019.03.022
311. Narumi K, Sato Y, Kobayashi M, et al. Effects of proton pump inhibitors and famotidine on elimination of plasma methotrexate: Evaluation of drug-drug interactions mediated by organic anion transporter 3. *Biopharm Drug Dispos.* 2017;38(9):501-508. doi:10.1002/bdd.2091
312. Huo X, Liu K. Renal organic anion transporters in drug-drug interactions and diseases. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci.* 2018;112:8-19. doi:10.1016/j.ejps.2017.11.001
313. Santucci R, Levêque D, Lescoute A, Kemmel V, Herbrecht R. Delayed elimination of methotrexate associated with co-administration of proton pump inhibitors. *Anticancer Res.* 2010;30(9):3807-3810.
314. Ikemura K, Hamada Y, Kaya C, et al. Lansoprazole Exacerbates Pemetrexed-Mediated Hematologic Toxicity by Competitive Inhibition of Renal Basolateral Human Organic Anion Transporter 3. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem.* 2016;44(10):1543-1549. doi:10.1124/dmd.116.070722
315. Hamada Y, Ikemura K, Iwamoto T, Okuda M. Stereoselective Inhibition of Renal Basolateral Human Organic Anion Transporter 3 by Lansoprazole Enantiomers. *Pharmacology.* 2018;101(3-4):176-183. doi:10.1159/000485920
316. Burckhardt G. Drug transport by Organic Anion Transporters (OATs). *Pharmacol Ther.* 2012;136(1):106-130. doi:10.1016/j.pharmthera.2012.07.010
317. Lee HJ, Lee H, Oh SH, et al. Chronic kidney disease (CKD) patients are exposed to more proton pump inhibitor (PPI)s compared to non-CKD patients. *PLoS One.* 2018;13(9):e0203878. doi:10.1371/journal.pone.0203878
318. Forgacs I, Loganayagam A. Overprescribing proton pump inhibitors. *BMJ.* 2008;336(7634):2-3. doi:10.1136/bmj.39406.449456.BE
319. Dharmarajan TS. The Use and Misuse of Proton Pump Inhibitors: An Opportunity for Deprescribing. *J Am Med Dir Assoc.* 2021;22(1):15-22. doi:10.1016/j.jamda.2020.09.046
320. Haastrup PF, Thompson W, Søndergaard J, Jarbøl DE. Side Effects of Long-Term Proton Pump Inhibitor Use: A Review. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2018;123(2):114-121. doi:10.1111/bcpt.13023
321. Islam MM, Poly TN, Walther BA, et al. Adverse outcomes of long-term use of proton pump inhibitors: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.*

2018;30(12):1395-1405. doi:10.1097/MEG.0000000000001198

322. Xie Y, Bowe B, Yan Y, Xian H, Li T, Al-Aly Z. Estimates of all cause mortality and cause specific mortality associated with proton pump inhibitors among US veterans: cohort study. *BMJ*. 2019;365:l1580. doi:10.1136/bmj.l1580
323. Cunha RS da, Azevedo CAB, Falconi CA, et al. The Interplay between Uremic Toxins and Albumin, Membrane Transporters and Drug Interaction. *Toxins*. 2022;14(3):177. doi:10.3390/toxins14030177
324. Watanabe H, Sakaguchi Y, Sugimoto R, et al. Human organic anion transporters function as a high-capacity transporter for p-cresyl sulfate, a uremic toxin. *Clin Exp Nephrol*. 2014;18(5):814-820. doi:10.1007/s10157-013-0902-9
325. Rossi M, Johnson DW, Xu H, et al. Dietary protein-fiber ratio associates with circulating levels of indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate in chronic kidney disease patients. *Nutr Metab Cardiovasc Dis NMCD*. 2015;25(9):860-865. doi:10.1016/j.numecd.2015.03.015
326. Liabeuf S, Villain C, Massy ZA. Protein-bound toxins: has the Cinderella of uraemic toxins turned into a princess? *Clin Sci Lond Engl*. 1979. 2016;130(23):2209-2216. doi:10.1042/CS20160393
327. Koppe L, Fouque D. Microbiota and prebiotics modulation of uremic toxin generation. *Panminerva Med*. 2017;59(2):173-187. doi:10.23736/S0031-0808.16.03282-1
328. Koppe L, Soulage CO. The impact of dietary nutrient intake on gut microbiota in the progression and complications of chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2022;102(4):728-739. doi:10.1016/j.kint.2022.06.025
329. Poesen R, Mutsaers HAM, Windey K, et al. The Influence of Dietary Protein Intake on Mammalian Tryptophan and Phenolic Metabolites. *PLoS One*. 2015;10(10):e0140820. doi:10.1371/journal.pone.0140820
330. Koppe L, Soulage CO. Impact de la nutrition sur le microbiote intestinal dans la maladie rénale chronique. *Cah Nutr Diététique*. 2022;57(5):325-335. doi:10.1016/j.cnd.2022.07.005
331. Bennis Y, Cluet Y, Titeca-Beauport D, et al. The Effect of Sevelamer on Serum Levels of Gut-Derived Uremic Toxins: Results from In Vitro Experiments and A Multicenter, Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Clinical Trial. *Toxins*. 2019;11(5):279. doi:10.3390/toxins11050279
332. Lenglet A, Fabresse N, Taupin M, et al. Does the Administration of Sevelamer or Nicotinamide Modify Uremic Toxins or Endotoxemia in Chronic Hemodialysis Patients? *Drugs*. 2019;79(8):855-862. doi:10.1007/s40265-019-01118-9
333. Schulman G, Berl T, Beck GJ, et al. Randomized Placebo-Controlled EPPIC Trials of

AST-120 in CKD. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2015;26(7):1732-1746.
doi:10.1681/ASN.2014010042

334. Barba C, Benoit B, Bres E, et al. A low aromatic amino-acid diet improves renal function and prevent kidney fibrosis in mice with chronic kidney disease. *Sci Rep*. 2021;11:19184. doi:10.1038/s41598-021-98718-x
335. Watanabe Y, Koyama S, Yamashita A, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 in coronary atherosclerotic plaque enhances tissue factor expression in activated macrophages. *Res Pract Thromb Haemost*. 2018;2(4):726-735. doi:10.1002/rth2.12128
336. Marzougui H, Hammouda O, Ben Dhia I, et al. Melatonin ingestion before intradialytic exercise improves immune responses in hemodialysis patients. *Int Urol Nephrol*. 2021;53(3):553-562. doi:10.1007/s11255-020-02643-3
337. Ala M, Eftekhar SP. The Footprint of Kynurenine Pathway in Cardiovascular Diseases. *Int J Tryptophan Res IJTR*. 2022;15:11786469221096643. doi:10.1177/11786469221096643
338. Ramprasath T, Han YM, Zhang D, Yu CJ, Zou MH. Tryptophan Catabolism and Inflammation: A Novel Therapeutic Target For Aortic Diseases. *Front Immunol*. 2021;12:731701. doi:10.3389/fimmu.2021.731701
339. Stasi A, Fiorentino M, Franzin R, et al. Beneficial effects of recombinant CER-001 high-density lipoprotein infusion in sepsis: results from a bench to bedside translational research project. *BMC Med*. 2023;21(1):392. doi:10.1186/s12916-023-03057-5

ANNEXE

Review

Uremic Toxins and Cardiovascular Risk in Chronic Kidney Disease: What Have We Learned Recently beyond the Past Findings?

Carolla El Chamieh ¹, Sophie Liabeuf ^{2,3,*} and Ziad Massy ^{4,*}

¹ Center for Research in Epidemiology and Population Health (CESP), Paris-Saclay University, Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines University (UVSQ), INSERM UMRS 1018, F-94807 Villejuif, France; carolla.el-chamieh@inserm.fr

² Pharmacology Department, Amiens University Hospital, F-80000 Amiens, France

³ MP3CV Laboratory, EA7517, Jules Verne University of Picardie, F-80000 Amiens, France

⁴ Nephrology Department, Ambroise Paré University Hospital, APHP, F-92100 Paris, France

* Correspondence: liabeuf.sophie@chu-amiens.fr (S.L.); ziad.massy@aphp.fr (Z.M.)

Abstract: Patients with chronic kidney disease (CKD) have an elevated prevalence of atheromatous (ATH) and/or non-atheromatous (non-ATH) cardiovascular disease (CVD) due to an array of CKD-related risk factors, such as uremic toxins (UTs). Indeed, UTs have a major role in the emergence of a spectrum of CVDs, which constitute the leading cause of death in patients with end-stage renal disease. The European Uremic Toxin Work Group has identified over 100 UTs, more than 25 of which are dietary or gut-derived. Even though relationships between UTs and CVDs have been described in the literature, there are few reviews on the involvement of the most toxic compounds and the corresponding physiopathologic mechanisms. Here, we review the scientific literature on the dietary and gut-derived UTs with the greatest toxicity *in vitro* and *in vivo*. A better understanding of these toxins' roles in the elevated prevalence of CVDs among CKD patients might facilitate the development of targeted treatments. Hence, we review (i) ATH and non-ATH CVDs and the respective levels of risk in patients with CKD and (ii) the mechanisms that underlie the influence of dietary and gut-derived UTs on CVDs.



Citation: El Chamieh, C.; Liabeuf, S.; Massy, Z. Uremic Toxins and Cardiovascular Risk in Chronic Kidney Disease: What Have We Learned Recently beyond the Past Findings? *Toxins* **2022**, *14*, 280. <https://doi.org/10.3390/toxins14040280>

Received: 19 March 2022

Accepted: 11 April 2022

Published: 14 April 2022

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



Copyright: © 2022 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/>).

1. Introduction

With an estimated prevalence between 8% and 16%, chronic kidney disease (CKD) is a growing worldwide public health problem [1]. The Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) initiative has defined CKD as a decrease in kidney function for at least 3 months, referring a glomerular filtration rate (GFR) below 60 mL/min or an albumin-to-creatinine ratio above 30 mg/g (3.4 mg/mmol) [2]. Renal impairment has been directly linked to high rates of morbidity and mortality in general [3] and cardiovascular morbidity and mortality in particular [4,5]. In fact, CKD increases the risk of cardiovascular disease (CVD) by a factor of two to four [6], making them the leading cause of death in long-standing CKD patients [4]. In adults, CKD is associated with both atheromatous (ATH) CVDs (such as myocardial infarction (MI) and stroke) and non-atheromatous (non-ATH) CVDs (such as heart failure and atrial fibrillation) [7].

This increased risk of CVD is multifactorial given the combination of both, traditional cardiovascular risk factors that are often found as comorbidities in patients with CKD (e.g.,

hypertension, diabetes mellitus (DM), dyslipidemia, advanced age, male sex, smoking, high body mass index) and non-traditional cardiovascular risk factors, known as CKD-related risk factors (such as high albuminuria and uremic toxins' (UTs) accumulation) [8,9].

UTs are defined by harmful solutes accumulated in the body when the kidneys' filtration capabilities are gradually lost, whereas they normally should be excreted by healthy kidneys [4,10,11]. They originate from endogenous metabolism, microbial metabolism, or exogenous intake. In 2021, the European Uremic Toxin Work Group (EUTOx) identified over 100 UTs, including more than 25 dietary and gut-derived compounds [12,13]. Based on their molecular weight and protein-binding ability, UTs are commonly classified into three categories: free water-soluble, low-molecular-weight solutes (<500 Da), water-soluble middle molecules (>500 Da), and protein-bound solutes [12,14]. In December 2021, Rosner et al. suggested a novel six-category classification of UTs [11]: small protein-bound molecules (<500 Da), small water-soluble molecules (<500 Da), small-middle molecules (500–15,000 Da), medium-middle molecules (>15,000–25,000 Da), large-middle molecules (>25,000–58,000 Da), and large molecules (>58,000 Da). This more holistic classification included the UTs' physicochemical characteristics and their correlations with clinical symptoms and outcomes; however, Rosner et al.'s classification has some limitations and has not yet been validated [11].

Dietary metabolites (such as 3-carboxy-4-ethyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid (CMPF), phosphate, and urea) are known to be strongly associated with cardiovascular events [15,16]. Phosphate's impact on CVDs does not occur independently: Phosphate has a direct effect on vascular smooth muscle cells (VSMCs) through the complex calcium/phosphate and an indirect effect via the fibroblast growth factor 23 (FGF23)/Klotho and PTH axes [17]. The gut microbiota metabolizes many dietary compounds, although most of the resulting metabolites are excreted by the kidneys in healthy individuals [18]. Subsequently, any disruption of the intestinal microbial composition, as seen in patients with CKD, will generate harmful metabolites [13]. Here, we only review data on the UTs with the greatest toxicity in vitro and in vivo [16]: indoles (indoxylo sulfate (IS), indole-3-acetic acid (IAA), kynureneine, and kynurenic acid (KA)), phenols (p-cresyl sulfate (PCS), p-cresyl glucuronide (PCG), and phenylacetylglutamine (PAG)), hippurates (hippuric acid (HA)), and others (CMPF, phosphate, urea, trimethylamine N-oxide (TMAO)). As illustrated in Figure 1, the accumulation of these UTs has been implicated directly or indirectly in a spectrum of ATH and non-ATH CVDs [19].

Previous reviews described the endogenously generated UTs (such as β -2 microglobulin, interleukins, and other inflammatory markers), we aimed in the present narrative review to focus on the most toxic dietary and gut-derived compounds. Here, we review research published between 2002 and 2022 by (i) defining the various ATH and non-ATH CVDs and the associated risks in patients with CKD (ii) and listing the various mechanisms that underlie the influence of dietary and gut-derived UTs on the CVD risk.

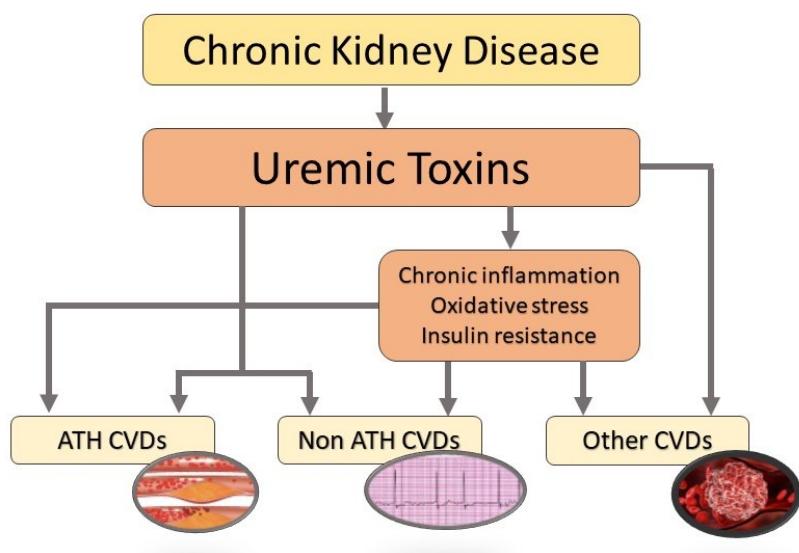


Figure 1. Schematic description of the effects of uremic toxins on cardiovascular diseases in a CKD setting. ATH, atheromatous; CVDs, cardiovascular diseases.

2. Cardiovascular Diseases

The elevated incidence and prevalence of CVD is due to many conventional and non-conventional risk factors, of which CKD is the major non-modifiable one [20]. The prevalence of CVD is higher in patients with CKD than in healthy individuals, and the cardiovascular mortality rate is 10 to 30 times higher in dialysis patients than in the general population [21]. This elevated risk can be ascribed to the combination of conventional cardiovascular risk factors with those related directly to CKD such as oxidative stress, chronic inflammation, vascular calcification, and UTs [8,20,22]. According to Jankowski et al. [22], “CKD mimics accelerated aging of the cardiovascular system”.

In physiopathologic terms, CVDs can be classified as ATH or non-ATH [6] that are both highly prevalent in patients with CKD [8].

2.1. Atheromatous Cardiovascular Diseases

ATH CVD is characterized by the presence of occlusive lesions and plaques (called atheromas) inside the arterial wall; the aorta and the coronary arteries are primarily affected [23]. Atheromas in patients with CKD are mainly characterized by important thickening of the intima media [20,24]. According to the KDIGO [25] and the Cardiovascular Stroke Endpoint Definitions for Clinical Trials [26], ATH CVDs include stroke or MI (whether fatal or not) and hospitalization for silent ischemia, unstable angina, transient ischemic attacks, intrastent thrombosis, peripheral artery disease (PAD), percutaneous coronary interventions or coronary artery bypass grafts, vascular surgery, amputation, and revascularization for coronary artery disease (CAD) or PAD. Furthermore, PAD can be defined as a history of amputation, angioplasty, or lower limb bypass prompted by ATH distal ischemic lesions [8,27].

The prevalence of atherosclerotic CVD is higher in patients with moderate CKD than in healthy individuals, and atherosclerosis progression is strongly linked to the worsening of CKD [28]. The incidence of fatal MI was higher in dialysis patients than in the general population [20]. The results of observational studies have shown that the stroke risk increases with declining GFR [28,29], and that CKD is associated with a higher risk of PAD [30,31].

2.2. Non-Atheromatous Cardiovascular Diseases

Non-ATH CVD encompasses other types of CVD, including sudden cardiac death or death from heart failure (without a history of CAD), hospitalization for heart failure (again

with no history of CAD), cardiac fibrosis, atrial fibrillation or other arrhythmia disorders, diastolic dysfunction, arterial stiffness, cardiomyocytes hypertrophy, vascular calcification, or valvular heart disease [8,27,32]. Prior cohorts concluded that the prevalence of heart failure increased markedly with CKD progression and affected 65 to 70% of patients with end-stage renal disease (ESRD) [33]. Patients with CKD had a significantly higher aortic pulse wave velocity [34]. The higher the CKD stage, the greater the risk of arterial stiffness [35]—the most prevalent arterial modification being in patients with CKD [36]. Arterial stiffness reflects vascular calcification [37], and both variables are independent predictors of CVD mortality [38]. Vascular calcification is mainly associated with low vessel elasticity [39], and medial artery calcification is the most common vascular calcification in patients with CKD [38]. Various studies have reported that CKD is a risk factor for cardiac arrhythmia [40,41]. Although atrial fibrillation represents the most prevalent type of arrhythmia, ventricular disorders are the most lethal [40,42]. For example, ventricular tachyarrhythmia accounted for 79% of cardiac arrests recorded in a study of hemodialysis (HD) patients [42].

In summary, CKD contributes significantly to severe non-ATH CVDs [33].

2.3. Other than Atheromatous and Non Atheromatous Cardiovascular Diseases

We also included cardiovascular complications that are neither ATH CVDs nor non-ATH CVDs (referred to hereafter as “other than ATH and non-ATH CVDs”). This group includes platelet aggregation, thrombus formation, and endothelial cell (EC) dysfunction. Many studies have characterized the vascular damage caused by CKD. It is well known that CKD progression is closely associated with levels of oxidative stress and inflammation, which enhance cardiovascular damage and mortality [43]. Numerous studies have also demonstrated that CKD is associated with significantly increased platelet activation [44,45], and with the risk of both venous and arterial thrombosis [46,47]. Patients with CKD frequently undergo endovascular procedures; the risk of post-angioplasty thrombosis or vascular access thrombosis is elevated in this high-risk population [48], and makes CKD the second-ranked risk factor for post-procedural complications [48,49].

3. Uremic Toxins and Risk for Cardiovascular Diseases

Some UTs markedly increase the relative risk of CVD in the CKD population. Many in vitro, in vivo, and observational studies have concluded for the impact of dietary and gut-derived UTs on adverse cardiac risk. We systematically searched the literature (the PubMed database, up until 28 February 2022) for publications on the relationship between UTs and CVDs in patients with CKD, by combining the following keywords: (“Chronic kidney disease” OR “renal impairment” OR “kidney disease” OR “chronic kidney failure” OR “chronic renal failure”) AND (“Cardiovascular disease” OR “vascular calcification” OR “oxidative stress” OR “coronary artery disease” OR “atherosclerosis” OR “peripheral artery disease” OR “cardiovascular damage” OR “Cardiovascular Diseases” [Mesh] OR “arrythmia” OR “stroke” OR “cardiovascular death” OR “myocardial infarction”) AND (“uremic toxin*” OR “uremic retention solute*” OR “cardiovascular toxin*” OR “indoxylo sulfate” OR “p-Cresyl sulfate” OR “p-cresyl glucuronide” OR “indole-3-acetic acid” OR “hippuric acid” OR “kynurenic acid” OR “kynurenine” OR “3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid” OR “Phenylacetylglutamine” OR “trimethylamine N-oxide”) AND (“in vivo” OR “in vitro” OR “animal*”) NOT “hemodialysis” NOT “peritoneal dialysis” NOT “dialysis”). A total of 262 articles were analyzed. We excluded 9 studies on pediatric patients, 25 reviews, and 15 studies investigating other UTs than the dietary and gut-derived ones included in the present review. A total of 213 original articles were selected.

3.1. Experimental Data: In Vitro Studies

Table 1 summarizes the in vitro studies of the UTs’ impact on CVDs in a CKD setting.

Recent results have demonstrated that UTs contribute to CVDs in CKD patients through a variety of mechanisms, the most significant of which are endothelial dysfunction and vascular calcification caused mostly by oxidative stress and inflammation. For

example, a recent study of primary human dermal microvascular ECs by Arinze et al. [50] showed that tryptophan-derived indoles (IS, kynurenine, and KA) were associated with the worsening of PAD. The UTs decreased Wnt/ β -catenin activity, causing EC dysfunction and impaired angiogenesis.

Studies in different in vitro models found that IS, IAA, PCS, phosphate, and urea induced oxidative stress by increasing reactive oxygen species (ROS) production [51–57] or by activating leukocyte free radical production [58], thus contributing to endothelial dysfunction and apoptosis. Itoh et al. [59] reported that IS induced ROS production in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) more intensely than CMPF did. HA and phosphate caused EC apoptosis by disrupting the mitochondrial membrane through increased production of ROS and Drp1 protein [54,60].

Shang et al. [61] concluded that IS, IAA, and HA increased levels of miR-92a, a microRNA induced by oxidative stress in ECs and which is involved in atherosclerosis. Furthermore, IS was involved in the pathophysiology of atherosclerosis by increasing the expression of the adhesion molecules intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, monocyte chemotactic protein-1, and e-selectin [62,63], and activating the p42/44 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway and thus vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation [64].

Experiments on HUVECs demonstrated that PCS had a damaging effect on ECs by (i) directly stimulating the Rho-associated protein kinase [65], (ii) enhancing NADPH oxidase expression and ROS production [53], (iii) inducing the shedding of endothelial microparticles [66], and (iv) inhibiting (along with IS) endothelial proliferation and wound repair [67]. Phosphate (the UT most intensively studied in vitro) also damages ECs. Phosphate overloads blocked G1/S progression, reducing EC proliferation [68]. Moreover, phosphate overload decreased annexin II expression and stiffened ECs [69]. In experiments on aortic rings, excess of phosphate caused vasoconstriction, increased phenylephrine-induced contraction, and lowered acetylcholine-induced relaxation [70]. Furthermore, high phosphate levels accelerated calcium deposition on arteriole walls and decreased vasorelaxation and nitric oxide (NO) production in human vascular smooth muscle cells (HVSMEs), leading to vasoconstriction [71]. Similarly, urea disrupted ECs either via a direct effect on the cells or indirectly via protein carbamylation. Urea prompted the formation of excessive neutrophil extracellular trap in HUVECs [72], altered cell-to-cell junctions in an immortalized human EC line [73], induced Associated Agonist Of Cell Death (BAD) protein expression [74], and inhibited glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and Prostacyclin (PGI2) synthase (thus facilitating the activation of pro-atherosclerotic pathways) [57]. It is also noteworthy that high urea levels were associated with elevated mitochondrial ROS production in arterial ECs even after dialysis—suggesting that there is a “cellular memory” for urea-induced oxidative stress [55]. In terms of an indirect effect, urea levels were positively correlated with high-density lipoprotein (HDL) carbamylation, which then inhibited endothelial repair functions [75]. TMAO had the same endothelial effect in various models. It activated the nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing-3 (NLRP3) inflammasome and nuclear factor-kappa B (NF- κ B) signals, promoted leukocyte-EC adhesion, EC dysfunction, and vascular calcification and thus helped to enhance atherosclerosis processes [76–79].

Vascular calcification happens in various ways. Studies of human aortic smooth muscle cells (HASMCs) showed that IS induced aortic calcification by activating the NF- κ B signaling pathway [80], decreasing Klotho expression [81], and inducing ROS generation and the expression of NADPH oxidases (Nox1, Nox2, and Nox4), core binding factor 1, alkaline phosphatase, and osteopontin [51]. In Bouabdallah et al.’s study [82] of HUVECs and HASMCs, IS and phosphate induced the secretion of interleukin-8 from ECs and thus the promotion of vascular calcification. In addition, phosphate promoted extracellular matrix calcification and upregulated osteoblast marker expression by VSMCs [83]. High phosphate levels activated toll-like receptor 4 (TLR4)/NF- κ B signaling [84] and upregulated aldosterone synthase expression, which induced VSMCs osteogenic transdifferentiation

and calcification [85]. In an in vitro study of peripheral blood mononuclear cells, phosphate modulated miR-223 expression and decreased osteoclastogenesis [86]. Similarly, phosphate caused osteoblastic differentiation in VSMCs [87], reduced perlecan expression in rat aortic rings (ex vivo) and HVSMECs, and induced BMP-2 (involved in osteogenic transdifferentiation pathways) [88]. Lastly, phosphate mediated vascular calcification by increasing alkaline phosphatase activity in VSMCs [89].

It has been reported that IS contributes to CVD through associations with arrhythmia, cardiac hypertrophy, and fibrosis. The toxin's arrhythmogenic effect was evaluated in embryonic rat cardiomyocytes: IS inhibited the inward rectifier potassium ion channel—prolonging the action potential and the QT interval and inducing early after depolarization [90]. Lekawanvijit et al. [91] demonstrated the fibrotic effect of IS for the first time; this was later confirmed by Liu et al. [92]. IS exerted pro-fibrotic, pro-hypertrophic, and pro-inflammatory effects by activating MAPK and NF- κ B pathways [91]. Furthermore, IS increased collagen synthesis in neonatal rat cardiac fibroblasts, promoted myocyte hypertrophy, and stimulated tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 expression [91]. In rats, cardiomyocytes took up IS the organic anion transporters (OATs) 1 and 3, which led to the activation of the NF- κ B and MAPK pathways and favored cardiac hypertrophy and fibrosis [92].

Indoles are also known to have a prothrombotic effect. IS and IAA activated the aryl hydrocarbon receptor (AHR), which led to an increase in tissue factor (TF) expression [93–95]. Gao et al. [96] demonstrated that IS and IAA caused red blood cell damage, which might lead to thrombus formation.

UTs also have indirect effects on CVD. In particular, CMPF inhibited insulin secretion [97], and urea increased the expression of the adipokines retinol binding protein 4 and resistin [98].

Most of the following in vitro studies added human serum albumin (HSA) to the protein-bound UT to reflect their natural protein-bound state in uremia. This addition should be considered in such a context and, most importantly, while interpreting the results in order to reflect their actual clinical effects [99].

Table 1. In vitro studies of the effects of UTs on cardiovascular complications.

First Author, Year	Models	UT(s) Studied	Main Findings
Arinze [50], 2022	Primary human dermal microvascular ECs	IS Kynurenone KA	IS, kynurenone, and KA decreased Wnt/ β -catenin activity, which causes EC dysfunction and impairs angiogenesis.
Lano [93], 2020	HUVECs	IS	IS had a prothrombotic effect by increasing TF expression in ECs and peripheral blood mononuclear cells via AHR activation.
He [80], 2019 Chen [81], 2016 Tang [90], 2015	HASMCs HASMCs Embryonic rat heart-derived cardiac H9c2 cells	IS IS IS	IS induced calcification of HASMCs via the NF- κ B signaling pathway. IS decreased Klotho expression, promoting aortic calcification. IS has a role in arrhythmogenesis: IS inhibited the inward rectifier potassium ion channels function, resulting in a prolonged QT interval.
Chitalia [94], 2013	HVSMECs	IS	IS increased TF expression and decreased TF ubiquitination, leading to a thrombogenic milieu.
Liu [92], 2012	Neonatal cardiac myocytes and fibroblasts from Sprague–Dawley rats	IS	IS was taken up by cardiomyocytes through OAT-1 and -3, leading to activation of the NF- κ B and MAPK pathways that are involved in cardiac hypertrophy and fibrosis.
Lekawanvijit [91], 2010	Isolated NCMs, NCFs and THP-1	IS	IS has a role in harmful cardiac remodeling: it has pro-fibrotic, pro-hypertrophic, and pro-inflammatory effects via the activation of MAPK and NF- κ B pathways.
Tumur [62], 2010 and Ito [63], 2010	HUVECs	IS	IS increased the expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, MCP-1, and e-selectin, all of which are involved in the pathophysiology of atherosclerosis.
Muteliefu [51], 2009	HASMCs	IS	IS induced ROS generation and the expression of Nox4, Cbfa1, ALP, and osteopontin in VSMCs.
Yamamoto [64], 2006	VSMCs were isolated from the aortas of male Sprague–Dawley rats	IS	IS caused VSMC proliferation via activation of the p42/44 MAPK pathway, a mechanism involved in the progression of atherosclerotic lesions.
Dou [52], 2015	Cultured human endothelial cells	IAA	IAA activated the inflammatory AHR/p38MAPK/NF- κ B pathway and increased the production of endothelial ROS.
Gao [96], 2015	RBC from peripheral vein blood of eight healthy volunteers	IAA IS	IS and IAA caused RBC damage, which is involved in thrombus formation.
Gondouin [95], 2013 Gross [65], 2015	HUVECs HUVECs and HVSMECs	IAA PCS	IAA increased TF expression resulting in a prothrombotic effect. PCS directly stimulated the Rho-associated protein kinase, which is involved in vascular dysfunction and vascular remodeling.

Table 1. Cont.

First Author, Year	Models	UT(s) Studied	Main Findings
Watanabe [53], 2015 Meijers [66], 2009	HUVECs HUVECs	PCS PCS	PCS enhanced ROS production and NADPH oxidase expression. PCS induced shedding of endothelial microparticles, causing endothelial dysfunction.
Schepers [58], 2007	Blood from healthy donors incubated in the presence of PCS	PCS	The presence of PCS activated pro-inflammatory leukocyte free radical production.
Dou [67], 2004	HUVECs	PCS IS	Both PCS and IS inhibited endothelial proliferation and wound repair.
Huang [60], 2018	Human aortic endothelial cells	HA	HA contributed to mitochondrial fission by activating mitochondrial ROS production and Drp1 protein expression.
Shang [61], 2017	HUVECs	HA IS IAA	HA, IS, and IAA increased miR-92a levels, which impairs EC function.
Nagy [97], 2017	Human islets of Langerhans from healthy donors	CMPF	CMPF inhibited insulin secretion.
Itoh [59], 2012	HUVECs	CMPF IS	IS induced ROS production more intensely than CMPF did.
Bouabdallah [82], 2019	HUVECs and HASMCs	Phosphate IS	Phosphate and IS induced the secretion of interleukin-8 from ECs, which is involved in VSMC calcification.
Jover [83], 2018	VSMCs	Phosphate	High phosphate promoted extracellular matrix calcification and upregulated osteoblast markers.
Zhang [84], 2017	HASMCs	Phosphate	High phosphate induced vascular calcification via the activation of TLR4/NF- κ B signaling.
Alesutan [85], 2017	HASMCs	Phosphate	Hyperphosphatemia upregulated aldosterone synthase expression, inducing VSMCs osteogenic transdifferentiation and calcification.
Rahabi-Layachi [68], 2015	HASMCs	Phosphate	Phosphate induced apoptosis and cell cycle arrest by blocking G1/S progression, thus reducing HASMCs proliferation.
M'Baya-Moutoula [86], 2015	Peripheral blood mononuclear cells	Phosphate	Phosphate caused vascular calcification by modulating miR-223 and decreasing osteoclastogenesis.
Ciceri [87], 2015	VSMCs	Phosphate	Phosphate caused VSMC osteoblastic differentiation and led to cell calcification.
Di Marco [69], 2013 Six [70], 2012	Human coronary artery ECs HUVECs	Phosphate Phosphate	Hyperphosphatemia decreased annexin II expression and stiffened ECs. Phosphate exhibited a direct vasoconstrictor effect on aortic rings, increased phenylephrine-induced contraction, and lowered acetylcholine-induced relaxation—leading to endothelial dysfunction.
Guerrero [88], 2012	Rat aortic rings and HVSMCs	Phosphate	Phosphate reduced expression of perlecan and induced BMP-2, which is involved in the osteogenic transdifferentiation pathways and would promote cells calcification.
Shroff [89], 2010	VSMCs	Phosphate	Phosphate increased alkaline phosphatase activity and mediated calcification.
Di Marco [54], 2008	HUVECs	Phosphate	Hyperphosphatemia caused EC apoptosis by increasing ROS generation and disrupting the mitochondrial membrane potential.
Shigematsu [71], 2003	HVSMCs	Phosphate	Phosphate overload accelerated calcium deposition on arteriole walls. Moreover, phosphate led to vasoconstriction, decreased vasorelaxation, decreased NO production, stimulated ROS production, and induced ECs apoptosis.
Lee [72], 2021	HUVECs	Urea	Urea led to excessive neutrophil extracellular trap formation and thus EC dysfunction.
Maciel [73], 2018 D'Apolito [55], 2018	An immortalized human EC line Human arterial ECs	Urea Urea	Urea altered cell-to-cell junctions, leading to greater endothelial damage. Abnormal high urea levels had long-lasting effects on arterial cells: urea increased mitochondrial ROS production in arterial ECs even after dialysis, which typically promotes endothelial dysfunction.
D'Apolito [56], 2017	Human endothelial progenitor cell	Urea	Urea caused ROS production and accelerated endothelial progenitor cell senescence.
Sun [75], 2016	Human arterial EC	Urea	Urea levels were positively correlated with HDL carbamylation, which inhibited endothelial repair functions.
D'Apolito [57], 2015	Human aortic ECs	Urea	Urea increased mitochondrial ROS production and inhibited GAPDH, which leads to the activation of the endothelial pro-inflammatory pathway. Furthermore, urea inactivated the anti-atherosclerosis enzyme PG12 synthase.
Trécherel [74], 2012	HASMCs	Urea	Urea induced BAD protein expression, sensitizing the HASMCs to apoptosis.
D'Apolito [98], 2010	3T3-L1 adipocytes treated with urea	Urea	Urea increased ROS levels and expression of the adipokines retinol binding protein 4 and resistin.
Zhang [76], 2020	Aortic VSMCs from male “Sprague Dawley” rats and human VSMCs	TMAO	TMAO promoted vascular calcification through activation of the NLRP3 inflammasome and NF- κ B signals.
Ma [77], 2017	HUVECs	TMAO	HUVECs showed impairment in cellular proliferation, and TMAO induced NF- κ B signaling pathway, increasing vascular inflammatory signals and EC dysfunction.

Table 1. Cont.

First Author, Year	Models	UT(s) Studied	Main Findings
Boini [78], 2017	Mouse carotid artery ECs	TMAO	TMAO activated NLRP3 inflammasomes, causing endothelial dysfunction.
Sun [79], 2016	HUVECs	TMAO	TMAO activated NLRP3 inflammasomes, causing endothelial dysfunction.

Abbreviations: AHR: aryl hydrocarbon receptor; ALP: alkaline phosphatase; Cbfa1: core binding factor 1; CMPF: 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid; CVD: cardiovascular disease; Drp: dynamin-related protein; ECs: endothelial cells; eNOS: endothelial nitric oxide synthase; ENPP1: ectonucleotide pyrophosphate/phosphodiesterase 1; GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; HA: hippuric acid; HASMC: human aortic smooth muscle cell; HDL: high-density lipoprotein; HUVECs: human umbilical vein endothelial cells; HVSMC: human vascular smooth muscle cell; IAA: indole-3-acetic acid; ICAM-1: intercellular adhesion molecule-1; IS: indoxyl sulfate; KA: kynurenic acid; MAPK: mitogen-activated protein kinase; MCP-1: monocyte chemotactic protein-1; NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NCM: neonatal rat cardiac myocyte; NCF: neonatal rat cardiac fibroblast; NF- κ B: nuclear factor- κ B; NLRP3: nucleotide-binding domain, leucine-rich containing family, pyrin domain-containing-3; NO: nitric oxide; PCS: para-cresyl sulfate; RBC: red blood cell; ROS: reactive oxygen species; TF: tissue factor; THP-1: human leukemia monocytic cell line; TLR4: toll-like receptor 4; TMAO: trimethylamine-N-oxide; UT: uremic toxin; VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1; VSMC: vascular smooth muscle cells.

3.2. Experimental Data: Animal Studies

Animal studies investigating the UTs' impact on ATH or non-ATH CVDs are summarized in Table 2.

3.2.1. Atheromatous Cardiovascular Diseases

Arinze et al. [50,100] also recently studied the effect of tryptophan-derived indoles on PAD in adenine-induced CKD and IS solute-specific C57BL/6 mouse models [50]. IS, kynurene, and KA increased AHR activity, resulting in the suppression of Wnt/ β -catenin signaling. This phenomenon led to impaired angiogenesis and caused hindlimb ischemia. This complication of PAD was also observed by Hung et al. [101], who concluded that IS caused PAD by decreasing the mobilization of endothelial progenitor cell and impairing neovascularization. TMAO was also found to engender PAD by impairing endothelium-derived, hyperpolarizing factor-type relaxation [102]. The results of in vivo studies suggest that PCS, HA, urea, and TMAO contribute to the acceleration of atherosclerosis. In a study of five of six nephrectomized apoE $-/-$ mice, Han et al. [103] showed that PCS induced VSMC migration and proliferation and disturbed the balance between matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases within plaques. Huang et al. [60] and Shang et al. [61] added to their in vitro findings by studying HA's role in atherosclerosis induction in animal models. HA induced oxidative stress, led to endothelial dysfunction, impaired endothelium-dependent vasodilation [60], and induced miR-92a (involved in the angiogenic process) [61]. Recent studies have found that TMAO is also involved in atherosclerosis induction. The compound activated the expression of components of the CD36/MAPK/JNK and NF- κ B signaling pathways [104,105], which promoted foam cell formation [104] and vascular inflammation [105]. Moreover, Koeth et al. [106] showed that TMAO was linked to major cardiac events—mainly MI and stroke. Massy et al. confirmed the role of urea [107] and concluded that the compound aggravated atherosclerosis by promoting arterial calcification.

3.2.2. Non-Atheromatous Cardiovascular Diseases

IS, PCS, phosphate, and urea also promote non-ATH CVDs in general and vascular calcification in particular. IS and PCS induced severe calcification of the aorta and peripheral arteries: IS decreased NO production and increased endothelial nitric oxide synthase (eNOS) phosphorylation [108], and both IS and PCS activated the inflammation and coagulation pathways [109]. According to Chen et al. [81], IS promoted aortic calcification by decreasing Klotho expression. Moreover, Muteliefu et al. [110] and Adijiang et al. [111,112] showed that IS accelerated wall thickening and vascular calcification through the upregulation of p16, p21, p53, prelamin A, and osteoblast-specific protein, which induced VSMC senescence. Phosphate also generated VSMCs calcification [113] and was associated with ar-

terial medial calcification [114,115]. Phosphate overload increased the expression of Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α), osteochondrogenic markers [116], and aortic runt-related transcription factor 2 [117], which induced systemic inflammation and VSMC calcification. In 5/6 nephrectomized male Sprague–Dawley rats, high phosphate caused medial calcification by increasing tissue-nonspecific alkaline phosphatase activity, which induced elastin degradation and accelerated the transformation of VSMCs into osteoblast-like cells [118].

UTs contributed to cardiac fibrosis, arrhythmia, and myocardial hypertrophy. It has been suggested that IS leads to atrial fibrillation. Exposure to IS accentuated cardiac fibrosis and cardiomyocyte hypertrophy by increasing oxidative stress and decreasing anti-oxidative defenses [119,120]. Chen et al. showed that these changes [121] led to greater pulmonary vein and atrial arrhythmogenesis. High phosphate and urea levels also lead to cardiac hypertrophy [122] and fibrosis [123]. For example, it was shown that high phosphate levels result in lower Klotho levels in rodent models of CKD [123]. Moreover, high urea levels led to systemic microvascular disease with microvascular rarefaction, tissue hypoxia, and dysfunctional angiogenesis [124]. High urea also induced systemic inflammation, which was responsible for subepicardiac artery thickening [125]. In 5/6 nephrectomized mice, PCS toxicity was linked to increases in NADPH oxidase expression and ROS production; these changes contributed to cardiomyocyte apoptosis, which in turn aggravated diastolic dysfunction (with a change in the ratio between early and late left ventricular transmural peak flow velocities) [126].

3.2.3. Other Than Atheromatous and Non-Atheromatous Cardiovascular Diseases

It has been suggested that IS, kynureneine, and TMAO increase the thrombosis risk. IS activated ROS/p38 MAPK signaling and reduced Klotho expression, which would aggravate the effect on platelet aggregation and thrombus formation [127]. Kynureneine promoted clotting as a consequence of vascular injury [128]. Zhu et al. [129] concluded that TMAO enhanced submaximal stimulus-dependent platelet activation and thus contributed to the thrombosis risk.

A number of mechanisms favor EC dysfunction. In 5/6 nephrectomized rats, urea increased ROS production and thus induced oxidative stress in the systemic circulation [98,130,131]. Furthermore, high TMAO levels are associated with a decrease in NO production [132].

The oxidative stress induced by urea contributed also to insulin resistance. Urea increases oxidative stress and protein O-GlcNAcylation, thus impairing insulin secretion and glycolysis [130]. D’Apolito et al. [98] showed that urea increased ROS production and promoted insulin resistance and glucose intolerance. IS and PCS also exert indirect effects given that they were strongly associated with impaired glucose homeostasis and thus hyperglycemia and insulin resistance [109]. Koppe et al. [133] concluded that only PCS (but not PCG) induced insulin resistance by activating extracellular signal-regulated kinases and thus altering insulin signaling in skeletal muscle [134]. Furthermore, Nagy et al.’s in vitro results [97] on CMPF’s role in promoting insulin resistance were confirmed in vivo [97].

Table 2. Animal studies of the effects of UTs on cardiovascular complications.

First Author, Year	Models	UT(s) Studied	Main Findings
Arinze [50], 2022	Adenine-induced CKD mice and IS solute-specific C57BL/6 mice	IS Kynurenine KA	Atheromatous CVDs IS, kynureneine, and KA suppressed Wnt/ β -catenin signaling through increased AHR activity, leading to impaired angiogenesis and hindlimb ischemia.
Hung [101], 2016	Mice with subtotal nephrectomy	IS	IS decreased endothelial progenitor cells mobilization and impaired neovascularization, leading to PAD.
Han [103], 2016	5/6 nephrectomized mice	ApoE $-/-$ PCS	PCS promoted the formation of atherosclerotic lesions, induced plaque instability and the migration and proliferation of VSMCs, and disturbed the balance between matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases within the plaques.
Huang [60], 2018	5/6 nephrectomized rat model	HA	HA caused pro-atherogenic effects by contributing to endothelial dysfunction via greater oxidative stress and impaired endothelium-dependent vasodilation.

Table 2. Cont.

First Author, Year	Models	UT(s) Studied	Main Findings
Shang [61], 2017	Male Wistar rats	HA	HA induced miR-92a, which is involved in angiogenic and atherosclerotic processes.
Massy [107], 2005	ApoE $-/-$ mice with partial kidney ablation	Urea	Urea contributed to arterial calcification and aggravated atherosclerosis.
Matsumoto [102], 2020	Superior mesenteric arteries and femoral arteries of rat	TMAO	TMAO impaired endothelium-derived hyperpolarizing factor-type relaxation, which led to PAD.
Geng [104], 2018	ApoE $-/-$ mice fed a high-fat diet with or without TMAO	TMAO	TMAO enhanced the expression of CD36/MAPK/JNK pathway, promoting foam cells formation and, ultimately, atherosclerosis.
Seldin [105], 2016	Female low-density lipoprotein receptor knockout mice injected with vehicle or TMAO	TMAO	TMAO induced vascular inflammation by activating MAPK and NF- κ B signaling, thus enhancing atherosclerosis.
Koeth [106], 2013	Mice supplemented with dietary TMAO, carnitine, or choline	TMAO	TMAO accelerated atherosclerosis and was linked to major cardiac events.
Kuo [108], 2020	Nephrectomized male C57BL/6 mice	IS	Non-atheromatous CVDs IS promoted calcification in the aorta and peripheral arteries, with low NO production and high eNOS phosphorylation.
Opdebeeck [109], 2019	42 male Wistar rats exposed to adenine sulfate for 10 days and then fed a phosphate-enriched diet	IS PCS	Both IS and PCS directly promoted severe calcification in the aorta and peripheral vessels via activation of inflammation and coagulation pathways. These changes were strongly associated with impaired glucose homeostasis.
Chen [81], 2016	5/6 nephrectomized Sprague Dawley rats treated with IS	IS	IS decreased Klotho expression and promoted aortic calcification.
Chen [121], 2015	Isolated rabbit left atrium, right atrium, pulmonary vein, and sinoatrial nodes before and after treatment with IS	IS	IS may contribute to atrial fibrillation: It increased pulmonary vein and atrial arrhythmogenesis through oxidative stress, inflammation, and fibrosis.
Yisireyili [119], 2013 and Lekawanvijit [120], 2012 and Muteliefu [110], 2012	Dahl salt-sensitive hypertensive rats Aorta of subtotal nephrectomized Dahl salt-sensitive hypertensive rats	IS	IS aggravated cardiac fibrosis and cardiomyocyte hypertrophy, with greater levels of oxidative stress and lower anti-oxidative defenses.
Adijiang [111], 2010	Dahl salt-sensitive hypertensive rats	IS	IS accelerated VSMC senescence and vascular calcification, with upregulation of p21, p53, and prelamin A through oxidative stress.
Adijiang [112], 2008	Dahl salt-sensitive hypertensive rats	IS	IS increased aortic calcification and wall thickness; induced expression of p16, p21, p53 and Rb in the calcification area; and thus promoted cell senescence.
Han [126], 2015	5/6 nephrectomized mice	PCS	IS induced aortic calcification (with expression of osteoblast-specific proteins) and aortic wall thickening.
Hu [123], 2015	Two CKD rodent models: UNX-IRI26 and 5/6 nephrectomized Adenine-induced CKD male Sprague-Dawley rats	Phosphate	PCS promoted cardiac apoptosis and diastolic dysfunction by upregulating the expression of NADPH oxidase and the production of ROS.
Yamada [116], 2014		Phosphate	High phosphate was associated with lower Klotho levels, leading to cardiac hypertrophy and fibrosis.
Lau [114], 2013	DBA/2 mice with partial renal ablation	Phosphate	High phosphate directly increased the expression of TNF- α and osteochonrogenic markers, inducing systemic inflammation and vascular calcification.
Crouthamel [113], 2013	Mice with targeted deletion of PiT-1 in VSMCs	Phosphate	High phosphate was associated with arterial medial calcification.
El-Abbadi [115], 2009	Female DBA/2 mice induced uremia with left total nephrectomy	Phosphate	High phosphate was associated with extensive arterial medial calcification.
Graciolli [117], 2009	5/6 nephrectomized Wistar rats with parathyroidectomy	Phosphate	Phosphate upregulated aortic expression of Runx2 and led to calcified VSMC.
Hosaka [118], 2009	5/6 nephrectomized male Sprague-Dawley rats	Phosphate	High phosphate induced elastin degradation via the upregulation of tissue-nonspecific alkaline phosphatase, accelerating the transformation of VSMCs into osteoblast-like cells and leading to medial layer calcification.
Zhu [122], 2021	25 nephrectomized SPF-grade male Sprague-Dawley rats	Urea	Urea caused myocardial hypertrophy.
Prommer [124], 2018	11 uremic mice and 8 controls	Urea	Urea led to systemic microvascular disease, with microvascular rarefaction, tissue hypoxia, and dysfunctional angiogenesis.
Carmona [125], 2011	2 groups of 30 Wistar male rats: 1 with renal ablation and the other with kidney manipulation only	Urea	Urea induced systemic inflammation and led to the thickening of subepicardiac arteries.
Yang [127], 2017	C57BL/6J mice with left total nephrectomy	IS	Other than ATH and non ATH CVDs IS activated ROS/p38 MAPK signaling and reduced Klotho expression, which induced platelet aggregation and thrombus formation.
Kolachalam [128], 2018	A group of C57BL/6 mice administered Kyn, the excretion of which was inhibited by probenecid	Kynurenine	High kynurenine levels promoted clotting in response to vascular injury.
Koppe [133], 2017	5/6 nephrectomized mice	PCS	PCS (but not PCG) promoted insulin resistance.
Koppe [134], 2013	CD1 Swiss and C57BL/6J mice with 5/6 nephrectomy	PCG PCS	PCS contributed to insulin resistance: It altered insulin signaling in skeletal muscle through the activation of extracellular signal-regulated kinases.
Nagy [97], 2017	Male CD1 mice injected with CMPF	CMPF	CMPF inhibited insulin secretion.
Koppe [130], 2016	C57BL/6N male mice with 5/6 nephrectomy	Urea	Urea increased oxidative stress and protein O-GlcNAcylation, impairing insulin secretion and glycolysis.
Carracedo [131], 2013	5/6 nephrectomized 40 male Wistar rats	Urea	Urea induced oxidative stress, leading to EC damage.

Table 2. Cont.

First Author, Year	Models	UT(s) Studied	Main Findings
D'Apolito [98], 2010	5/6 nephrectomized wild-type mice	C57BL/6J Urea	Urea increased ROS production and induced insulin resistance and glucose intolerance.
Li [132], 2018	5/6 nephrectomized rats	TMAO	High TMAO levels decreased NO production, contributing to endothelial dysfunction.
Zhu [129], 2016	Carotid artery thrombosis models of germ-free C57BL/6J female mice	TMAO	TMAO enhanced submaximal stimulus-dependent platelet activation, increasing the thrombosis risk.

Abbreviations: CMPF: 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid; CVD: cardiovascular disease; eNOS:endothelial nitric oxide synthase; HA: hippuric acid; IS:indoxylo sulfate; KA: kynurenic acid; MAPK: mitogen-activated protein kinase; MI: myocardial infarction; NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NO: nitric oxide; PAD: peripheral artery disease; PCS: para-cresyl sulfate; PCG: p-cresyl glucuronide; ROS: reactive oxygen species; Runx2: runt-related transcription factor 2; TMAO: trimethylamine-N-oxide; UT: uremic toxin; VSMC: vascular smooth muscle cell.

3.3. Observational Studies

Observational studies of the UTs' impact on ATH and/or non-ATH CVDs are summarized in Table 3.

Some of the studies sought to elucidate the association between UTs with ATH and/or non-ATH CVDs in patients with CKD.

In 147 patients with stage 1 to 5 CKD, high plasma IS levels were associated with major adverse cardiovascular events independently of the GFR and nutritional status [135]. A recent study by Konje et al. [136] found a positive association between kynurenine and incident ATH and non-ATH CVDs, including MI, angina, coronary artery bypass grafting, angioplasty/stenting of a coronary artery, stroke, PAD, congestive heart failure, and arrhythmia. Wu et al. [137] showed that elevated free PCS serum levels were associated with cardiovascular mortality in HD patients. A study by Liabeuf et al. [138] demonstrated for the first time that serum PCG levels were positively correlated with cardiovascular mortality, independently of survival predictors. These results showed that even though PCG is the minor metabolite of p-cresol, it appears to have a substantial impact on mortality—as much as PCS and IS do. Several studies confirmed the link between phosphate and CVDs and mortality. In 13,292 stage 3 to 5 CKD patients, serum phosphate was positively correlated with increased risk of incident stroke, transient ischaemic attack, MI, advanced coronary artery disease, new cardiac failure, and death [139]. An elevated serum phosphate concentration was significantly associated with cardiovascular mortality in many study settings [140–143]. Similarly, high serum TMAO levels were associated with cardiovascular events and death in HD patients, including coronary events, arrhythmias, sudden cardiac death, and congestive heart failure [144].

Urea has direct and indirect effects on adverse cardiovascular outcomes in patients with CKD. A recent cohort conducted by Laville et al. in 2022 [27] was the first to show a direct association between elevated serum urea concentrations and a greater risk of ATH CVD, non-ATH CVD, and mortality in pre-ESRD patients; this was independent of other conventional risk factors, including renal function. In addition, elevated urea levels were positively correlated with CVD. Nevertheless, this correlation was indirect. There are various hypotheses for the toxicity of high urea levels, including protein carbamylation (a post-translational modification of proteins with various biological consequences—mainly related to atherogenesis) [145]. Berg et al. [146] affirmed that high urea was positively correlated with the carbamylation of serum albumin, and suggested that this carbamylation had an impact on CVD and mortality.

All the above-mentioned previous studies concluded that there was a significant, independent association between UTs and the risk of cardiovascular complications. However, a few studies did not find an association after adjusting for confounders, and others did not find any association between some UTs and cardiovascular morbidity/mortality. The Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) study by Chen et al. [147] included 3407 patients with CKD but not ESRD. The results showed that lower 24-h kidney clearance of IS, KA, and PCS was associated with incident heart failure and MI; however, this association was not statistically significant after adjustment for the GFR. In the HEMO study, Shafi et al.

concluded [148] that IS, PCS, PAG, and HA were not associated with any cardiovascular event (coronary events, peripheral vascular disease, ischemic heart disease, congestive heart failure, or arrhythmias). However, high IS levels were predictive of cardiac and sudden cardiac death in patients with lower albumin. It has been shown that high serum CMPF levels were not associated with any type of CVD [149], and that higher phosphate levels were associated with increased cardiovascular mortality; however, the latter association was not statistically significant after adjustment for GFR [150]. In a study of 235 HD patients, Kaysen et al. [151] found that there was no significant association between TMAO and cardiovascular hospitalizations or death.

Even though some studies investigated the association of UTs with both ATH and non-ATH CVDs, many focused on one or the other.

3.3.1. Atheromatous Cardiovascular Diseases

The in vitro and in vivo effect of tryptophan-derived indoles on PAD (observed by Arinze et al. [50]) was confirmed in two cohorts. Firstly, a study of 20 HDs concluded that elevated plasma levels of IS, kynurenine, and KA were associated with a significant decrease in EC proliferation and migration, relative to 15 controls [50]. Secondly, 28 PAD patients with adverse limb events and 35 PAD patients without adverse limb events were followed up for 2 years. High plasma levels of IS, kynureanine, and KA, along with suppressed Wnt activity in ECs, were associated with an elevated risk of future adverse limb events [50]. In another study of 100 HD patients, elevated serum levels of IS and PCS were associated with PAD and arteriosclerosis markers [152].

Shafi et al. [153] concluded that higher serum levels of IS, PCS, PAG, and HA were associated with a greater risk of fatal or nonfatal atherosclerotic cardiovascular events. Previous studies had already shown that higher serum IS levels were associated with atherosclerotic cardiovascular events [154–156]. Hsu et al. [154] showed that higher serum IS levels were associated with coronary atherosclerosis and indicated that this elevation was correlated with the severity of the disease. In a cohort of 224 HD patients, plasma IS levels showed a significant negative correlation with HDL cholesterol, and they were associated with atherosclerotic lesions [156]. An older study by Lin et al. [157] in 2010 showed that high serum levels of PCS were significantly associated with atherosclerotic cardiovascular events. In 2016, Poesen et al. carried out two ancillary analyses of data from the Leuven Mild-to-Moderate CKD Study. One ancillary analysis showed that a lower serum PCS:PCG ratio and high total PCS and PCG levels were associated with fatal and nonfatal atherosclerotic CVDs [158]. The other demonstrated that an elevated serum PAG level was associated with CVD even after adjustment for age, sex, the presence of DM, prior CVD, and GFR; hence, elevated PAG was considered to be a powerful, independent risk factor for major CVDs (notably MI and stroke) [159].

The toxic effect of PCS on ATH CVDs dates back to a study conducted in 2010 on 202 stable angina patients with early stage of CKD, presenting that an elevated plasma level of PCS was associated with CAD and it was correlated with the severity of the disease [160]. The association between hyperphosphatemia and atherosclerotic diseases was reported from 2002 onwards [161] and again recently [162]. In 1203 non-dialyzed CKD patients, high serum phosphate levels were associated with an increased risk of fatal ATH CVD [163]. Hyperphosphatemia was associated with MI in a representative study of 3490 patients with CKD [164]. TMAO is the UT most frequently studied in animal models with regard to its link to ATH CVDs. Many cohorts from 2016 onwards have confirmed these findings. High TMAO concentrations were positively correlated with coronary atherosclerosis in one study [165] and with ischemic cardiovascular events in a study of 2529 stage 3b or 4 patients with CKD [166].

Only one study (by Melamed et al. [167]) failed to find an association between IS or PCS and fatal ATH CVD.

3.3.2. Non-Atheromatous Cardiovascular Diseases

While TMAO is most studied compound with regard to the effect of UTs on ATH CVDs *in vivo*, its counterpart for non-ATH CVDs is IS. Most observational clinical studies have confirmed the association between IS and vascular calcification. A recent study of IS, IAA, PCS, PCG, and HA showed that each UT was significantly and negatively correlated with peak cardiac power and significantly and positively correlated with subclinical cardiac dysfunction but not with the left ventricular mass index [168]. Cao et al. [169] and Shimazu et al. [170] reported that high plasma IS was associated with heart failure [169,170] and cardiac death [170]. In a study of 204 patients with CKD and preserved left ventricular function, greater plasma IS levels were associated with an elevated risk of left ventricular diastolic dysfunction [171]. In a cohort study by Barreto et al. [172], serum IS levels were directly associated with pulse wave velocity and aortic calcification, and being in the highest IS tertile was a strong predictor of cardiovascular mortality. In a study in 2020, KA also was associated with diastolic dysfunction [173]. Serum KA levels were positively correlated with aortic stiffness and with indices of left atrium and left ventricle diastolic dysfunction [173]. In addition, high plasma kynurenone and KA levels were associated with intima-media thickness in 106 CKD patients [174]. A 2010 study by Liabeuf et al. [175] proved that an elevated serum total and free PCS levels were significantly associated with vascular calcification, and free PCS was shown to be a predictor of cardiovascular mortality. HA was also investigated in 2018; high HA levels were significantly associated with left ventricular hypertrophy in HD patients [176]. Several studies showed that hyperphosphatemia was associated with vascular calcification [177–179]. Petchey et al. [177] further reported that serum phosphate was positively correlated with the aortic pulse wave velocity and thus with arterial stiffness. In a cohort of 6814 patients with CKD, high serum phosphate was associated with vascular and valvular calcification [178]. Moreover, Ix et al. [180] concluded that hyperphosphatemia was strongly associated with peripheral arterial stiffness. As mentioned above, urea exerts its toxicity indirectly through protein carbamylation. In 1255 HD patients, greater blood urea levels were associated with serum carbamylated albumin levels, and being in the upper urea tertile was positively correlated with heart failure and arrhythmia [181].

3.3.3. Other Than Atheromatous and Non-Atheromatous Cardiovascular Diseases

Many observational studies have highlighted the detrimental effect of UTs on ECs. A novel study by Glorieux et al. [182] in 2021 demonstrated that high serum levels of IS, IAA, PCS, PCG, and HA were correlated with markers of endothelial damage—mainly angiopoietin-2, a protein with an essential role in angiogenesis and that is involved in carotid artery intima media thickening, arterial stiffness, and left ventricular hypertrophy [182,183]. In a 2019 study by Wang et al. [184], elevated serum IS levels were negatively correlated with vascular reactivity index values. A study by Jourde-Chiche et al. [185] found that high serum levels of IS, IAA, and PCS were associated with low numbers of endothelial progenitor cells. Meijers et al. [66] investigated PCS *in vitro* and in an observational study; high serum PCS levels were associated with the presence of circulating endothelial microparticles. In 2009 and 2010, Pawlak et al. studied the toxicity of kynurenone and its metabolite KA; both were shown to be associated with elevated oxidative stress, inflammation, and EC dysfunction [186]. The researchers found that plasma KA levels were associated positively with TF inhibitor levels and negatively with prothrombin fragment 1 + 2 levels [187]. Pawlak et al. also concluded that plasma kynurenone levels were positively associated with thrombomodulin and von Willebrand factor (both markers of EC dysfunction) [188].

In addition, high serum kynurenone and KA levels were independently and significantly associated with hypercoagulability [189]. Elevated serum IS and kynurenone levels contribute to postangioplasty complications. High serum levels of IS [128,190] and kynurenone [128] were associated with postangioplasty thrombosis of dialysis grafts.

It is noteworthy that high levels of free PCS and free PCG had the strongest association with CVDs even after adjustment for the GFR [182].

Table 3. Observational studies of the effects of UTs on cardiovascular complications.

First Author, Year	Models	UT(s) Studied	Main Findings
Arinze [50], 2022	20 HD patients and 15 controls	IS Kynurenine KA	Atheromatous CVDs Elevated plasma levels of IS, kynurenine, and KA in HD patients showed a significant decrease in ECs proliferation and migration, compared with the control group.
Arinze [50], 2022	PAD patients: 35 without adverse limb event and 28 with	IS Kynurenine KA	Elevated plasma levels of IS, kynurenine, KA, with suppressed Wnt activity in ECs were associated with an increased risk of future adverse limb events.
Shafi et al. [153], 2015	394 incident HD patients	IS PCS PAG HA	Elevated serum levels of IS, PCS, PAG and HA were associated with greater risk of fatal or nonfatal atherosclerotic cardiovascular events in incident HD patients.
Hsu [154], 2013	191 mild-to-moderate CKD patients	IS	Elevated serum IS levels were associated with coronary atherosclerosis and correlated with the severity of the disease.
Melamed [167], 2013	521 incident HD patients	IS PCS	IS and PCS were not associated with atherosclerotic cardiovascular death.
Lin [155], 2012	70 pre-dialysis patients (CKD stage 3 to 5)	IS	Serum IS levels were positively correlated with atherosclerotic cardiovascular events.
Lin [152], 2012	100 stable HD patients	IS PCS	Elevated serum levels of IS and PCS were associated with PAD and arteriosclerosis markers.
Lin [157], 2010	100 HD patients	IS PCS	Only elevated serum PCS levels were significantly associated with fatal or nonfatal atherosclerotic cardiovascular events.
Taki [156], 2007	224 HD patients	IS	Plasma IS levels were significantly and negatively correlated with HDL cholesterol and were positively associated with atherosclerotic lesions.
Poesen [158], 2016	488 patients (all CKD stages)	PCS PCG	A lower serum PCS:PCG ratio and a higher total PCS + PCG level were associated with fatal or nonfatal atherosclerotic CVDs.
Wang [160], 2010	202 patients with stable angina and early-stage kidney failure	PCS	Elevated plasma PCS levels were associated with coronary artery disease and correlated with the severity of the disease.
Poesen [159], 2016	488 patients with CKD stages 1–5	PAG	An elevated serum PAG level was a powerful, independent risk factor for major CVD (such as MI and stroke).
Merhi [162], 2017	3138 CKD patients	Phosphate	Hyperphosphatemia was associated with atherosclerotic CVD.
Eddington [163], 2010	1203 nondialyzed CKD patients	Phosphate	Hyperphosphatemia increased the risk of cardiovascular death from atheromatous CVD.
Kestenbaum [164], 2005	3490 CKD patients	Phosphate	Hyperphosphatemia was associated with MI.
Nakamura [161], 2002	525 HD patients	Phosphate	Hyperphosphatemia was associated with atherosclerotic diseases.
Stubbs [165], 2016	104 CKD patients	TMAO	Elevated TMAO concentrations were correlated with coronary atherosclerosis.
Kim [166], 2016	2529 patients (stages 3b and 4 CKD)	TMAO	Elevated serum TMAO levels were associated with ischemic cardiovascular events.
Chinnappa [168], 2018	56 male patients with stage 2–5 CKD, nondialyzed and free of heart disease	IS IAA PCS PCG HA	Non-atheromatous CVDs These serum UT levels showed significant negative correlation with peak cardiac power and subclinical cardiac dysfunction, but no correlation with left ventricular mass index was found.
Cao [169], 2015	258 HD patients	IS	Elevated plasma IS was associated with heart failure.
Sato [171], 2013	204 CKD patients with preserved left ventricular function	IS	Elevated plasma IS levels were associated with an increased risk of left ventricular diastolic dysfunction.
Shimazu [170], 2013	76 patients with mild-to-moderate CKD and dilated cardiomyopathy	IS	Elevated serum IS levels were associated with hospitalization for heart failure and cardiac death.
Barreto [172], 2009	139 patients with CKD from stage 2 to dialysis	IS	Being in the highest serum IS tertile was directly associated with pulse wave velocity, aortic calcification, and higher cardiovascular mortality.
Zapolski [173], 2020	100 CKD patients with persistent atrial fibrillation	KA	Serum KA levels were positively correlated with aortic stiffness and indices of diastolic dysfunction of left atrium and left ventricle.
Pawlak [174], 2010	106 CKD patients	KA Kynurenine	Elevated plasma kynurenine and KA levels were associated with intima-media thickness.
Liabeuf [175], 2010	139 CKD patients	PCS	Elevated total and free serum PCS levels were significantly associated with vascular calcification, and free PCS was shown to be a predictor of cardiovascular death.
Yu [176], 2018	80 HD patients	HA	Elevated HA levels were significantly associated with left ventricular hypertrophy.
Petchey [177], 2012	120 CKD pre-dialysis patients	Phosphate	Serum phosphate was positively correlated with aortic pulse wave velocity, arterial stiffness, and the presence of vascular calcification.
Adeney [178], 2009	6814 patients with CKD aged 45–84	Phosphate	Hyperphosphatemia was associated with vascular and valvular calcification.
Ix [180], 2009	440 patients with moderate CKD	Phosphate	Hyperphosphatemia was strongly associated with peripheral arterial stiffness.
Ketteler [179], 2003	312 HD patients	Phosphate	Hyperphosphatemia was associated with vascular calcification and cardiovascular mortality.
Drechsler [181], 2015	1255 HD patients	Urea	Higher blood urea levels were associated with higher tertile serum carbamylated albumin levels, which in turn were positively correlated with heart failure and arrhythmia.

Table 3. Cont.

First Author, Year	Models	UT(s) Studied	Main Findings
Chen [147], 2021	3407 participants with CKD, excluding those with a GFR <20 mL/min/1.73 m ²	IS KA PCS	Atheromatous and non-atheromatous CVDs Lower 24-hour kidney clearance of IS, KA, and PCS was not found to be associated with heart failure and MI after adjustment for GFR.
Fan [135], 2019	147 patients with CKD stage 1–5	IS	Elevated plasma IS levels were associated with major adverse cardiovascular events, independently of GFR and nutritional status.
Shafi [148], 2017	1273 HD patients	IS PCS PAG HA	Overall, elevated serum IS, PCS, PAG and HA levels were not associated with any cardiovascular event. However, high IS levels were predictive of cardiac and sudden cardiac death in patients with low albumin levels.
Konje [136], 2021	92 CKD patients with a history of CVD, 46 with no history of CVD, and 46 with incident CVD	Kynurenine	Elevated serum kynurenine levels were associated with incident atherosomatous and non-atheromatous CVDs.
Wu [137], 2012	112 HD patients aged from 65 to 90	PCS	Elevated free PCS serum levels were associated with cardiovascular mortality.
Liabeuf [138], 2013	139 CKD patients	PCG	Elevated free and total serum PCG levels were correlated with cardiovascular mortality independently of survival predictors.
Luce [149], 2018	270 HD patients	CMPF	Elevated serum CMPF was not associated with any CVD.
McGovern [139], 2013	13,292 CKD patients at stages 3–5	Phosphate	Hyperphosphatemia was correlated with increased CVDs.
Kimata [140], 2007	3973 HD patients	Phosphate	Hyperphosphatemia was significantly associated with cardiovascular mortality.
Menon [150], 2005	840 CKD patients	Phosphate	Hyperphosphatemia was significantly associated with increased cardiovascular mortality but only before adjustment for GFR.
Slinin [141], 2005	14829 HD patients	Phosphate	Hyperphosphatemia was associated with CVDs and mortality.
Young [142], 2005	17236 dialysis patients	Phosphate	Hyperphosphatemia was significantly associated with cardiovascular mortality.
Block [143], 2004	40538 HD patients	Phosphate	Hyperphosphatemia was significantly associated with cardiovascular hospitalization and mortality.
Laville [27], 2022	2507 CKD patients before RRT	Urea	Higher serum urea levels were associated with a greater risk of CVD.
Berg [146], 2013	187 HD patients	Urea	Urea was positively correlated with carbamylation of serum albumin, which is associated with CVDs and mortality.
Shafi [144], 2017	1846 prevalent HD patients	TMAO	An elevated serum TMAO concentration was associated with cardiovascular events and death.
Kaysen [151], 2015	235 HD patients	TMAO	There was no significant association between TMAO and cardiovascular hospitalizations or death.
Glorieux [182], 2021	523 nondialyzed patients (all stages of CKD)	IS IAA PCS PCG HA IS	Other than ATH and non ATH CVDs Elevated serum levels of these UTs were correlated with markers of endothelial damage (mainly angiopoietin-2). Elevated levels of free PCS and free PCG had the strongest association with CVD, independently of the GFR.
Wang [184], 2019	110 patients with stage 3–5 CKD	IS	Elevated levels of serum IS were negatively correlated with vascular reactivity index values, leading to endothelial dysfunction.
Kolachalam [128], 2018	473 participants undergoing angioplasty for dialysis access dysfunction	IS	Elevated serum levels of IS and kynurenine were associated with postangioplasty thrombosis of dialysis grafts.
Wu [190], 2016	306 patients undergoing angioplasty for dialysis access dysfunction	IS	Elevated serum levels of IS were associated with postangioplasty thrombosis of dialysis grafts.
Jourde-Chiche [185], 2009	38 HD patients and 21 healthy controls	IS IAA PCS	Elevated serum levels of IS, IAA, and PCS were associated with low numbers of endothelial progenitor cells.
Pawlak [187], 2010	64 patients on peritoneal dialysis	KA	Plasma KA levels were positively associated with TF inhibitor and negatively associated with prothrombin fragment 1 + 2 levels.
Pawlak [188], 2009	48 patients with ESRD	Kynurenine	Plasma kynurenine levels were positively associated with thrombomodulin and von Willebrand factor (markers of endothelial dysfunction).
Pawlak [186], 2009	146 CKD patients with 91 ones on dialysis	Kynurenine KA	Elevated serum levels of kynurenine and KA were associated with increased oxidative stress, inflammation, and endothelial dysfunction.
Pawlak [189], 2009	92 patients on dialysis	Kynurenine KA	Elevated serum levels of kynurenine and KA were independently and significantly associated with hypercoagulability.
Meijers [66], 2009	100 HD patients	PCS	Elevated serum PCS levels were associated with the levels of circulating endothelial microparticles.

Abbreviations: CMPF: 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid; CKD: chronic kidney disease; CVD: cardiovascular disease; EC: endothelial cell; ESRD: end-stage renal disease; GFR: glomerular filtration rate; HA: hippuric acid; HD: hemodialysis; HDL: high-density lipoprotein; IAA: indole-3-acetic acid; IS: indoxyl sulfate; KA: kynurenic acid; MI: myocardial infarction; PAD: peripheral artery disease; PAG: phenylacetylglutamine; PCS: para-cresyl sulfate; PCG: p-cresyl glucuronide; RRT: renal replacement therapy; TF: tissue factor; TMAO: trimethylamine-N-oxide; UT: uremic toxin.

4. Conclusions

We primarily reviewed gut-derived UTs because most of the latter are protein-bound solutes that are difficult to remove from the plasma; their accumulation in the circulation is associated with many harmful effects (including cardiovascular complications). We also reviewed phosphate and urea, whose toxicity has long been known but is still being explored. CVD is a major problem in patients with CKD and constitutes the leading cause

of death in this population [19]. Strategies implemented to modify UT levels have been described in previous reviews [11,191]. A combined approach of targeting UTs with the other aspects of CVD could be necessary for its prevention. Noteworthy, the relation between CKD and CVDs is bidirectional: CVDs could also impact kidney's health, causing kidney damage and disease progression, creating the cardio-renal syndrome [192].

Author Contributions: Conceptualization, S.L. and Z.M.; methodology, C.E.C.; software, not applicable; validation, not applicable; investigation, not applicable; resources, C.E.C., Z.M. and S.L.; data curation, not applicable; writing—original draft preparation, C.E.C.; writing—review and editing, S.L. and Z.M.; visualization, not applicable; supervision, S.L. and Z.M.; project administration, not applicable; funding acquisition, not applicable. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We genuinely appreciate the assistance of M.David Fraser in English revision.

Conflicts of Interest: C.E.C and S.L. declare no conflict of interest. Z.M. reports having received grants for CKD REIN and other research projects from Amgen, Baxter, Fresenius Medical Care, GlaxoSmithKline, Merck Sharp and Dohme-Chibret, Sanofi-Genzyme, Lilly, Otsuka, Astra Zeneca, Vifor, and the French government, as well as fees and grants to charities from Astra Zeneca.

References

- Perico, N.; Remuzzi, G. Chronic kidney disease: A research and public health priority. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2012**, *27*, iii19–iii26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Levey, A.S.; Eckardt, K.U.; Dorman, N.M.; Christiansen, S.L.; Hoorn, E.J.; Ingelfinger, J.R.; Inker, L.A.; Levin, A.; Mehrotra, R.; Palevsky, P.M.; et al. Nomenclature for kidney function and disease: Report of a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Consensus Conference. *Kidney Int.* **2020**, *97*, 1117–1129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lv, J.C.; Zhang, L.X. Prevalence and disease burden of chronic kidney disease. *Ren. Fibros. Mech. Ther.* **2019**, *1165*, 3–15.
- Nlandu, Y.; Padden, M.; Seidowsky, A.; Hamaz, S.; Vilaine, E.; Cheddani, L.; Essig, M.; Massy, Z.A. Toxines urémiques de moyen poids moléculaire: Un véritable regain d'intérêt. *Néphrol. Thér.* **2019**, *15*, 82–90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wojtaszek, E.; Oldakowska-Jedynak, U.; Kwiatkowska, M.; Glogowski, T.; Malyszko, J. Uremic toxins, oxidative stress, atherosclerosis in chronic kidney disease, and kidney transplantation. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2021**, *2021*, 6651367. [[CrossRef](#)]
- Gansevoort, R.T.; Correa-Rotter, R.; Hemmelgarn, B.R.; Jafar, T.H.; Heerspink, H.J.L.; Mann, J.F.; Matsushita, K.; Wen, C.P. Chronic kidney disease and cardiovascular risk: Epidemiology, mechanisms, and prevention. *Lancet* **2013**, *382*, 339–352. [[CrossRef](#)]
- Drüeke, T.B.; Massy, Z.A. Atherosclerosis in CKD: Differences from the general population. *Nat. Rev. Nephrol.* **2010**, *6*, 723–735. [[CrossRef](#)]
- Villain, C.; Metzger, M.; Combe, C.; Fouque, D.; Frimat, L.; Jacquelin, C.; Laville, M.; Briançon, S.; Klein, J.; Schanstra, J.P.; et al. Prevalence of atheromatous and non-atheromatous cardiovascular disease by age in chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2020**, *35*, 827–836. [[CrossRef](#)]
- Liabeuf, S.; Drüeke, T.B.; Massy, Z.A. Protein-bound uremic toxins: New insight from clinical studies. *Toxins* **2011**, *3*, 911–919. [[CrossRef](#)]
- Vanholder, R.; De Smet, R.; Glorieux, G. Review on uremic toxins: Classification, concentration, and interindividual variability (volume 63, pg 1934, 2003). *Kidney Int.* **2020**, *98*, 1354.
- Rosner, M.H.; Reis, T.; Husain-Syed, F.; Vanholder, R.; Hutchison, C.; Stenvinkel, P.; Blankestijn, P.J.; Cozzolino, M.; Juillard, L.; Kashani, K.; et al. Classification of uremic toxins and their role in kidney failure. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2021**, *16*, 1918–1928. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Duranton, F.; Cohen, G.; De Smet, R.; Rodriguez, M.; Jankowski, J.; Vanholder, R.; Argiles, A.; European Uremic Toxin Work Group. Normal and pathologic concentrations of uremic toxins. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2012**, *23*, 1258–1270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Graboski, A.L.; Redinbo, M.R. Gut-derived protein-bound uremic toxins. *Toxins* **2020**, *12*, 590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Vanholder, R.; Baurmeister, U.; Brunet, P.; Cohen, G.; Glorieux, G.; Jankowski, J.; European Uremic Toxin Work Group. A bench to bedside view of uremic toxins. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2008**, *19*, 863–870. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Moradi, H.; Sica, D.A.; Kalantar-Zadeh, K. Cardiovascular burden associated with uremic toxins in patients with chronic kidney disease. *Am. J. Nephrol.* **2013**, *38*, 136–148. [[CrossRef](#)]

16. Pieniazek, A.; Bernasinska-Slomczewska, J.; Gwozdzinski, L. Uremic Toxins and Their Relation with Oxidative Stress Induced in Patients with CKD. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6196. [CrossRef]
17. Gross, P.; Six, I.; Kamel, S.; Massy, Z.A. Vascular Toxicity of Phosphate in Chronic Kidney Disease—Beyond Vascular Calcification. *Circ. J.* **2014**, *78*, 2339–2346. [CrossRef]
18. Wang, Z.; Zhao, Y. Gut microbiota derived metabolites in cardiovascular health and disease. *Protein Cell* **2018**, *9*, 416–431. [CrossRef]
19. Lim, Y.J.; Sidor, N.A.; Tonial, N.C.; Che, A.; Urquhart, B.L. Uremic Toxins in the Progression of Chronic Kidney Disease and Cardiovascular Disease: Mechanisms and Therapeutic Targets. *Toxins* **2021**, *13*, 142. [CrossRef]
20. 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: A statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Circulation* **2003**, *108*, 2154–2169. [CrossRef]
21. Association, A.H.; Virani, S.S.; Alonso, A.; Benjamin, E.J.; Bittencourt, M.S.; Callaway, C.W.; Carson, A.P.; Chamberlain, A.M.; Chang, A.R.; Cheng, S.; et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2020 Update. 2020. Available online: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIR.0000000000000757> (accessed on 27 February 2022).
22. Jankowski, J.; Floege, J.; Fliser, D.; Böhm, M.; Marx, N. Cardiovascular disease in chronic kidney disease: Pathophysiological insights and therapeutic options. *Circulation* **2021**, *143*, 1157–1172. [CrossRef] [PubMed]
23. London, G.M.; Marchais, S.J.; Guerin, A.P.; Metivier, F.; Adda, H. Arterial structure and function in end-stage renal disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2002**, *17*, 1713–1724. [CrossRef] [PubMed]
24. Schwarz, U.; Buzello, M.; Ritz, E.; Stein, G.; Raabe, G.; Wiest, G.; Mall, G.; Amann, K. Morphology of coronary atherosclerotic lesions in patients with end-stage renal failure. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2000**, *15*, 218–223. [CrossRef] [PubMed]
25. Herzog, C.A.; Asinger, R.W.; Berger, A.K.; Charytan, D.M.; Díez, J.; Hart, R.G.; Eckardt, K.U.; Kasiske, B.L.; McCullough, P.A.; Passman, R.S.; et al. Cardiovascular disease in chronic kidney disease. A clinical update from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* **2011**, *80*, 572–586. [CrossRef] [PubMed]
26. Hicks, K.A.; Mahaffey, K.W.; Mehran, R.; Nissen, S.E.; Wiviott, S.D.; Dunn, B.; Solomon, S.D.; Marler, J.R.; Teerlink, J.R.; Farb, A.; et al. 2017 cardiovascular and stroke endpoint definitions for clinical trials. *Circulation* **2018**, *137*, 961–972. [CrossRef]
27. Laville, S.M.; Couturier, A.; Lambert, O.; Metzger, M.; Mansencal, N.; Jacquelinet, C.; Laville, M.; Frimat, L.; Fouque, D.; Combe, C.; et al. Urea levels and cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2022**, gfac045. [CrossRef]
28. Valdivielso, J.M.; Rodríguez-Puyol, D.; Pascual, J.; Barrios, C.; Bermúdez-López, M.; Sánchez-Niño, M.D.; Pérez-Fernández, M.; Ortiz, A. Atherosclerosis in chronic kidney disease: More, less, or just different? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2019**, *39*, 1938–1966. [CrossRef]
29. Masson, P.; Webster, A.C.; Hong, M.; Turner, R.; Lindley, R.I.; Craig, J.C. Chronic kidney disease and the risk of stroke: A systematic review and meta-analysis. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2015**, *30*, 1162–1169. [CrossRef]
30. Chen, J.; Mohler, E.R.; Xie, D.; Shlipak, M.; Townsend, R.R.; Appel, L.J.; Ojo, A.; Schreiber, M.; Nessel, L.; Zhang, X.; et al. Traditional and non-traditional risk factors for incident peripheral arterial disease among patients with chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2016**, *31*, 1145–1151. [CrossRef]
31. Wattanakit, K.; Folsom, A.R.; Selvin, E.; Coresh, J.; Hirsch, A.T.; Weatherley, B.D. Kidney function and risk of peripheral arterial disease: Results from the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2007**, *18*, 629–636. [CrossRef]
32. Odutayo, A.; Wong, C.X.; Hsiao, A.J.; Hopewell, S.; Altman, D.G.; Emdin, C.A. Atrial fibrillation and risks of cardiovascular disease, renal disease, and death: Systematic review and meta-analysis. *BMJ* **2016**, *354*, i4482. [CrossRef] [PubMed]
33. Silverberg, D.; Wexler, D.; Blum, M.; Schwartz, D.; Iaina, A. The association between congestive heart failure and chronic renal disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **2004**, *13*, 163–170. [CrossRef] [PubMed]
34. Sarafidis, P.A.; Loutradis, C.; Karpetas, A.; Tzanis, G.; Piperidou, A.; Koutroumpas, G.; Raptis, V.; Syrgkanis, C.; Liakopoulos, V.; Efstratiadis, G.; et al. Ambulatory pulse wave velocity is a stronger predictor of cardiovascular events and all-cause mortality than office and ambulatory blood pressure in hemodialysis patients. *Hypertension* **2017**, *70*, 148–157. [CrossRef] [PubMed]
35. Briet, M.; Bozec, E.; Laurent, S.; Fassot, C.; London, G.; Jacquot, C.; Froissart, M.; Houillier, P.; Boutouyrie, P. Arterial stiffness and enlargement in mild-to-moderate chronic kidney disease. *Kidney Int.* **2006**, *69*, 350–357. [CrossRef]
36. Pannier, B.; Guérin, A.P.; Marchais, S.J.; Safar, M.E.; London, G.M. Stiffness of capacitive and conduit arteries: Prognostic significance for end-stage renal disease patients. *Hypertension* **2005**, *45*, 592–596. [CrossRef]
37. London, G.M. Arterial stiffness in chronic kidney disease and end-stage renal disease. *Blood Purif.* **2018**, *45*, 154–158. [CrossRef]
38. Lee, S.J.; Lee, I.K.; Jeon, J.H. Vascular calcification—new insights into its mechanism. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2685. [CrossRef]
39. Vahed, S.Z.; Mostafavi, S.; Khatibi, S.M.H.; Shoja, M.M.; Ardalan, M. Vascular calcification: An important understanding in nephrology. *Vasc. Health Risk Manag.* **2020**, *16*, 167. [CrossRef]
40. Ozcan, C. Conduction Intervals and Atrial Fibrillation in Chronic Kidney Disease. *Am. J. Nephrol.* **2021**, *52*, 354–355. [CrossRef]
41. Kaya, B.; Paydas, S.; Aikimbaev, K.; Altun, E.; Balal, M.; Deniz, A.; Kaypaktli, O.; Demirtas, M. Prevalence of cardiac arrhythmia and risk factors in chronic kidney disease patients. *Saudi J. Kidney Dis. Transplant.* **2018**, *29*, 567. [CrossRef]
42. Bonato, F.O.B.; Canziani, M.E.F. Ventricular arrhythmia in chronic kidney disease patients. *Braz. J. Nephrol.* **2017**, *39*, 186–195. [CrossRef] [PubMed]

43. Rapa, S.F.; Di Iorio, B.R.; Campiglia, P.; Heidland, A.; Marzocco, S. Inflammation and oxidative stress in chronic kidney disease—potential therapeutic role of minerals, vitamins and plant-derived metabolites. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 263. [CrossRef] [PubMed]
44. Gremmel, T.; Müller, M.; Steiner, S.; Seidinger, D.; Koppensteiner, R.; Kopp, C.W.; Panzer, S. Chronic kidney disease is associated with increased platelet activation and poor response to antiplatelet therapy. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2013**, *28*, 2116–2122. [CrossRef] [PubMed]
45. Jain, N.; Wan, F.; Kothari, M.; Adelodun, A.; Ware, J.; Sarode, R.; Hedayati, S.S. Association of platelet function with depression and its treatment with sertraline in patients with chronic kidney disease: Analysis of a randomized trial. *BMC Nephrol.* **2019**, *20*, 395. [CrossRef] [PubMed]
46. Ocak, G.; Verdijin, M.; Vossen, C.Y.; Lijfering, W.M.; Dekker, F.W.; Rosendaal, F.R.; Gansevoort, R.T.; Mahmoodi, B.K. Chronic kidney disease stages 1–3 increase the risk of venous thrombosis. *J. Thromb. Haemost.* **2010**, *8*, 2428–2435. [CrossRef] [PubMed]
47. Folsom, A.R.; Lutsey, P.L.; Astor, B.C.; Wattanakit, K.; Heckbert, S.R.; Cushman, M.; Atherosclerosis Risk in Communities Study. Chronic kidney disease and venous thromboembolism: A prospective study. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2010**, *25*, 3296–3301. [CrossRef]
48. Kimura, T.; Morimoto, T.; Kozuma, K.; Honda, Y.; Kume, T.; Aizawa, T.; Mitsudo, K.; Miyazaki, S.; Yamaguchi, T.; Hiyoshi, E.; et al. Comparisons of baseline demographics, clinical presentation, and long-term outcome among patients with early, late, and very late stent thrombosis of sirolimus-eluting stents: Observations from the Registry of Stent Thrombosis for Review and Reevaluation (RESTART). *Circulation* **2010**, *122*, 52–61.
49. Ting, H.H.; Tahirkheli, N.K.; Berger, P.B.; McCarthy, J.T.; Timimi, F.K.; Mathew, V.; Rihal, C.S.; Hasdai, D.; Holmes, D.R., Jr. Evaluation of long-term survival after successful percutaneous coronary intervention among patients with chronic renal failure. *Am. J. Cardiol.* **2001**, *87*, 630–633. [CrossRef]
50. Arinze, N.V.; Yin, W.; Lotfollahzadeh, S.; Napoleon, M.A.; Richards, S.; Walker, J.A.; Belghasem, M.; Ravid, J.D.; Kamel, M.H.; Whelan, S.A.; et al. Tryptophan metabolites suppress Wnt pathway and promote adverse limb events in CKD patients. *J. Clin. Investig.* **2022**, *132*, e142260. [CrossRef]
51. Muteliefu, G.; Enomoto, A.; Jiang, P.; Takahashi, M.; Niwa, T. Indoxyl sulphate induces oxidative stress and the expression of osteoblast-specific proteins in vascular smooth muscle cells. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2009**, *24*, 2051–2058. [CrossRef]
52. Dou, L.; Sallée, M.; Cerini, C.; Poitevin, S.; Gondouin, B.; Jourde-Chiche, N.; Fallague, K.; Brunet, P.; Calaf, R.; Dussol, B.; et al. The cardiovascular effect of the uremic solute indole-3 acetic acid. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2015**, *26*, 876–887. [CrossRef] [PubMed]
53. Watanabe, H.; Miyamoto, Y.; Enoki, Y.; Ishima, Y.; Kadowaki, D.; Kotani, S.; Nakajima, M.; Tanaka, M.; Matsushita, K.; Mori, Y.; et al. p-Cresyl sulfate, a uremic toxin, causes vascular endothelial and smooth muscle cell damages by inducing oxidative stress. *Pharmacol. Res. Perspect.* **2015**, *3*, e00092. [CrossRef] [PubMed]
54. Di Marco, G.S.; Hausberg, M.; Hillebrand, U.; Rustemeyer, P.; Wittkowski, W.; Lang, D.; Pavenstadt, H. Increased inorganic phosphate induces human endothelial cell apoptosis in vitro. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* **2008**, *294*, F1381–F1387. [CrossRef] [PubMed]
55. d’Apolito, M.; Colia, A.L.; Manca, E.; Pettoello-Mantovani, M.; Sacco, M.; Maffione, A.B.; Brownlee, M.; Giardino, I. Urea memory: Transient cell exposure to urea causes persistent mitochondrial ROS production and endothelial dysfunction. *Toxins* **2018**, *10*, 410. [CrossRef] [PubMed]
56. d’Apolito, M.; Colia, A.L.; Lasalvia, M.; Capozzi, V.; Falcone, M.P.; Pettoello-Mantovani, M.; Brownlee, M.; Maffione, A.B.; Giardino, I. Urea-induced ROS accelerate senescence in endothelial progenitor cells. *Atherosclerosis* **2017**, *263*, 127–136. [CrossRef]
57. d’Apolito, M.; Du, X.; Pisanelli, D.; Pettoello-Mantovani, M.; Campanozzi, A.; Giacco, F.; Maffione, A.B.; Colia, A.L.; Brownlee, M.; Giardino, I. Urea-induced ROS cause endothelial dysfunction in chronic renal failure. *Atherosclerosis* **2015**, *239*, 393–400. [CrossRef]
58. Schepers, E.; Meert, N.; Glorieux, G.; Goeman, J.; Van der Eycken, J.; Vanholder, R. P-cresylsulphate, the main in vivo metabolite of p-cresol, activates leucocyte free radical production. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2007**, *22*, 592–596. [CrossRef]
59. Itoh, Y.; Ezawa, A.; Kikuchi, K.; Tsuruta, Y.; Niwa, T. Protein-bound uremic toxins in hemodialysis patients measured by liquid chromatography/tandem mass spectrometry and their effects on endothelial ROS production. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403*, 1841–1850. [CrossRef]
60. Huang, M.; Wei, R.; Wang, Y.; Su, T.; Li, P.; Chen, X. The uremic toxin hippurate promotes endothelial dysfunction via the activation of Drp1-mediated mitochondrial fission. *Redox Biol.* **2018**, *16*, 303–313. [CrossRef]
61. Shang, F.; Wang, S.C.; Hsu, C.Y.; Miao, Y.; Martin, M.; Yin, Y.; Wu, C.C.; Wang, Y.T.; Wu, G.; Chien, S.; et al. MicroRNA-92a mediates endothelial dysfunction in CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2017**, *28*, 3251–3261. [CrossRef]
62. Tumur, Z.; Shimizu, H.; Enomoto, A.; Miyazaki, H.; Niwa, T. Indoxyl sulfate upregulates expression of ICAM-1 and MCP-1 by oxidative stress-induced NF-κB activation. *Am. J. Nephrol.* **2010**, *31*, 435–441. [CrossRef] [PubMed]
63. Ito, S.; Osaka, M.; Higuchi, Y.; Nishijima, F.; Ishii, H.; Yoshida, M. Indoxyl sulfate induces leukocyte-endothelial interactions through up-regulation of E-selectin. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 38869–38875. [CrossRef]
64. Yamamoto, H.; Tsuruoka, S.; Ioka, T.; Ando, H.; Ito, C.; Akimoto, T.; Fujimura, A.; Asano, Y.; Kusano, E. Indoxyl sulfate stimulates proliferation of rat vascular smooth muscle cells. *Kidney Int.* **2006**, *69*, 1780–1785. [CrossRef] [PubMed]
65. Gross, P.; Massy, Z.A.; Henaut, L.; Boudot, C.; Cagnard, J.; March, C.; Kamel, S.; Druke, T.B.; Six, I. Para-cresyl sulfate acutely impairs vascular reactivity and induces vascular remodeling. *J. Cell. Physiol.* **2015**, *230*, 2927–2935. [CrossRef] [PubMed]

66. Meijers, B.K.; Verbeke, K.; Dehaen, W.; Vanrenterghem, Y.; Hoylaerts, M.F.; Evenepoel, P.; Evenepoel, P. The uremic retention solute p-cresyl sulfate and markers of endothelial damage. *Am. J. Kidney Dis.* **2009**, *54*, 891–901. [CrossRef]
67. 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]
68. Rahabi-Layachi, H.; Orouda, R.; Boullier, A.; Massy, Z.A.; Amant, C. Distinct effects of inorganic phosphate on cell cycle and apoptosis in human vascular smooth muscle cells. *J. Cell. Physiol.* **2015**, *230*, 347–355. [CrossRef]
69. Di Marco, G.S.; König, M.; Stock, C.; Wiesinger, A.; Hillebrand, U.; Reiermann, S.; Reuter, S.; Amler, S.; Köhler, G.; Buck, F.; et al. High phosphate directly affects endothelial function by downregulating annexin II. *Kidney Int.* **2013**, *83*, 213–222. [CrossRef]
70. Six, I.; Maizel, J.; Barreto, F.C.; Rangrez, A.Y.; Dupont, S.; Slama, M.; Tribouilloy, C.; Choukroun, G.; Maziere, J.C.; Bode-Boeger, S.; et al. Effects of phosphate on vascular function under normal conditions and influence of the uraemic state. *Cardiovasc. Res.* **2012**, *96*, 130–139. [CrossRef]
71. Shigematsu, T.; Kono, T.; Satoh, K.; Yokoyama, K.; Yoshida, T.; Hosoya, T.; Shirai, K. Phosphate overload accelerates vascular calcium deposition in end-stage renal disease patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2003**, *18*, iii86–iii89. [CrossRef]
72. Lee, H.W.; Nizet, V.; An, J.N.; Lee, H.S.; Song, Y.R.; Kim, S.G.; Kim, J.K. Uremic serum damages endothelium by provoking excessive neutrophil extracellular trap formation. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 593.
73. Maciel, R.A.; Cunha, R.S.; Busato, V.; Franco, C.R.; Gregório, P.C.; Dolenga, C.J.; Nakao, L.S.; Massy, Z.A.; Boullier, A.; Pecóts-Filho, R.; et al. Uremia impacts VE-cadherin and ZO-1 expression in human endothelial cell-to-cell junctions. *Toxins* **2018**, *10*, 404. [CrossRef] [PubMed]
74. Trécherel, E.; Godin, C.; Louandre, C.; Benchitrit, J.; Poirot, S.; Mazière, J.C.; Massy, Z.A.; Galmiche, A. Upregulation of BAD, a pro-apoptotic protein of the BCL2 family, in vascular smooth muscle cells exposed to uremic conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *417*, 479–483. [CrossRef] [PubMed]
75. Sun, J.T.; Yang, K.; Lu, L.; Zhu, Z.B.; Zhu, J.Z.; Ni, J.W.; Han, H.; Chen, N.; Zhang, R.Y. Increased carbamylation level of HDL in end-stage renal disease: carbamylated-HDL attenuated endothelial cell function. *Am. J.-Physiol. Ren. Physiol.* **2016**, *310*, F511–F517. [CrossRef]
76. Zhang, X.; Li, Y.; Yang, P.; Liu, X.; Lu, L.; Chen, Y.; Zhong, X.; Li, Z.; Liu, H.; Ou, C.; et al. Trimethylamine-N-Oxide promotes vascular calcification through activation of NLRP3 (nucleotide-binding domain, Leucine-Rich-Containing family, pyrin Domain-Containing-3) inflammasome and NF- κ B (nuclear factor κ B) signals. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2020**, *40*, 751–765. [CrossRef]
77. Ma, G.; Pan, B.; Chen, Y.; Guo, C.; Zhao, M.; Zheng, L.; Chen, B. Trimethylamine N-oxide in atherosclerosis: Impairing endothelial self-repair capacity and enhancing monocyte adhesion. *Biosci. Rep.* **2017**, *37*. Available online: <https://pdfs.semanticscholar.org/8ce6/2000e849c3249c7791eb0006a8cadc71d7dd.pdf> (accessed on 18 March 2022). [CrossRef]
78. Boini, K.M.; Hussain, T.; Li, P.L.; Koka, S.S. Trimethylamine-N-oxide instigates NLRP3 inflammasome activation and endothelial dysfunction. *Cell. Physiol. Biochem.* **2017**, *44*, 152–162. [CrossRef]
79. Sun, X.; Jiao, X.; Ma, Y.; Liu, Y.; Zhang, L.; He, Y.; Chen, Y. Trimethylamine N-oxide induces inflammation and endothelial dysfunction in human umbilical vein endothelial cells via activating ROS-TXNIP-NLRP3 inflammasome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *481*, 63–70. [CrossRef]
80. He, X.; Jiang, H.; Gao, F.; Liang, S.; Wei, M.; Chen, L. Indoxyl sulfate-induced calcification of vascular smooth muscle cells via the PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway. *Microsc. Res. Tech.* **2019**, *82*, 2000–2006. [CrossRef]
81. Chen, J.; Zhang, X.; Zhang, H.; Liu, T.; Zhang, H.; Teng, J.; Ji, J.; Ding, X. Indoxyl sulfate enhance the hypermethylation of klotho and promote the process of vascular calcification in chronic kidney disease. *Int. J. Biol. Sci.* **2016**, *12*, 1236. [CrossRef]
82. Bouabdallah, J.; Zibara, K.; Issa, H.; Lenglet, G.; Kchour, G.; Caus, T.; Six, I.; Choukroun, G.; Kamel, S.; Bennis, Y. Endothelial cells exposed to phosphate and indoxyl sulphate promote vascular calcification through interleukin-8 secretion. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2019**, *34*, 1125–1134. [CrossRef] [PubMed]
83. Jover, E.; Silvente, A.; Marin, F.; Martinez-Gonzalez, J.; Orriols, M.; Martinez, C.M.; Puche, C.M.; Valdés, M.; Rodriguez, C.; Hernández-Romero, D. Inhibition of enzymes involved in collagen cross-linking reduces vascular smooth muscle cell calcification. *FASEB J.* **2018**, *32*, 4459–4469. [CrossRef] [PubMed]
84. Zhang, D.; Bi, X.; Liu, Y.; Huang, Y.; Xiong, J.; Xu, X.; Xiao, T.; Yu, Y.; Jiang, W.; Huang, Y.; et al. High phosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells is associated with the TLR4/NF- κ b signaling pathway. *Kidney Blood Press. Res.* **2017**, *42*, 1205–1215. [CrossRef]
85. Alesutan, I.; Voelkl, J.; Feger, M.; Kratschmar, D.V.; Castor, T.; Mia, S.; Sacherer, M.; Viereck, R.; Borst, O.; Leibrock, C.; et al. Involvement of vascular aldosterone synthase in phosphate-induced osteogenic transformation of vascular smooth muscle cells. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 2059. [CrossRef] [PubMed]
86. M’Baya-Moutoula, E.; Louvet, L.; Metzinger-Le Meuth, V.; Massy, Z.A.; Metzinger, L. High inorganic phosphate concentration inhibits osteoclastogenesis by modulating miR-223. *Biochim. Biophys. Acta-(Bba)-Mol. Basis Dis.* **2015**, *1852*, 2202–2212. [CrossRef]
87. Ciceri, P.; Elli, F.; Cappelletti, L.; Tosi, D.; Braidotti, P.; Bulfamante, G.; Cozzolino, M. A new in vitro model to delay high phosphate-induced vascular calcification progression. *Mol. Cell. Biochem.* **2015**, *410*, 197–206. [CrossRef]
88. Guerrero, F.; Montes de Oca, A.; Aguilera-Tejero, E.; Zafra, R.; Rodríguez, M.; López, I. The effect of vitamin D derivatives on vascular calcification associated with inflammation. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2012**, *27*, 2206–2212. [CrossRef]

89. Shroff, R.C.; McNair, R.; Skepper, J.N.; Figg, N.; Schurgers, L.J.; Deanfield, J.; Rees, L.; Shanahan, C.M. Chronic mineral dysregulation promotes vascular smooth muscle cell adaptation and extracellular matrix calcification. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2010**, *21*, 103–112. [[CrossRef](#)]
90. Tang, W.H.; Wang, C.P.; Chung, F.M.; Huang, L.L.; Yu, T.H.; Hung, W.C.; Lu, L.F.; Chen, P.Y.; Luo, C.H.; Lee, K.T.; et al. Uremic retention solute indoxyl sulfate level is associated with prolonged QTc interval in early CKD patients. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0119545. [[CrossRef](#)]
91. Lekawanvijit, S.; Adrahtas, A.; Kelly, D.J.; Kompa, A.R.; Wang, B.H.; Krum, H. Does indoxyl sulfate, a uremic toxin, have direct effects on cardiac fibroblasts and myocytes? *Eur. Heart J.* **2010**, *31*, 1771–1779. [[CrossRef](#)]
92. Liu, S.; Wang, B.H.; Kompa, A.R.; Lekawanvijit, S.; Krum, H. Antagonists of organic anion transporters 1 and 3 ameliorate adverse cardiac remodelling induced by uremic toxin indoxyl sulfate. *Int. J. Cardiol.* **2012**, *158*, 457–458. [[CrossRef](#)]
93. Lano, G.; Laforêt, M.; Von Kotze, C.; Perrin, J.; Addi, T.; Brunet, P.; Poitevin, S.; Burtey, S.; Dou, L. Aryl hydrocarbon receptor activation and tissue factor induction by fluid shear stress and indoxyl sulfate in endothelial cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2392. [[CrossRef](#)]
94. Chitalia, V.C.; Shivanna, S.; Martorell, J.; Balcells, M.; Bosch, I.; Kolandaivelu, K.; Edelman, E.R. Uremic serum and solutes increase post-vascular interventional thrombotic risk through altered stability of smooth muscle cell tissue factor. *Circulation* **2013**, *127*, 365–376. [[CrossRef](#)]
95. 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](#)]
96. 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](#)]
97. Nagy, E.; Liu, Y.; Prentice, K.J.; Sloop, K.W.; Sanders, P.E.; Batchuluun, B.; Hammond, C.D.; Wheeler, M.B.; Durham, T.B. Synthesis and characterization of urofuranic acids: In vivo metabolism of 2-(2-Carboxyethyl)-4-methyl-5-propylfuran-3-carboxylic acid (CMFP) and effects on in vitro insulin secretion. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 1860–1875. [[CrossRef](#)]
98. D’Apolito, M.; Du, X.; Zong, H.; Catucci, A.; Maiuri, L.; Trivisano, T.; Pettoello-Mantovani, M.; Campanozzi, A.; Raia, V.; Pessin, J.E.; et al. Urea-induced ROS generation causes insulin resistance in mice with chronic renal failure. *J. Clin. Investig.* **2010**, *120*, 203–213. [[CrossRef](#)]
99. Cohen, G.; Glorieux, G.; Thornalley, P.; Schepers, E.; Meert, N.; Jankowski, J.; Jankowski, V.; Argiles, A.; Anderstam, B.; Brunet, P.; et al. Review on uremic toxins III: Recommendations for handling uremic retention solutes in vitro—Towards a standardized approach for research on uremia. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2007**, *22*, 3381–3390. [[CrossRef](#)]
100. Massy, Z.A.; Drueke, T.B. Role of uremic toxins in vascular disease—the end of nihilism? *Kidney Int.* **2022**, *22*, S0085–S2538. [[CrossRef](#)]
101. Hung, S.C.; Kuo, K.L.; Huang, H.L.; Lin, C.C.; Tsai, T.H.; Wang, C.H.; Chen, J.W.; Lin, S.J.; Huang, P.H.; Tarng, D.C. Indoxyl sulfate suppresses endothelial progenitor cell-mediated neovascularization. *Kidney Int.* **2016**, *89*, 574–585. [[CrossRef](#)]
102. Matsumoto, T.; Kojima, M.; Takayanagi, K.; Taguchi, K.; Kobayashi, T. Trimethylamine-N-oxide specifically impairs endothelium-derived hyperpolarizing factor-type relaxation in rat femoral artery. *Biol. Pharm. Bull.* **2020**, *43*, 569–573. [[CrossRef](#)]
103. Han, H.; Chen, Y.; Zhu, Z.; Su, X.; Ni, J.; Du, R.; Zhang, R.; Jin, W. p-Cresyl sulfate promotes the formation of atherosclerotic lesions and induces plaque instability by targeting vascular smooth muscle cells. *Front. Med.* **2016**, *10*, 320–329. [[CrossRef](#)]
104. Geng, J.; Yang, C.; Wang, B.; Zhang, X.; Hu, T.; Gu, Y.; Li, J. Trimethylamine N-oxide promotes atherosclerosis via CD36-dependent MAPK/JNK pathway. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *97*, 941–947. [[CrossRef](#)]
105. Seldin, M.M.; Meng, Y.; Qi, H.; Zhu, W.; Wang, Z.; Hazen, S.L.; Lusis, A.J.; Shih, D.M. Trimethylamine N-oxide promotes vascular inflammation through signaling of mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- κ B. *J. Am. Heart Assoc.* **2016**, *5*, e002767. [[CrossRef](#)]
106. Koeth, R.A.; Wang, Z.; Levison, B.S.; Buffa, J.A.; Org, E.; Sheehy, B.T.; Britt, E.B.; Fu, X.; Wu, Y.; Li, L.; et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 576–585. [[CrossRef](#)]
107. Massy, Z.A.; Ivanovski, O.; Nguyen-Khoa, T.; Angulo, J.; Szumilak, D.; Mothu, N.; Phan, O.; Daudon, M.; Lacour, B.; Drüeke, T.B.; et al. Uremia accelerates both atherosclerosis and arterial calcification in apolipoprotein E knockout mice. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2005**, *16*, 109–116. [[CrossRef](#)]
108. Kuo, K.L.; Zhao, J.F.; Huang, P.H.; Guo, B.C.; Tarng, D.C.; Lee, T.S. Indoxyl sulfate impairs valsartan-induced neovascularization. *Redox Biol.* **2020**, *30*, 101433. [[CrossRef](#)]
109. Opdebeeck, B.; Maudsley, S.; Azmi, A.; De Maré, A.; De Leger, W.; Meijers, B.; Verhulst, A.; Evenepoel, P.; D’Haese, P.C.; Neven, E. Indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate promote vascular calcification and associate with glucose intolerance. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2019**, *30*, 751–766. [[CrossRef](#)]
110. Muteliefu, G.; Shimizu, H.; Enomoto, A.; Nishijima, F.; Takahashi, M.; Niwa, T. Indoxyl sulfate promotes vascular smooth muscle cell senescence with upregulation of p53, p21, and prelamin A through oxidative stress. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **2012**, *303*, C126–C134. [[CrossRef](#)]
111. Adijiang, A.; Higuchi, Y.; Nishijima, F.; Shimizu, H.; Niwa, T. Indoxyl sulfate, a uremic toxin, promotes cell senescence in aorta of hypertensive rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *399*, 637–641. [[CrossRef](#)]

112. Adijiang, A.; Goto, S.; Uramoto, S.; Nishijima, F.; Niwa, T. Indoxyl sulphate promotes aortic calcification with expression of osteoblast-specific proteins in hypertensive rats. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2008**, *23*, 1892–1901. [CrossRef]
113. Crouthamel, M.H.; Lau, W.L.; Leaf, E.M.; Chavkin, N.W.; Wallingford, M.C.; Peterson, D.F.; Li, X.; Liu, Y.; Chin, M.T.; Levi, M.; et al. Sodium-dependent phosphate cotransporters and phosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells: Redundant roles for PiT-1 and PiT-2. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2013**, *33*, 2625–2632. [CrossRef]
114. Lau, W.L.; Linnes, M.; Chu, E.Y.; Foster, B.L.; Bartley, B.A.; Somerman, M.J.; Giachelli, C.M. High phosphate feeding promotes mineral and bone abnormalities in mice with chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2013**, *28*, 62–69. [CrossRef]
115. El-Abbadia, M.M.; Pai, A.S.; Leaf, E.M.; Yang, H.Y.; Bartley, B.A.; Quan, K.K.; Ingalls, C.M.; Liao, H.W.; Giachelli, C.M. Phosphate feeding induces arterial medial calcification in uremic mice: Role of serum phosphorus, fibroblast growth factor-23, and osteopontin. *Kidney Int.* **2009**, *75*, 1297–1307. [CrossRef]
116. Yamada, S.; Tokumoto, M.; Tatsumoto, N.; Taniguchi, M.; Noguchi, H.; Nakano, T.; Masutani, K.; Ooboshi, H.; Tsuruya, K.; Kitazono, T. Phosphate overload directly induces systemic inflammation and malnutrition as well as vascular calcification in uremia. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* **2014**, *306*, F1418–F1428. [CrossRef]
117. Graciolli, F.G.; Neves, K.R.; dos Reis, L.M.; Graciolli, R.G.; Noronha, I.L.; Moysés, R.M.; Jorgetti, V. Phosphorus overload and PTH induce aortic expression of Runx2 in experimental uremia. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2009**, *24*, 1416–1421. [CrossRef]
118. Hosaka, N.; Mizobuchi, M.; Ogata, H.; Kumata, C.; Kondo, F.; Koiwa, F.; Kinugasa, E.; Akizawa, T. Elastin degradation accelerates phosphate-induced mineralization of vascular smooth muscle cells. *Calcif. Tissue Int.* **2009**, *85*, 523–529. [CrossRef]
119. Yisireyili, M.; Shimizu, H.; Saito, S.; Enomoto, A.; Nishijima, F.; Niwa, T. Indoxyl sulfate promotes cardiac fibrosis with enhanced oxidative stress in hypertensive rats. *Life Sci.* **2013**, *92*, 1180–1185. [CrossRef]
120. Lekawanvijit, S.; Kompa, A.R.; Manabe, M.; Wang, B.H.; Langham, R.G.; Nishijima, F.; Kelly, D.J.; Krum, H. Chronic kidney disease-induced cardiac fibrosis is ameliorated by reducing circulating levels of a non-dialysable uremic toxin, indoxyl sulfate. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e41281. [CrossRef]
121. Chen, W.T.; Chen, Y.C.; Hsieh, M.H.; Huang, S.Y.; Kao, Y.H.; Chen, Y.A.; Lin, Y.K.; Chen, S.A.; Chen, Y.J. The uremic toxin indoxyl sulfate increases pulmonary vein and atrial arrhythmogenesis. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **2015**, *26*, 203–210. [CrossRef]
122. Zhu, H.; Pan, L.; Dai, Y.; Zheng, D.; Cai, S. Role of TLR4/MyD88 Signaling Pathway in the Occurrence and Development of Uremia-Induced Myocardial Hypertrophy and Possible Mechanism. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* **2021**, *2021*, 7883643. [CrossRef]
123. Hu, M.C.; Shi, M.; Cho, H.J.; Adams-Huet, B.; Paek, J.; Hill, K.; Shelton, J.; Amaral, A.P.; Faul, C.; Taniguchi, M.; et al. Klotho and phosphate are modulators of pathologic uremic cardiac remodeling. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2015**, *26*, 1290–1302. [CrossRef]
124. Prommer, H.U.; Maurer, J.; von Websky, K.; Freise, C.; Sommer, K.; Nasser, H.; Samapati, R.; Reglin, B.; Guimarães, P.; Pries, A.R.; et al. Chronic kidney disease induces a systemic microangiopathy, tissue hypoxia and dysfunctional angiogenesis. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 3075. [CrossRef]
125. Carmona, A.A.; Rigon, B.G.d.S.; Barroso, M.P.B.S.; Hauser, A.B.; Précoma, D.; Bucharles, S.; Noronha, L.D.; Pécoits-Filho, R. Induction of systemic inflammation and thickening of subepicardiac arteries in an animal model of uremia. *Braz. J. Nephrol.* **2011**, *33*, 408–412. [CrossRef]
126. Han, H.; Zhu, J.; Zhu, Z.; Ni, J.; Du, R.; Dai, Y.; Chen, Y.; Wu, Z.; Lu, L.; Zhang, R. p-Cresyl sulfate aggravates cardiac dysfunction associated with chronic kidney disease by enhancing apoptosis of cardiomyocytes. *J. Am. Heart Assoc.* **2015**, *4*, e001852. [CrossRef]
127. Yang, K.; Du, C.; Wang, X.; Li, F.; Xu, Y.; Wang, S.; Chen, S.; Chen, F.; Shen, M.; Chen, M.; et al. Indoxyl sulfate induces platelet hyperactivity and contributes to chronic kidney disease-associated thrombosis in mice. *Blood J. Am. Soc. Hematol.* **2017**, *129*, 2667–2679. [CrossRef]
128. Kolachalama, V.B.; Shashar, M.; Alousi, F.; Shivanna, S.; Rijal, K.; Belghasem, M.E.; Walker, J.; Matsuura, S.; Chang, G.H.; Gibson, C.M.; et al. Uremic solute-aryl hydrocarbon receptor-tissue factor axis associates with thrombosis after vascular injury in humans. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2018**, *29*, 1063–1072. [CrossRef]
129. Zhu, W.; Gregory, J.C.; Org, E.; Buffa, J.A.; Gupta, N.; Wang, Z.; Li, L.; Fu, X.; Wu, Y.; Mehrabian, M.; et al. Gut microbial metabolite TMAO enhances platelet hyperreactivity and thrombosis risk. *Cell* **2016**, *165*, 111–124. [CrossRef]
130. Koppe, L.; Nyam, E.; Vivot, K.; Fox, J.E.M.; Dai, X.Q.; Nguyen, B.N.; Trudel, D.; Attané, C.; Mouillé, V.S.; MacDonald, P.E.; et al. Urea impairs β cell glycolysis and insulin secretion in chronic kidney disease. *J. Clin. Investig.* **2016**, *126*, 3598–3612. [CrossRef]
131. Carracedo, J.; Buendía, P.; Merino, A.; Soriano, S.; Esquivias, E.; Martín-Malo, A.; Aljama, P.; Ramírez, R. Cellular senescence determines endothelial cell damage induced by uremia. *Exp. Gerontol.* **2013**, *48*, 766–773. [CrossRef]
132. Li, T.; Gua, C.; Wu, B.; Chen, Y. Increased circulating trimethylamine N-oxide contributes to endothelial dysfunction in a rat model of chronic kidney disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *495*, 2071–2077. [CrossRef] [PubMed]
133. Koppe, L.; Alix, P.M.; Croze, M.L.; Chambert, S.; Vanholder, R.; Glorieux, G.; Fouque, D.; Soulage, C.O. p-Cresyl glucuronide is a major metabolite of p-cresol in mouse: In contrast to p-cresyl sulphate, p-cresyl glucuronide fails to promote insulin resistance. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2017**, *32*, 2000–2009. [CrossRef] [PubMed]
134. Koppe, L.; Pillon, N.J.; Vella, R.E.; Croze, M.L.; Pelletier, C.C.; Chambert, S.; Massy, Z.; Glorieux, G.; Vanholder, R.; Dugenet, Y.; et al. p-Cresyl sulfate promotes insulin resistance associated with CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2013**, *24*, 88–99. [CrossRef] [PubMed]
135. Fan, P.C.; Chang, J.C.H.; Lin, C.N.; Lee, C.C.; Chen, Y.T.; Chu, P.H.; Kou, G.; Lu, Y.A.; Yang, C.W.; Chen, Y.C. Serum indoxyl sulfate predicts adverse cardiovascular events in patients with chronic kidney disease. *J. Formos. Med. Assoc.* **2019**, *118*, 1099–1106. [CrossRef] [PubMed]

136. Konje, V.C.; Rajendiran, T.M.; Bellovich, K.; Gadegbeku, C.A.; Gipson, D.S.; Afshinnia, F.; Mathew, A.V.; The Michigan Kidney Translational Core CPROBE Investigator Group. Tryptophan levels associate with incident cardiovascular disease in chronic kidney disease. *Clin. Kidney J.* **2021**, *14*, 1097–1105. [[CrossRef](#)]
137. Wu, I.W.; Hsu, K.H.; Hsu, H.J.; Lee, C.C.; Sun, C.Y.; Tsai, C.J.; Wu, M.S. Serum free p-cresyl sulfate levels predict cardiovascular and all-cause mortality in elderly hemodialysis patients—a prospective cohort study. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2012**, *27*, 1169–1175. [[CrossRef](#)]
138. Liabeuf, S.; Glorieux, G.; Lenglet, A.; Diouf, M.; Schepers, E.; Desjardins, L.; Choukroun, G.; Vanholder, R.; Massy, Z.A.; European Uremic Toxin (EUTox) Work Group. Does p-cresylglucuronide have the same impact on mortality as other protein-bound uremic toxins? *PLoS ONE* **2013**, *8*, e67168. [[CrossRef](#)]
139. McGovern, A.P.; de Lusignan, S.; van Vlymen, J.; Liyanage, H.; Tomson, C.R.; Gallagher, H.; Rafiq, M.; Jones, S. Serum phosphate as a risk factor for cardiovascular events in people with and without chronic kidney disease: A large community based cohort study. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e74996. [[CrossRef](#)]
140. Kimata, N.; Albert, J.M.; Akiba, T.; Yamazaki, S.; Kawaguchi, Y.; Fukuhara, S.; Akizawa, T.; Saito, A.; Asano, Y.; Kurokawa, K.; et al. Association of mineral metabolism factors with all-cause and cardiovascular mortality in hemodialysis patients: The Japan dialysis outcomes and practice patterns study. *Hemodial. Int.* **2007**, *11*, 340–348. [[CrossRef](#)]
141. Slinin, Y.; Foley, R.N.; Collins, A.J. Calcium, phosphorus, parathyroid hormone, and cardiovascular disease in hemodialysis patients: The USRDS waves 1, 3, and 4 study. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2005**, *16*, 1788–1793. [[CrossRef](#)]
142. Young, E.W.; Albert, J.M.; Satayathum, S.; Goodkin, D.A.; Pisoni, R.L.; Akiba, T.; Akizawa, T.; Kurokawa, K.; Bommer, J.; Piera, L.; et al. Predictors and consequences of altered mineral metabolism: The Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study. *Kidney Int.* **2005**, *67*, 1179–1187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. 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](#)] [[PubMed](#)]
144. Shafi, T.; Powe, N.R.; Meyer, T.W.; Hwang, S.; Hai, X.; Melamed, M.L.; Banerjee, T.; Coresh, J.; Hostetter, T.H. Trimethylamine N-oxide and cardiovascular events in hemodialysis patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2017**, *28*, 321–331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Six, I.; Flissi, N.; Lenglet, G.; Louvet, L.; Kamel, S.; Gallet, M.; Massy, Z.A.; Liabeuf, S. Uremic toxins and vascular dysfunction. *Toxins* **2020**, *12*, 404. [[CrossRef](#)]
146. Berg, A.H.; Drechsler, C.; Wenger, J.; Buccafusca, R.; Hod, T.; Kalim, S.; Ramma, W.; Parikh, S.M.; Steen, H.; Friedman, D.J.; et al. Carbamylation of serum albumin as a risk factor for mortality in patients with kidney failure. *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5*, 175ra29. [[CrossRef](#)]
147. Chen, Y.; Zelnick, L.R.; Huber, M.P.; Wang, K.; Bansal, N.; Hoofnagle, A.N.; Paranjji, R.K.; Heckbert, S.R.; Weiss, N.S.; Go, A.S.; et al. Association Between Kidney Clearance of Secretory Solutes and Cardiovascular Events: The Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) Study. *Am. J. Kidney Dis.* **2021**, *78*, 226–235.e1. [[CrossRef](#)]
148. Shafi, T.; Sirich, T.L.; Meyer, T.W.; Hostetter, T.H.; Plummer, N.S.; Hwang, S.; Melamed, M.L.; Banerjee, T.; Coresh, J.; Powe, N.R. Results of the HEMO Study suggest that p-cresol sulfate and indoxyl sulfate are not associated with cardiovascular outcomes. *Kidney Int.* **2017**, *92*, 1484–1492. [[CrossRef](#)]
149. Luce, M.; Bouchara, A.; Pastural, M.; Granjon, S.; Szelag, J.C.; Laville, M.; Arkouche, W.; Fouque, D.; Soulage, C.O.; Koppe, L. Is 3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionate (CMPF) a Clinically Relevant Uremic Toxin in Haemodialysis Patients? *Toxins* **2018**, *10*, 205. [[CrossRef](#)]
150. Menon, V.; Greene, T.; Pereira, A.A.; Wang, X.; Beck, G.J.; Kusek, J.W.; Collins, A.J.; Levey, A.S.; Sarnak, M.J. Relationship of phosphorus and calcium-phosphorus product with mortality in CKD. *Am. J. Kidney Dis.* **2005**, *46*, 455–463. [[CrossRef](#)]
151. Kayser, G.A.; Johansen, K.L.; Chertow, G.M.; Dalrymple, L.S.; Kornak, J.; Grimes, B.; Dwyer, T.; Chassy, A.W.; Fiehn, O. Associations of trimethylamine N-oxide with nutritional and inflammatory biomarkers and cardiovascular outcomes in patients new to dialysis. *J. Ren. Nutr.* **2015**, *25*, 351–356. [[CrossRef](#)]
152. 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. *Atherosclerosis* **2012**, *225*, 173–179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
153. Shafi, T.; Meyer, T.W.; Hostetter, T.H.; Melamed, M.L.; Parekh, R.S.; Hwang, S.; Banerjee, T.; Coresh, J.; Powe, N.R. Free levels of selected organic solutes and cardiovascular morbidity and mortality in hemodialysis patients: Results from the retained organic solutes and clinical outcomes (ROSCO) investigators. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0126048. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Hsu, C.C.; Lu, Y.C.; Chiu, C.A.; Yu, T.H.; Hung, W.C.; Wang, C.P.; Lu, L.F.; Chung, F.M.; Lee, Y.J.; Tsai, I.T. Levels of indoxyl sulfate are associated with severity of coronary atherosclerosis. *Clin. Investig. Med.* **2013**, *36*, E42–E49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. 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](#)]
156. Taki, K.; Tsuruta, Y.; Niwa, T. Indoxyl sulfate and atherosclerotic risk factors in hemodialysis patients. *Am. J. Nephrol.* **2007**, *27*, 30–35. [[CrossRef](#)]
157. Lin, C.J.; Wu, C.J.; Pan, C.F.; Chen, Y.C.; Sun, F.J.; Chen, H.H. Serum protein-bound uraemic toxins and clinical outcomes in haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2010**, *25*, 3693–3700. [[CrossRef](#)]

158. Poesen, R.; Evenepoel, P.; de Loor, H.; Kuypers, D.; Augustijns, P.; Meijers, B. Metabolism, protein binding, and renal clearance of microbiota-derived p-cresol in patients with CKD. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2016**, *11*, 1136–1144. [[CrossRef](#)]
159. Poesen, R.; Claes, K.; Evenepoel, P.; de Loor, H.; Augustijns, P.; Kuypers, D.; Meijers, B. Microbiota-derived phenylacetylglutamine associates with overall mortality and cardiovascular disease in patients with CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2016**, *27*, 3479–3487. [[CrossRef](#)]
160. Wang, C.P.; Lu, L.F.; Yu, T.H.; Hung, W.C.; Chiu, C.A.; Chung, F.M.; Yeh, L.R.; Chen, H.J.; Lee, Y.J.; Houng, J.Y. Serum levels of total p-cresylsulphate are associated with angiographic coronary atherosclerosis severity in stable angina patients with early stage of renal failure. *Atherosclerosis* **2010**, *211*, 579–583. [[CrossRef](#)]
161. Nakamura, S.; Sasaki, O.; Nakahama, H.; Inenaga, T.; Kawano, Y. Clinical characteristics and survival in end-stage renal disease patients with arteriosclerosis obliterans. *Am. J. Nephrol.* **2002**, *22*, 422–428. [[CrossRef](#)]
162. Merhi, B.; Shireman, T.; Carpenter, M.A.; Kusek, J.W.; Jacques, P.; Pfeffer, M.; Rao, M.; Foster, M.C.; Kim, S.J.; Pesavento, T.E.; et al. Serum phosphorus and risk of cardiovascular disease, all-cause mortality, or graft failure in kidney transplant recipients: An ancillary study of the FAVORIT trial cohort. *Am. J. Kidney Dis.* **2017**, *70*, 377–385. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Eddington, H.; Hoefield, R.; Sinha, S.; Chrysochou, C.; Lane, B.; Foley, R.N.; Hegarty, J.; New, J.; O'Donoghue, D.J.; Middleton, R.J.; et al. Serum phosphate and mortality in patients with chronic kidney disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2010**, *5*, 2251–2257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Kestenbaum, B.; Sampson, J.N.; Rudser, K.D.; Patterson, D.J.; Seliger, S.L.; Young, B.; Sherrard, D.J.; Andress, D.L. Serum phosphate levels and mortality risk among people with chronic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2005**, *16*, 520–528. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
165. Stubbs, J.R.; House, J.A.; Ocque, A.J.; Zhang, S.; Johnson, C.; Kimber, C.; Schmidt, K.; Gupta, A.; Wetmore, J.B.; Nolin, T.D.; et al. Serum trimethylamine-N-oxide is elevated in CKD and correlates with coronary atherosclerosis burden. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2016**, *27*, 305–313. [[CrossRef](#)]
166. Kim, R.B.; Morse, B.L.; Djurdjev, O.; Tang, M.; Muirhead, N.; Barrett, B.; Holmes, D.T.; Madore, F.; Clase, C.M.; Rigatto, C.; et al. Advanced chronic kidney disease populations have elevated trimethylamine N-oxide levels associated with increased cardiovascular events. *Kidney Int.* **2016**, *89*, 1144–1152. [[CrossRef](#)]
167. Melamed, M.L.; Plantinga, L.; Shafi, T.; Parekh, R.; Meyer, T.W.; Hostetter, T.H.; Coresh, J.; Powe, N.R. Retained organic solutes, patient characteristics and all-cause and cardiovascular mortality in hemodialysis: Results from the retained organic solutes and clinical outcomes (ROSCO) investigators. *BMC Nephrol.* **2013**, *14*, 2579. [[CrossRef](#)]
168. Chinnappa, S.; Tu, Y.K.; Yeh, Y.C.; Glorieux, G.; Vanholder, R.; Mooney, A. Association between protein-bound uremic toxins and asymptomatic cardiac dysfunction in patients with chronic kidney disease. *Toxins* **2018**, *10*, 520. [[CrossRef](#)]
169. Cao, X.S.; Chen, J.; Zou, J.Z.; Zhong, Y.H.; Teng, J.; Ji, J.; Chen, Z.W.; Liu, Z.H.; Shen, B.; Nie, Y.X.; et al. Association of indoxyl sulfate with heart failure among patients on hemodialysis. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2015**, *10*, 111–119. [[CrossRef](#)]
170. Shimazu, S.; Hirashiki, A.; Okumura, T.; Yamada, T.; Okamoto, R.; Shinoda, N.; Takeshita, K.; Kondo, T.; Niwa, T.; Murohara, T. Association between indoxyl sulfate and cardiac dysfunction and prognosis in patients with dilated cardiomyopathy. *Circ. J.* **2013**, *77*, 390–396. [[CrossRef](#)]
171. Sato, B.; Yoshikawa, D.; Ishii, H.; Suzuki, S.; Inoue, Y.; Takeshita, K.; Tanaka, M.; Kumagai, S.; Matsumoto, M.; Okumura, S.; et al. Relation of plasma indoxyl sulfate levels and estimated glomerular filtration rate to left ventricular diastolic dysfunction. *Am. J. Cardiol.* **2013**, *111*, 712–716. [[CrossRef](#)]
172. Barreto, F.C.; Barreto, D.V.; Liabeuf, S.; Meert, N.; Glorieux, G.; Temmar, M.; Choukroun, G.; Vanholder, R.; Massy, Z.A.; 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](#)] [[PubMed](#)]
173. Zapolski, T.; Kamińska, A.; Kocki, T.; Wysokiński, A.; Urbanska, E.M. Aortic stiffness—Is kynurenic acid a novel marker? Cross-sectional study in patients with persistent atrial fibrillation. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0236413. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
174. Pawlak, K.; Myśliwiec, M.; Pawlak, D. Kynurenine pathway—a new link between endothelial dysfunction and carotid atherosclerosis in chronic kidney disease patients. *Adv. Med. Sci.* **2010**, *55*, 196–203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
175. 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.* **2010**, *25*, 1183–1191. [[CrossRef](#)]
176. Yu, T.H.; Tang, W.H.; Lu, Y.C.; Wang, C.P.; Hung, W.C.; Wu, C.C.; Tsai, I.T.; Chung, F.M.; Houng, J.Y.; Lan, W.C.; et al. Association between hippuric acid and left ventricular hypertrophy in maintenance hemodialysis patients. *Clin. Chim. Acta* **2018**, *484*, 47–51. [[CrossRef](#)]
177. Petchey, W.G.; Hawley, C.M.; Johnson, D.W.; Haluska, B.A.; Watkins, T.W.; Isbel, N.M. Multimodality vascular imaging in CKD: Divergence of risk between measured parameters. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2012**, *27*, 1004–1012. [[CrossRef](#)]
178. Adeney, K.L.; Siscovick, D.S.; Ix, J.H.; Seliger, S.L.; Shlipak, M.G.; Jenny, N.S.; Kestenbaum, B.R. Association of serum phosphate with vascular and valvular calcification in moderate CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2009**, *20*, 381–387. [[CrossRef](#)]
179. Ketteler, M.; Bongartz, P.; Westenfeld, R.; Wildberger, J.E.; Mahnken, A.H.; Böhm, R.; Metzger, T.; Wanner, C.; Jähnen-Dechent, W.; Floege, J. Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: A cross-sectional study. *Lancet* **2003**, *361*, 827–833. [[CrossRef](#)]

180. Ix, J.H.; De Boer, I.H.; Peralta, C.A.; Adeney, K.L.; Duprez, D.A.; Jenny, N.S.; Siscovick, D.S.; Kestenbaum, B.R. Serum phosphorus concentrations and arterial stiffness among individuals with normal kidney function to moderate kidney disease in MESA. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2009**, *4*, 609–615. [[CrossRef](#)]
181. Drechsler, C.; Kalim, S.; Wenger, J.B.; Suntharalingam, P.; Hod, T.; Thadhani, R.I.; Karumanchi, S.A.; Wanner, C.; Berg, A.H. Protein carbamylation is associated with heart failure and mortality in diabetic patients with end-stage renal disease. *Kidney Int.* **2015**, *87*, 1201–1208. [[CrossRef](#)]
182. Glorieux, G.; Vanholder, R.; Van Biesen, W.; Pletinck, A.; Schepers, E.; Neirynck, N.; Speeckaert, M.; De Bacquer, D.; Verbeke, F. Free p-cresyl sulfate shows the highest association with cardiovascular outcome in chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2021**, *36*, 998–1005. [[CrossRef](#)]
183. Scholz, A.; Plate, K.H.; Reiss, Y. Angiopoietin-2: A multifaceted cytokine that functions in both angiogenesis and inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2015**, *1347*, 45–51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
184. Wang, C.H.; Lai, Y.H.; Kuo, C.H.; Lin, Y.L.; Tsai, J.P.; Hsu, B.G. Association between serum indoxyl sulfate levels and endothelial function in non-dialysis chronic kidney disease. *Toxins* **2019**, *11*, 589. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
185. Jourde-Chiche, N.; Dou, L.; Sabatier, F.; Calaf, R.; Cerini, C.; Robert, S.; Camoin-Jau, L.; Charpiot, P.; Argiles, A.; Dignat-George, F.; et al. Levels of circulating endothelial progenitor cells are related to uremic toxins and vascular injury in hemodialysis patients. *J. Thromb. Haemost.* **2009**, *7*, 1576–1584. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
186. Pawlak, K.; Domaniewski, T.; Mysliwiec, M.; Pawlak, D. The kynurenines are associated with oxidative stress, inflammation and the prevalence of cardiovascular disease in patients with end-stage renal disease. *Atherosclerosis* **2009**, *204*, 309–314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
187. Pawlak, K.; Mysliwiec, M.; Pawlak, D. Haemostatic system, biochemical profiles, kynurenines and the prevalence of cardiovascular disease in peritoneally dialyzed patients. *Thromb. Res.* **2010**, *125*, e40–e45. [[CrossRef](#)]
188. Pawlak, K.; Domaniewski, T.; Mysliwiec, M.; Pawlak, D. Kynurenines and oxidative status are independently associated with thrombomodulin and von Willebrand factor levels in patients with end-stage renal disease. *Thromb. Res.* **2009**, *124*, 452–457. [[CrossRef](#)]
189. Pawlak, K.; Mysliwiec, M.; Pawlak, D. Hypercoagulability is independently associated with kynurene pathway activation in dialysed uraemic patients. *Thromb. Haemost.* **2009**, *102*, 49–55. [[CrossRef](#)]
190. Wu, C.C.; Hsieh, M.Y.; Hung, S.C.; Kuo, K.L.; Tsai, T.H.; Lai, C.L.; Chen, J.W.; Lin, S.J.; Huang, P.H.; Tarng, D.C. Serum indoxyl sulfate associates with postangioplasty thrombosis of dialysis grafts. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2016**, *27*, 1254–1264. [[CrossRef](#)]
191. Laville, S.M.; Massy, Z.A.; Kamel, S.; Chillon, J.M.; Choukroun, G.; Liabeuf, S. Intestinal Chelators, Sorbants, and Gut-Derived Uremic Toxins. *Toxins* **2021**, *13*, 91. [[CrossRef](#)]
192. Loftus, T.J.; Filiberto, A.C.; Ozrazgat-Baslanti, T.; Gopal, S.; Bihorac, A. Cardiovascular and renal disease in chronic critical illness. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 1601. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

1 *Annexe 2*

2 Study of the association between serum levels of kynurenine and cardiovascular
3 outcomes and overall mortality in chronic kidney disease

4

5 Carolla El Chamieh¹, Islam Amine Larabi^{2,3}, Natalia Alencar De Pinho¹, Oriane Lambert¹,
6 Christian Combe^{4,5}, Denis Fouque^{6,7}, Luc Frimat^{8,9}, Christian Jacquelinet^{1,10}, Maurice Laville⁷,
7 Solène Laville^{11,12}, Céline Lange¹, Jean-Claude Alvarez^{2,3}, Ziad A. Massy^{1,13}, Sophie
8 Liabeuf^{11,12},[#] on behalf of the Chronic Kidney Disease-Renal Epidemiology and Information
9 Network (CKD-REIN) Study Group

10 [#] These two authors contributed equally to the paper

11 ¹ Centre for Research in Epidemiology and Population Health (CESP), INSERM UMRS
12 1018, Université Paris-Saclay, Université Versailles Saint Quentin, Villejuif, France

13 ² Department of Pharmacology and Toxicology, Raymond Poincaré Hospital, AP-HP,
14 Garches, France

15 ³UVSQ, Université Paris-Saclay, Inserm U1018, CESP, Équipe MOODS, MasSpecLab,
16 Montigny-le-Bretonneux, France

17 ⁴ Service de Néphrologie Transplantation Dialyse Aphérèse, Centre Hospitalier Universitaire
18 de Bordeaux, Bordeaux, France

19 ⁵ INSERM, U1026, University Bordeaux, Bordeaux, France.

20 ⁶ Nephrology Dept, Centre Hospitalier Lyon Sud, Université de Lyon, Carmen, Pierre-Bénite,
21 France.

22 ⁷Université de Lyon, CarMeN INSERM 1060, Lyon, France.

23 ⁸Nephrology Department, CHRU de Nancy, Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

24 ⁹Lorraine University, APEMAC, Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

25 ¹⁰Biomedecine Agency, Saint Denis La Plaine, France.

26 ¹¹Pharmacoepidemiology Unit, Department of Clinical Pharmacology, Amiens-Picardie
27 University Medical Center, Amiens, France.

28 ¹²MP3CV Laboratory, Jules Verne University of Picardie, Amiens, France.

29 ¹³Department of Nephrology, Ambroise Paré University Hospital, APHP, Boulogne-
30 Billancourt, France.

31

32

33 Running head: Kynurenine and cardiovascular outcomes in chronic kidney disease.

34

35

36 Correspondence to:

37 Ziad Massy; E-mail: ziad.massy@aphp.fr

38 Sophie Liabeuf; E-mail: Liabeuf.Sophie@chu-amiens.fr

39 Natalia Alencar De Pinho; E-mail: natalia.alencar-de-pinho@inserm.fr

40

41

42

43

44

45 ABSTRACT

46

47 **Background.** Kynurenine is a protein-bound uremic toxin. Its circulating levels are increased
48 in chronic kidney disease (CKD). Experimental studies showed that it exerted deleterious
49 cardiovascular effects. We sought to evaluate an association between serum kynurenine levels
50 and adverse fatal or nonfatal cardiovascular events and all-cause mortality in CKD patients.

51 **Methods.** The CKD-REIN study is a prospective cohort of people with CKD having an
52 estimated glomerular filtration rate (eGFR) <60 ml/min/1.73m². Baseline frozen samples of
53 total and free fractions of kynurenine and tryptophan were measured using a validated liquid
54 chromatography tandem mass spectrometry technique. Cause-specific Cox models were used
55 to estimate hazard ratios (HRs) for each outcome.

56 **Results.** Of the 2406 included patients (median age: 68 years; median eGFR: 25 ml/min/1.73
57 m²), 52% had a history of cardiovascular disease. A doubling of serum free kynurenine levels
58 was associated with an 18%-increased hazard of cardiovascular events (466 events,
59 HR[95%CI]:1.18[1.02,1.33]), independently of eGFR, serum free tryptophan level or other
60 uremic toxins, cardioprotective drugs and traditional cardiovascular risk factors. Serum free
61 kynurenine was significantly associated with non-atheromatous cardiovascular events
62 (HR[95%CI]:1.26[1.03,1.50]), but not with atheromatous cardiovascular events
63 (HR[95%CI]:1.15[0.89,1.50]). The association of serum free kynurenine with cardiovascular
64 mortality was also independently significant (87 events; adjusted HR[95%CI]:1.64[1.10,2.40]).
65 However, the association of serum free kynurenine with all-cause mortality was no more
66 significant after adjustment on serum free tryptophan (311 events, HR[95%CI]:1.12[0.90,
67 1.40]).

68 **Conclusions.** Our findings imply that serum free kynurenine, independently of other
69 cardiovascular risk factors (including eGFR), is associated with fatal or nonfatal cardiovascular

70 outcomes, particularly non-atheromatous cardiovascular events; in patients with CKD.

71 Strategies to reduce serum kynurenine levels should be evaluated in further studies.

72 **Keywords:** all-cause mortality, cardiovascular disease, chronic kidney disease, kynurenine

73 ***What was known:**

74 -Kynurenine is a protein-bound uremic toxin derived from tryptophan metabolism.

75 Experimental studies showed that kynurenine caused endothelial cell dysfunction, abnormal

76 angiogenesis and vascular thrombosis.

77 -Very few clinical studies have shown the association between total kynurenine levels and

78 cardiovascular disease in pre-dialysis CKD patients, none of them measured free kynurenine

79 levels.

80 ***This study adds:**

81 - Serum free kynurenine levels are associated with fatal or nonfatal cardiovascular events in

82 patients with CKD, independently of eGFR, serum free tryptophan level or other uremic toxins,

83 cardioprotective drugs and traditional cardiovascular risk factors.

84 -Kynurenine is a promising candidate for understanding the complex interplay between CKD

85 and cardiovascular disease.

86 ***Potential impact:**

87 -Kynurenine could be considered as a predictive biomarker for cardiovascular risk in CKD

88 patients after confirmation by predictive analysis methodologies. This could influence clinical

89 guidelines for managing CKD patients.

90 -Therapeutic strategies to reduce serum kynurenine levels should be evaluated in further
91 studies, by inhibiting for example the IDO enzyme.

92

93 INTRODUCTION

94 Chronic kidney disease (CKD) is common and emerges as one of the leading non-
95 communicable causes of death worldwide.^{1,2} Patients with CKD are at high cardiovascular risk,
96 with cardiovascular death being the leading cause of death.³ Traditional cardiovascular risk
97 factors such as ageing, hypertension, and diabetes are highly prevalent in patients with CKD,
98 but fail to explain the increase in cardiovascular risk. Non-traditional cardiovascular risk factors
99 such as oxidative stress, and toxic compounds accumulation have been identified in patients
100 with CKD.^{3,4} Indeed, as kidney functions decline, an array of molecules called uremic toxins
101 (UTs) will pathologically accumulate in the organism.⁵⁻⁷

102 The majority of UTs are derived from amino acid metabolism in the gut.⁸ Previous
103 epidemiological studies have shown an association between many of them (such as para-cresyl
104 sulfate, p-cresyl glucuronide, indoxyl sulfate, and indole-3-acetic acid) and cardiovascular
105 outcomes.^{3,9} For example, the UTs indoxyl sulfate and kynurenine are derived from tryptophan
106 metabolism.¹⁰ Tryptophan is an essential aromatic amino acid, and the only protein-bound one
107 (around 85% bound to albumin). Initially, kynurenine is derived from tryptophan metabolism
108 in intestinal epithelial cells by the activation of the enzyme indolamine-2,3-dioxygenase-1.¹¹
109 After absorption, the free fraction of tryptophan (i.e. the active fraction), continues to be
110 metabolized to several bioactive compounds, particularly kynurenine, by different cell types
111 including endothelial cells.¹² The enzymatic conversion of tryptophan is enhanced in
112 inflammatory states, including CKD.⁴ Serum kynurenine levels are increased in CKD, not only
113 as a consequence of decreased renal clearance but also of alterations in tryptophan metabolism.⁴

114 Previous studies on the effects of UTs mainly focused on the toxicity of indoxyl sulfate.³ Only
115 few examined the effects of kynureneine³ despite being the first metabolite derived from the
116 kynureneine pathway,⁴ which is the most occurring one from tryptophan extensive metabolism
117 (Figure S1).¹³ Kynureneine is a protein-bound molecule, whose free fraction is the toxic one.⁷
118 In general, several analytical methods allow the quantification of both total and free fractions
119 of protein-bound uremic toxins.¹⁴ However, measuring the free fraction is generally complex,
120 explaining the availability of only limited data on free kynureneine.

121 Experimental studies showed that kynureneine caused endothelial cell dysfunction, abnormal
122 angiogenesis and vascular thrombosis.^{4,15,16}

123 An association between total serum kynureneine concentrations and incident cardiovascular
124 disease and all-cause mortality has previously been reported in the elderly and in patients with
125 stable angina.^{17,18} However, to our knowledge, very few clinical studies have shown the
126 association between total kynureneine levels and cardiovascular disease in pre-dialysis CKD
127 patients,^{15,19-28} none of them measured free kynureneine levels and none examined an
128 association with all-cause mortality in patients with moderate or advanced stages of CKD,²⁹ in
129 a large representative sample. Moreover, data on kynureneine mainly focused on their
130 association with atheromatous cardiovascular events. Given the burden of non-atheromatous
131 cardiovascular disease in CKD, it is important to separately assess the link between kynureneine
132 and these distinct pathologies.

133 The aim of the present study was to examine an association between both serum free and total
134 kynureneine levels with the occurrence of incident fatal or nonfatal cardiovascular events, both
135 globally and by subtypes of cardiovascular pathologies (atheromatous cardiovascular events
136 and non-atheromatous cardiovascular events), in a large French national sample of patients with
137 pre-dialysis CKD, independently of traditional cardiovascular risk factors, estimated
138 glomerular filtration rate (eGFR), and serum tryptophan levels. We further evaluated an

139 independent association with all-cause mortality before kidney replacement therapy (KRT),
140 both globally and by subtypes of cardiovascular death.

141 MATERIALS AND METHODS

142 Study design and participants

143 The Chronic Kidney Disease-Renal Epidemiology and Information Network (CKD-REIN) is a
144 large prospective cohort enrolling 3033 adult patients between July 2013 and April 2016 from
145 40 representative nephrology outpatient clinics in France. The eligibility criteria were age 18
146 or over, a confirmed diagnosis of moderate or advanced CKD (eGFR <60 ml/min/1.73 m²), and
147 no prior maintenance dialysis or kidney transplantation. All patients provided written informed
148 consent before inclusion for five years of annual follow-up. Details of the study protocol have
149 been published elsewhere.³⁰

150 Data were collected by trained clinical research associates from medical records or patient
151 interviews at baseline and then annually. Upon enrolment of the patients, urine and serum
152 samples were collected. More details concerning data collection are found in the Supplemental
153 Material. The CKD-REIN study was approved by the French National Institute of Health and
154 Medical Research (INSERM, Paris, France) institutional review board (IRB00003888) and the
155 Ethics Committee (CCTIRS12.360/CPP).

156 The present study included 2406 patients who provided available biosamples within a 3-month
157 window of inclusion (Figure 1).

158 Quantification of uremic toxins and tryptophan

159 All CKD-REIN samples were stored deep frozen (-80°C) at the Biobanque de Picardie (BRIF
160 number: BB-0033-00017) and shipped frozen to Paris for analysis. Kynurenone, indoxyl sulfate,
161 p-cresyl sulfate, indole-3-acetic acid and tryptophan fractions were assayed in serum using a
162 validated liquid chromatography tandem mass spectrometry technique, as described in the
163 Supplemental Material.¹⁴

164 **Evaluation of outcomes**

165 *Fatal or nonfatal cardiovascular events before kidney replacement therapy*

166 The primary endpoint was the occurrence of a first fatal or nonfatal cardiovascular event
167 during the follow-up period. Nonfatal events were traced from hospital and medical records,
168 and/or annual patient interviews. They were assessed by a physician using criteria from the
169 Cardiovascular and Stroke Endpoint Definition for Clinical Trials.³¹ All cardiovascular deaths
170 were further adjudicated by two blinded cardiologists (MH,NM). Fatal or nonfatal
171 cardiovascular events were studied as composite outcomes of sudden cardiac deaths, aortic
172 aneurysm, atheromatous and non-atheromatous cardiovascular events for which distinction
173 between them was also adjudicated by a blinded committee. Atheromatous cardiovascular
174 events included coronary artery disease, ischemic cerebrovascular disease, and peripheral
175 artery disease (i.e. lower limb artery disease and renal artery stenosis), and non-atheromatous
176 cardiovascular events included heart failure, hemorrhagic stroke, atrial fibrillation and other
177 cardiac rythm/conduction disorders. Because of uncertainty about the underlying mechanisms
178 for some sudden cardiac death events and about the specificity of classifying aortic aneurysm,
179 these events were not classified in either category.

180 Coronary artery disease included myocardial infarction, unstable angina, and coronary
181 interventions: angioplasty-stenting or coronary artery bypass grafting or coronary thrombolysis.
182 Ischemic cerebrovascular disease included ischemic stroke, transient ischemic attack, and
183 carotid interventions: thrombolysis, thrombectomy, endarterectomy, angioplasty-stenting, or
184 bypass surgery. Lower limb artery disease included vascular claudication, and interventions
185 such as angioplasty-stenting, endarterectomy, bypass surgery or amputation for atheromatous
186 ischemic lesions. Heart failure was defined as new onset, or worsening heart failure.
187 Arrhythmias and conduction disorders were documented by electrocardiography.

188 All the considered events occurred before any KRT. KRT was defined as kidney failure
189 requiring initiation of maintenance dialysis or preemptive kidney transplantation (as identified
190 from medical records or by linkage with the French National Renal Epidemiology Information
191 Network registry (REIN).
192

193 *All-cause death events before kidney replacement therapy*

194 All-cause mortality included any registered death, either cardiovascular or non-cardiovascular
195 mortality. Death events were declared by family members or by clinical research associates
196 during the 5-year follow-up, ascertained from death certificates and hospital records, or through
197 linkage with the national death registry.

198 As previously mentioned, cardiovascular mortality was adjudicated by cardiologists. Any other
199 deaths were categorized as non-cardiovascular mortality.

200 **Statistical analysis**

201 Participants' baseline characteristics are described for the overall datasample ($n = 2406$) and by
202 tertiles of serum free kynurenine levels. Description by tertiles of serum total kynurenine are
203 depicted in the Supplemental Table S1. Continuous variables are presented as the median [Q1-
204 Q3] and compared between the three groups with the Kruskal-Wallis test. Categorical variables
205 are presented as percentages and compared between groups with the Chi-square test. The
206 variations according to CKD stages of serum free, total, and free/total kynurenine
207 concentrations, free and total tryptophan, kynurenine/tryptophan ratio, respectively, are
208 compared between groups with the Kruskal-Wallis test, and followed by a post-hoc analysis
209 using Dunn's test (Supplemental Figures S2 - S5).

210 Given that the serum kynurenine values were not normally distributed they were log-
211 transformed. For each of the six study outcomes, we used cause-specific Cox models to estimate

212 crude and adjusted hazard ratios (HRs) [95% CI] associated with each of the free and total
213 kynurenine levels (associations with the latter are included in the Supplemental Material (Table
214 S2-5, Table S7, and Table S9)): HRs of 1) fatal or nonfatal cardiovascular events, 2)
215 atheromatous cardiovascular events, 3) non-atheromatous cardiovascular events; 4) all-cause
216 mortality, 5) cardiovascular mortality, 6) and non-cardiovascular mortality. Fatal or nonfatal
217 cardiovascular events (including atheromatous or non-atheromatous cardiovascular events)
218 were censored on the date of last follow-up (fifth annual follow-up visit or study withdrawal),
219 the date of KRT, or the date of death from a non-cardiovascular cause. Each death occurring
220 during the 5-year follow-up period was used in the all-cause mortality model, and the data were
221 censored at the date of last follow-up or the date of KRT. Cardiovascular death and non-
222 cardiovascular death were censored on the date of non-cardiovascular death and the date of
223 cardiovascular death respectively, in addition to the date of KRT and the date of last follow-up.

224 The Cox models were adjusted for a set of confounders, which were selected from a directed
225 acyclic graph (DAG), avoiding adjustment for unnecessary factors, mediators, and colliders.³²

226 The approach has been further detailed in the Supplemental Material. Associations between
227 serum kynurenine and overall cardiovascular risks, all-cause mortality, cardiovascular and non-
228 cardiovascular mortality risks were adjusted for age at baseline, sex, high-sensitivity C-reactive
229 protein (CRP), urea, diabetes, dyslipidemia, systolic blood pressure, body mass index (BMI),
230 smoking status, baseline eGFR, urine albumin or protein-to-creatinine ratio (ACR), serum free
231 tryptophan, serum free indoxyl sulfate, indole-3-acetic acid and p-cresyl sulfate, prescriptions
232 of diuretics, antihypertensive drugs, lipid-lowering drugs, and antidiabetic drugs. We excluded
233 the prescription of diuretics in the adjustment models evaluating the association with
234 atheromatous cardiovascular risk, as well as dyslipidemia and lipid-lowering drugs in the
235 models evaluating the association with non-atheromatous cardiovascular risk. We added serum
236 albumin to the models when evaluating serum free kynurenine.

237 The HRs of Cox models were transformed back into the original unlogged scales, in order to
238 obtain better interpretable values.

239 Each model's validity (according to the proportional hazard assumption) was checked by testing
240 the Schoenfeld residuals.

241 The method used to manage missing data is presented in the Supplemental Material.

242 The threshold for statistical significance was $P < 0.05$. All statistical analyses were performed
243 with R software.

244 **RESULTS**

245 **Baseline patients' characteristics**

246 The characteristics of the 2406 patients included in this study are presented in Table 1,
247 compared between the tertiles of free kynurenine levels. The median [Q1-Q3] age of the
248 participants was 68 [60-76] years, 66% were men, and the median BMI was 27.9 [24.7-31.7]
249 kg/m². Almost all the patients had hypertension (96%), a large proportion had dyslipidemia
250 (74%), about half of them presented a history of cardiovascular disease (52%), and 41% had
251 diabetes. The overall median eGFR was 24.7 [18.4-33.1] ml/min/1.73 m², and was significantly
252 lower in patients with the highest free kynurenine tertiles. Compared with patients in tertile 1
253 and tertile 2, patients in tertile 3 were older, had more comorbidities, a higher BMI, and higher
254 serum concentrations of CRP and free tryptophan.

255 The distribution of serum free and total kynurenine levels, free/total kynurenine ratio, free and
256 total tryptophan levels, and kynurenine/tryptophan ratio by CKD stage (Figures S2-S5 in the
257 Supplemental Material). Patients with more advanced CKD had significantly higher free and
258 total kynurenine concentrations with a higher free/total kynurenine ratio. Total tryptophan
259 levels were significantly lower in more advanced CKD stages, while free levels were higher.
260 The free kynurenine/free tryptophan ratio was significantly higher in more advanced CKD

261 stages compared to stages 2 and 3. Similarly, the total kynurenine/free tryptophan ratio was
262 significantly higher in stage 4 compared to stages 2 and 3.

263 **Fatal or nonfatal cardiovascular events**

264 Over a median [Q1-Q3] follow-up period of 5 [4.6-5.2] years, 466 out of the 2406 patients
265 experienced a first cardiovascular event (fatal or nonfatal). The crude analysis showed that a
266 doubling of serum free kynurenine levels was associated with a 70%-increase in the hazard of
267 a cardiovascular event (HR[95% CI]: 1.7 [1.5, 1.9] Table 2). This association was attenuated
268 but remained significant after multiple adjustments (Table 2): a double increase in serum free
269 kynurenine levels was associated with an 18%-increase in the hazard of a cardiovascular event
270 (adjusted HR[95% CI]: 1.18 [1.02, 1.33]), independently of kidney function (eGFR), serum
271 free tryptophan level or other uremic toxins, cardioprotective drugs and traditional
272 cardiovascular risk factors.

273 The results were in agreement with those of the association with total kynurenine levels: a
274 double increase of the latter was associated with a 20%-increase in the hazard of cardiovascular
275 events, independently of eGFR and serum free tryptophan level or tryptophan-derived UTs
276 (adjusted HR: 1.2 [1.05, 1.4]) (Supplemental Table S2).

277 **Analysis by subgroups of atheromatous vs non-atheromatous cardiovascular events**

278 *Atheromatous cardiovascular events*

279 During follow-up, 215 patients had fatal or nonfatal atheromatous cardiovascular events. There
280 was no significant association between serum free kynurenine levels and the occurrence of
281 atheromatous cardiovascular events after multiple adjustments (Table 3). Adding free
282 tryptophan to the adjusted model did not affect these results.

283 However, total kynurenine levels were significantly associated with atheromatous
284 cardiovascular events after multiple adjustments (Supplemental Table S3).

285 *Non-atheromatous cardiovascular events*

286 313 patients had fatal or nonfatal non-atheromatous cardiovascular events in the follow-up
287 period. A doubling of serum free kynurenine levels was significantly associated with a 26%-
288 increase in the hazard of non-atheromatous cardiovascular events after multiple adjustments
289 (adjusted HR [95% CI]: 1.26 [1.03, 1.50]) (Table 4).

290 The results were similar when evaluating serum total kynurenine, exhibiting a significant
291 association with the occurrence of non-atheromatous cardiovascular events (Supplemental
292 Table S4).

293 **All-cause mortality before kidney replacement therapy**

294 311 patients died before KRT over the 5-years follow-up period. A doubling of serum free
295 kynurenine levels was significantly associated with a 22%-increased hazard of all-cause
296 mortality (adjusted HR[95% CI]: 1.22[1.02,1.50]; Table 5), independently of eGFR. However,
297 the association of serum free kynurenine levels with all-cause mortality proved to depend on
298 the serum free tryptophan level; it was no longer significant after adding free tryptophan or
299 tryptophan-derived UTs to the adjustment model (Table 5).

300 In the multiple analyses, there was no significant association with serum total kynurenine levels
301 in the hazard of all-cause mortality before KRT. The adjusted HR for all-cause mortality was
302 1.04 [0.90, 1.30] (Supplemental Table S5).

303 **Analysis by non-cardiovascular and cardiovascular mortality subgroups before kidney
304 replacement therapy**

305 Over the 5-years follow-up period, we observed 215 non- cardiovascular deaths and 87
306 cardiovascular deaths before KRT.

307 *Non-cardiovascular mortality*

308 There was no significant association with serum free kynurenone in the hazard of non-
309 cardiovascular mortality before KRT after adjustment for eGFR, serum free tryptophan, and
310 other mortality risk factors (Table 6).

311 The results were comparable when evaluating the association with total kynurenone levels
312 (Supplemental Table S6).

313 *Cardiovascular mortality*

314 Serum free kynurenone levels were significantly associated with the occurrence of
315 cardiovascular mortality, even after adjustment for eGFR, serum free tryptophan and other
316 confounding factors. A doubling of serum free kynurenone levels was associated with a 64%-
317 increase in the hazard of cardiovascular mortality (adjusted HR [95% CI]: 1.64 [1.10, 2.40]
318 Table 7).

319 There was no significant association between serum total kynurenone levels and cardiovascular
320 mortality in the multiple analyses (Supplemental Table S7).

321 **DISCUSSION**

322 This large national cohort study that included patients with CKD before any KRT showed that
323 higher serum levels of the free fraction of kynurenone were associated with a higher incidence
324 of adverse fatal or nonfatal cardiovascular events. There was a particularly strong association
325 with non-atheromatous cardiovascular events, independent of kidney function, serum free
326 tryptophan level and traditional cardiovascular risk factors. Higher serum free kynurenone levels

327 were also significantly associated with a higher risk of cardiovascular mortality, but not non-
328 cardiovascular or all-cause mortality.

329 As to the mechanisms involved, previous experimental studies showed that the actions of
330 kynurenone are mainly mediated by direct activation of the aryl hydrocarbon receptor
331 (AHR).^{10,15,33} AHRs interact with diverse regulatory and signaling proteins such as Nuclear
332 Factor-kappa-B involved in cell proliferation, and immune responses.¹⁰ AHR activity can be
333 stimulated by various agents, including endogenous ligands such as the tryptophan metabolites
334 indoxyl sulfate, indole-3-acetic acid, kynurenic acid, and kynurenone, which can induce
335 vascular inflammation, cardiotoxicity, and a pro-coagulation status of vascular cells, as
336 demonstrated both in mice and in humans.^{10,33-35} Kolachalama et al.¹⁶ showed that kynurenone
337 promoted thrombosis after vascular injury in mice by increasing tissue factor expression in the
338 vessel wall through AHR signaling. Arinze et al. provided evidence for an association between
339 kynurenone and peripheral artery disease. They reported that kynurenone enhanced AHR activity
340 in endothelial cells, resulting in the suppression of Wnt activity via the β -catenin pathway. This
341 in turn led to impaired angiogenesis.^{15,34}

342 Previous small studies have investigated the effect of total kynurenone on cardiovascular risk,
343 mainly in patients receiving dialysis therapy, however without considering the free, active
344 kynurenone, and therefore probably underestimated kynurenone's full impact.^{15,19,20} Total
345 kynurenone concentrations have also been associated with markers of endothelial cell
346 dysfunction, inflammation and oxidative stress. Kynurenone/tryptophan ratio was linked to
347 abnormalities of tissue factor, contributing to high risk of thrombotic complications and
348 atherosclerosis, in CKD patients on conservative treatment.²⁰⁻²⁷ Our results confirmed these
349 previous observations and extended them by including a very large representative sample of
350 patients with CKD, demonstrating the place of the free fraction of kynurenone, and adjusting
351 for eGFR and serum free tryptophan levels.

352 A recent report in a CKD patient cohort demonstrated a significant association between
353 tryptophan levels and incident CVD.¹⁹ Tryptophan is the precursor of many metabolites and
354 UTs, including kynurene, kynurenic acid, indoxyl sulfate, and indole-3-acetic acid.
355 Tryptophan metabolites play a key role in incident cardiovascular disease, including myocardial
356 infarction, atherosclerosis, major coronary events, and ischemic stroke, in the general
357 population and in patients with heart disease.³⁶ This has also been shown for patients with
358 CKD. Hence the need and importance of including serum free tryptophan for the first time, in
359 the adjustment models of our analysis in order to isolate the true effect of serum free kynurene
360 on cardiovascular diseases in predialysis CKD patients beyond the tryptophan effects.

361 Our study showed a significant association between kynurene and non-atheromatous
362 cardiovascular events. This association could be partly explained by an inhibitory effect of
363 kynurene on endothelial cell activity, which is critical for angiogenesis.³⁴ Reasons for an
364 independent association of free kynurene with non-atheromatous cardiovascular events, but
365 not with atheromatous disease remains to be explored. Possible explanations are lack of power
366 due to relatively few observed atheromatous cardiovascular events and/or specific mechanisms
367 of action.

368 Given that kynurene induces inflammation and oxidative stress, one could have expected an
369 impact on all-cause mortality. However, this was not the case in our cohort. One previous
370 observational study also failed to find an association between kynurene and mortality after
371 kidney transplantation.²⁹ None examined such an association in non-transplant patients with
372 CKD. We only found an isolated effect of free kynurene on cardiovascular but not all-cause
373 mortality. In any case, these findings highlight the critical role of uremic toxicity induced by
374 kynurene in the genesis of cardiovascular complications.

375 In the CKD setting, kynurene is derived from tryptophan metabolism initially in the gut and
376 then in different other cell types by exceptionally activating the indolamine-2,3-dioxygenase

377 enzyme, leading to cardiovascular complications by activating the AHR pathway. Therefore,
378 strategies targeting each of this pathway may give the grounds to the development of new, more
379 effective solutions to regulate serum levels of kynurenine and improving deleterious outcomes
380 in a CKD setting.^{11,34,37-40} Given that several UTs act together in the generation of deleterious
381 effects, targeting only one UT is probably insufficient to reduce CKD-associated complications.
382 For example, Massy and Drueke³⁴ suggested that AHR inhibitors are likely to be indicated as
383 a solution via the blockade of common pathways. However, the efficacy and safety of AHR
384 inhibitors in CKD patients need to be further investigated, especially that AHRs present diverse
385 ligands with diversified effects. In other terms, AHRs and tryptophan-derived metabolites are
386 dual in their activity since they can have both beneficial and/or deleterious effects.⁴¹
387 Tryptophan is metabolized through several pathways, and can be a precursor of toxic
388 compounds (UTs) and/or non-toxic molecules such as melatonin, proved to have
389 immunoregulatory and an anti-inflammatory effects in hemodialysis patients.⁴² The AHR is
390 activated by several tryptophan metabolites, among other beneficial tryptophan metabolites,
391 which are essential for detoxification and immune and metabolic regulation.⁴¹ Thereby, future
392 interventions should specifically block the deleterious pathways while maintaining the
393 beneficial ones.

394 Our study has important strengths. First, the present cohort study emphasizes the place of the
395 free fraction of kynurenine in the association with cardiovascular diseases on the one hand and
396 all-cause mortality on the other, in patients with CKD before any KRT. The stratified approach
397 of cardiovascular diseases (according to atheromatous vs. non-atheromatous mechanisms) and
398 of cardiovascular vs non-cardiovascular mortality is a first significant step in the understanding
399 of serum free kynurenine's effect on CKD-related cardiovascular complications. Second, this
400 study included a large sample size of people that are nationally representative of nephrology
401 practices and the CKD patient population in France. This allowed for a sufficiently high

402 statistical power and permitted extensive adjustments for confounders (including eGFR and
403 serum free tryptophan). Third, UT assays were centralized using the validated, robust ultra-
404 high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry technique. Fourth, an
405 accurate assessment of cardiovascular events was conducted using standardized definitions ³¹
406 with two cardiologists adjudicating cardiovascular deaths. Last, the statistical analysis of the
407 data considered competitive risk events for each outcome.

408 Some limitations also need to be considered. First, we did not investigate the time-varying effect
409 of serum free kynurenine levels on each of the studied outcomes. Second, our eligibility criteria
410 was CKD patients with $eGFR < 60 \text{ ml/min}/1.73 \text{ m}^2$, excluding all patients with eGFR above that
411 threshold. However, patients with $eGFR > 60 \text{ ml/min}/1.73 \text{ m}^2$ may still have elevated
412 albuminuria ($> 30 \text{ mg/g}$) or other markers of kidney damage, which also align with the CKD
413 criteria according to KDIGO guidelines.⁴³ Third, the possibility of residual confounding cannot
414 be excluded. The potential influence of dietary factors could not be included in the adjustment
415 models since they were not available in our exhaustive database. They may have contributed to
416 baseline serum kynurenine levels since this UT is a gut-derived one from an amino acid
417 metabolism. However, the importance of diet on serum kynurenine concentrations is not
418 determined and possibly has limited effects. Fourth, we did not find an independent association
419 between free kynurenine and atheromatous CVD, despite the knowledge that kynurenine
420 activates AHR and can contribute to thrombosis and PAD. Lastly, our study serves as an
421 etiological evaluation, primarily aiming to enhance our understanding of the association
422 between serum free kynurenine and cardiovascular outcomes, rather than making predictive
423 analyses. However, we neither explored the potential of kynurenine as a predictive biomarker
424 for cardiovascular risk, nor compared the predictive value of other UTs known to be associated
425 with CVD. This would require a separate investigation employing predictive analysis

426 methodologies and external validation. It is important to note that CKD is a complex condition
427 with various contributing factors to CVD. Kynurenine is just one piece of the puzzle.

428 In conclusion, our present large prospective study showed that higher serum free kynurenine
429 levels were associated with an elevated risk of incident fatal or nonfatal cardiovascular events
430 in patients with CKD before any KRT particularly non-atheromatous cardiovascular events.
431 This association was independent of kidney function and serum free tryptophan levels. By
432 investigating this association, we aimed to contribute to existing knowledge and shed light on
433 the potential role of kynurenine in CVD development and progression. Future research should
434 consider incorporating predictive analysis methodologies to further explore the potential of
435 UTs, including kynurenine, as predictive biomarkers for cardiovascular risk. Such analyses
436 might provide valuable insights into the predictive capabilities of UTs in relation to clinical
437 outcomes. Moreover, experimental studies are necessary to provide a better insight into the
438 mechanisms involved and potential therapeutic interventions targeting kynurenine in CKD-
439 related cardiovascular complications.

440 **ACKNOWLEDGEMENTS**

441 We acknowledge the CKD-REIN study coordination staff for their efforts in setting up the
442 CKD-REIN cohort (Marie Metzger, Elodie Speyer, Céline Lange and all the clinical research
443 associates) as well as the CKD-REIN clinical sites and investigators:

444 Alsace : Prs T. Hannedouche et B. Moulin (CHU, Strasbourg), Dr A. Klein (CH Colmar)
445 Aquitaine : Pr C. Combe (CHU, Bordeaux), Dr J.P. Bourdenx (Clinique St Augustin,
446 Bordeaux), Dr A. Keller, Dr C. Delclaux (CH, Libourne), Dr B. Vendrely (Clinique St Martin,
447 Pessac), Dr B. Deroure (Clinique Delay, Bayonne), Dr A. Lacraz (CH, Bayonne) Basse
448 Normandie : Dr T. Lobbedez (CHU, Caen), Dr I. Landru (CH, Lisieux) Ile de France : Pr Z.
449 Massy (CHU, Boulogne – Billancourt), Pr P. Lang (CHU, Créteil), Dr X. Belenfant (CH,
450 Montreuil), Pr E. Thervet (CHU, Paris), Dr P. Urena (Clinique du Landy, St Ouen), Dr M.
451 Delahousse (Hôpital Foch, Suresnes) Languedoc – Roussillon : Dr C. Vela (CH, Perpignan)
452 Limousin : Pr M. Essig, Dr D. Clément (CHU, Limoges) Lorraine : Dr H. Sekhri, Dr M. Smati
453 (CH, Epinal) Dr M. Jamali, Dr B. Hacq (Clinique Louis Pasteur, Essey-les-Nancy), Dr V.
454 Panescu, Dr M. Bellou (Polyclinique de Gentilly, Nancy), Pr Luc Frimat (CHU, Vandœuvre-
455 les-Nancy) Midi-Pyrénées : Pr N Kamar (CHU, Toulouse) Nord-Pas-de-Calais : Prs C. Noël
456 et F. Glowacki (CHU, Lille), Dr N. Maisonneuve (CH, Valenciennes), Dr R. Azar (CH,
457 Dunkerque), Dr M. Hoffmann (Hôpital privé La Louvière, Lille) Pays-de-la Loire : Pr M.
458 Hourmant (CHU, Nantes), Dr A. Testa (Centre de dialyse, Rezé), Dr D. Besnier (CH, St

459 Nazaire) Picardie : Pr G. Choukroun (CHU, Amiens), Dr G. Lambrey (CH, Beauvais)
460 Provence-Alpes - Côte d'Azur : Pr S. Burtey (CHU, Marseille), Dr G. Lebrun (CH, Aix-en-
461 Provence), Dr E. Magnant (Polyclinique du Parc Rambot, Aix-en-Provence) Rhône-Alpes : Pr
462 M. Laville, Pr D. Fouque (CHU, Lyon-Sud) et L. Juillard (CHU Edouard Herriot, Lyon), Dr C.
463 Chazot (Centre de rein artificiel Tassin Charcot, Ste Foy-les-Lyon), Pr P. Zaoui (CHU,
464 Grenoble), Dr F. Kuentz (Centre de santé rénale, Grenoble).

465 The authors would like to thank the teams of all the biological resources centers that participated
466 in the project: the Biobanque de Picardie (BB-0033-00017), NeuroBioTec (BB-0033-00046),
467 Centre de ressources biologiques (CRB)-Centre Hospitalier Universitaire de Nantes Hôtel Dieu
468 (BB-0033-00040), CRB-Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes (BB-0033-00069),
469 CRB-Centre Hospitalier Régional Universitaire de Nancy (BB-0033-00035), Service de
470 Néphrologie, Centre Hospitalier de Perpignan, the Plateforme de Ressources Biologiques-
471 Hôpital Henri Mondor (BB-0033-00021), the Centre d'Investigation Clinique Plurithématique
472 CIC-1435, Plateforme de Ressources Biologiques-Hôpital européen Georges-Pompidou (BB-
473 0033-00063), L'Etablissement Français du sang (EFS) Hauts de France – Normandie (Site de
474 Bois-Guillaume, Site de Loos-Eurasanté), EFS Nouvelle Aquitaine (site Pellegrin), EFS Ile de
475 France (Site Avicenne), EFS Occitanie (Site de Toulouse), EFS Grand-Est (Site de Colmar,
476 Site de Metz), EFS PACA-Corse (Site de Marseille) (Supplementary Material).

477

478 DATA AVAILABILITY STATEMENT

479 The data underlying this article will be shared on reasonable request to the corresponding
480 author.

481

482 SUPPLEMENTAL MATERIAL

483 **Quantification of serum kynurenone and tryptophan.**

484 **Data collection.**

485 **Fatal or nonfatal cardiovascular events before kidney replacement therapy.**

486 **Statistical analysis.**

487 **Figure S1.** Tryptophan metabolism pathways.

488 **Figure S2.** Distribution of kynurenone according to the stages of chronic kidney disease.

489 **Figure S3.** Distribution of free/total kynurenone according to the stages of chronic kidney
490 disease.

491 **Figure S4.** Distribution of tryptophan according to the stages of chronic kidney disease.

492 **Figure S5.** Distribution of the ratio kynurenone/tryptophan according to the stages of chronic
493 kidney disease.

494 **Figure S6.** Directed acyclic graph identifying the minimal sufficient adjustment set for
495 estimating the kynurenone effect on cardiovascular events, atheromatous or not, fatal or not.

496 **Figure S7.** Directed acyclic graph identifying the minimal sufficient adjustment set for
497 estimating the kynurenone effect on all cause/ cardiovascular /non-cardiovascular mortality.

498 **Table S1.** Characteristics of the study population according to the tertiles of serum total
499 kynurenone.

500 **Table S2.** Hazard ratio for fatal and nonfatal cardiovascular events, according to the baseline
501 serum total kynurenone level (mg/L).

502 **Table S3.** Hazard ratio for atheromatous cardiovascular events, according to the baseline
503 serum total kynurenone level (mg/L).

504 **Table S4.** Hazard ratio for non-atheromatous cardiovascular events, according to the baseline
505 serum total kynurenone level (mg/L).

506 **Table S5.** Hazard ratio for all-cause mortality, according to the baseline serum total
507 kynurenone level (mg/L).

508 **Table S6.** Hazard ratio for non-cardiovascular mortality, according to the baseline serum total
509 kynurenone level (mg/L).

510 **Table S7.** Hazard ratio for cardiovascular mortality, according to the baseline serum total
511 kynurenone level (mg/L).

512 **List of biological resources centers.**

513

514 **CONFLICT OF INTEREST STATEMENT**

515 C.E.C., I.A.L., N.A.D.P., O.L., C.C., D.F., L.F., C.J., M.L., S.M.L., C.L., J.-C.A. and S.L.,
516 declare no conflict of interest. Z.A.M. reports having received grants for CKD-REIN and
517 other research projects from Amgen, Baxter, Fresenius Medical Care, GlaxoSmithKline,
518 Merck Sharp & Dohme-Chibret, Sanofi- Genzyme, Lilly, Otsuka, AstraZeneca, Vifor and the
519 French government, as well as fees and grants to charities from AstraZeneca, Boehringer
520 Ingelheim, and GlaxoSmithKline. The sponsors had no role in the design, execution,
521 interpretation, or writing of the study.

522

523 **REFERENCES**

- 524 1. Kovesdy CP. Epidemiology of chronic kidney disease: an update 2022. *Kidney International Supplements*. 2022;12(1):7-11.
- 525 2. Charles C, Ferris AH. Chronic kidney disease. *Primary Care: Clinics in Office Practice*. 2020;47(4):585-595.
- 526 3. El Chamieh C, Liabeuf S, Massy Z. Uremic Toxins and Cardiovascular Risk in Chronic Kidney Disease: What Have We Learned Recently beyond the Past Findings? *Toxins*. 2022;14(4):280.
- 527 4. Zakrocka I, Załuska W. Kynurenone pathway in kidney diseases. *Pharmacological Reports*. 2021;1-13.
- 528 5. Duranton F, Cohen G, De Smet R, et al. Normal and pathologic concentrations of uremic toxins. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2012;23(7):1258-1270.
- 529 6. Vanholder R, Baurmeister U, Brunet P, et al. A bench to bedside view of uremic toxins. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2008;19(5):863-870.

- 536 7. Vanholder R, Glorieux G. Introduction: Uremic toxicity—State of the art 2014. Elsevier;
537 2014:85-86.
- 538 8. Graboski AL, Redinbo MR. Gut-derived protein-bound uremic toxins. *Toxins*. 2020;12(9):590.
- 539 9. Glorieux G, Vanholder R, Van Biesen W, et al. Free p-cresyl sulfate shows the highest
540 association with cardiovascular outcome in chronic kidney disease. *Nephrology Dialysis
541 Transplantation*. 2021;36(6):998-1005.
- 542 10. Sallée M, Dou L, Cerini C, Poitevin S, Brunet P, Burtey S. The aryl hydrocarbon receptor-
543 activating effect of uremic toxins from tryptophan metabolism: a new concept to understand
544 cardiovascular complications of chronic kidney disease. *Toxins*. 2014;6(3):934-949.
- 545 11. Paeslack N, Mimmler M, Becker S, et al. Microbiota-derived tryptophan metabolites in
546 vascular inflammation and cardiovascular disease. *Amino Acids*. 2022;54(10):1339-1356.
- 547 12. Green A, Aronson J, Curzon G, Woods H. Metabolism of an oral tryptophan load. I: Effects of
548 dose and pretreatment with tryptophan. *British journal of clinical pharmacology*. 1980;10(6):603-
549 610.
- 550 13. Kwiatkowska I, Hermanowicz JM, Mysliwiec M, Pawlak D. Oxidative storm induced by
551 tryptophan metabolites: missing link between atherosclerosis and chronic kidney disease. *Oxidative
552 Medicine and Cellular Longevity*. 2020;2020
- 553 14. Fabresse N, Uteem I, Lamy E, Massy Z, Larabi IA, Alvarez J-C. Quantification of free and
554 protein bound uremic toxins in human serum by LC-MS/MS: comparison of rapid equilibrium dialysis
555 and ultrafiltration. *Clinica Chimica Acta*. 2020;507:228-235.
- 556 15. Arinze NV, Yin W, Lotfollahzadeh S, et al. Tryptophan metabolites suppress the Wnt pathway
557 and promote adverse limb events in chronic kidney disease. *The Journal of clinical investigation*.
558 2022;132(1)
- 559 16. Kolachalama VB, Shashar M, Alousi F, et al. Uremic solute-aryl hydrocarbon receptor-tissue
560 factor axis associates with thrombosis after vascular injury in humans. *Journal of the American
561 Society of Nephrology*. 2018;29(3):1063-1072.
- 562 17. Castro-Portuguez R, Sutphin GL. Kynurenine pathway, NAD⁺ synthesis, and mitochondrial
563 function: Targeting tryptophan metabolism to promote longevity and healthspan. *Experimental
564 gerontology*. 2020;132:110841.
- 565 18. Solvang S-EH, Hodge A, Watne LO, et al. Kynurenine Pathway Metabolites in the Blood and
566 Cerebrospinal Fluid Are Associated with Human Aging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
567 2022;2022
- 568 19. Konje VC, Rajendiran TM, Bellovich K, et al. Tryptophan levels associate with incident
569 cardiovascular disease in chronic kidney disease. *Clinical kidney journal*. 2021;14(4):1097-1105.
- 570 20. Pawlak K, Mysliwiec M, Pawlak D. Haemostatic system, biochemical profiles, kynurenes and
571 the prevalence of cardiovascular disease in peritoneally dialyzed patients. *Thrombosis research*.
572 2010;125(2):e40-e45.
- 573 21. Pawlak K, Mysliwiec M, Pawlak D. Hypercoagulability is independently associated with
574 kynurenine pathway activation in dialysed uraemic patients. *Thrombosis and haemostasis*.
575 2009;102(07):49-55.
- 576 22. Pawlak K, Kowalewska A, Pawlak D, Mysliwiec M. Kynurenine and its metabolites—kynurenic
577 acid and anthranilic acid are associated with soluble endothelial adhesion molecules and oxidative
578 status in patients with chronic kidney disease. *The American journal of the medical sciences*.
579 2009;338(4):293-300.
- 580 23. Pawlak K, Myśliwiec M, Pawlak D. Kynurenine pathway—a new link between endothelial
581 dysfunction and carotid atherosclerosis in chronic kidney disease patients. *Advances in medical
582 sciences*. 2010;55(2):196-203.
- 583 24. Pawlak K, Brzosko S, Mysliwiec M, Pawlak D. Kynurenine, quinolinic acid—The new factors
584 linked to carotid atherosclerosis in patients with end-stage renal disease. *Atherosclerosis*.
585 2009;204(2):561-566.

- 586 25. Pawlak K, Domaniewski T, Mysliwiec M, Pawlak D. Kynurenines and oxidative status are
587 independently associated with thrombomodulin and von Willebrand factor levels in patients with
588 end-stage renal disease. *Thrombosis research*. 2009;124(4):452-457.
- 589 26. Pawlak K, Domaniewski T, Mysliwiec M, Pawlak D. The kynurenines are associated with
590 oxidative stress, inflammation and the prevalence of cardiovascular disease in patients with end-
591 stage renal disease. *Atherosclerosis*. 2009;204(1):309-314.
- 592 27. Pawlak K, Tankiewicz J, Mysliwiec M, Pawlak D. Tissue factor/its pathway inhibitor system
593 and kynurenines in chronic kidney disease patients on conservative treatment. *Blood coagulation &*
594 *fibrinolysis*. 2009;20(7):590-594.
- 595 28. Pawlak K, Buraczewska-Buczko A, Pawlak D, Mysliwiec M. Hyperfibrinolysis, uPA/suPAR
596 system, kynurenines, and the prevalence of cardiovascular disease in patients with chronic renal
597 failure on conservative treatment. *The American journal of the medical sciences*. 2010;339(1):5-9.
- 598 29. Mor A, Kalaska B, Pawlak D. Kynurenine pathway in chronic kidney disease: what's old,
599 what's new, and what's next? *International Journal of Tryptophan Research*.
600 2020;13:1178646920954882.
- 601 30. Stengel B, Combe C, Jacquelinet C, et al. The French chronic kidney disease-renal
602 epidemiology and information network (CKD-REIN) cohort study. *Nephrology Dialysis*
603 *Transplantation*. 2014;29(8):1500-1507.
- 604 31. Hicks KA, Mahaffey KW, Mehran R, et al. 2017 cardiovascular and stroke endpoint definitions
605 for clinical trials. *Circulation*. 2018;137(9):961-972.
- 606 32. Suttorp MM, Siegerink B, Jager KJ, Zoccali C, Dekker FW. Graphical presentation of
607 confounding in directed acyclic graphs. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2015;30(9):1418-1423.
- 608 33. Addi T, Dou L, Burtey S. Tryptophan-derived uremic toxins and thrombosis in chronic kidney
609 disease. *Toxins*. 2018;10(10):412.
- 610 34. Massy ZA, Druke TB. Role of uremic toxins in vascular disease—the end of nihilism? *Kidney*
611 *International*. 2022;
- 612 35. Asai H, Hirata J, Watanabe-Akanuma M. Indoxyl glucuronide, a protein-bound uremic toxin,
613 inhibits hypoxia-inducible factor-dependent erythropoietin expression through activation of aryl
614 hydrocarbon receptor. *Biochemical and biophysical research communications*. 2018;504(2):538-544.
- 615 36. Melhem NJ, Taleb S. Tryptophan: from diet to cardiovascular diseases. *International Journal*
616 *of Molecular Sciences*. 2021;22(18):9904.
- 617 37. Barba C, Benoit B, Bres E, et al. A low aromatic amino-acid diet improves renal function and
618 prevent kidney fibrosis in mice with chronic kidney disease. *Scientific Reports*. 2021;11(1):19184.
- 619 38. Koppe L, Soulage CO. The impact of dietary nutrient intake on gut microbiota in the
620 progression and complications of chronic kidney disease. *Kidney International*. 2022;
- 621 39. Koppe L, Fouque D. Microbiota and prebiotics modulation of uremic toxin generation.
622 *Panminerva Medica*. 2016;59(2):173-187.
- 623 40. Watanabe Y, Koyama S, Yamashita A, et al. Indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 in coronary
624 atherosclerotic plaque enhances tissue factor expression in activated macrophages. *Research and*
625 *Practice in Thrombosis and Haemostasis*. 2018;2(4):e12128.
- 626 41. Vanholder R, Nigam SK, Burtey S, Glorieux G. What if not all metabolites from the uremic
627 toxin generating pathways are toxic? A hypothesis. *Toxins*. 2022;14(3):221.
- 628 42. Marzougui H, Hammouda O, Ben Dhia I, et al. Melatonin ingestion before intradialytic
629 exercise improves immune responses in hemodialysis patients. *International Urology and*
630 *Nephrology*. 2021;53:553-562.
- 631 43. Levin A, Stevens PE. Summary of KDIGO 2012 CKD Guideline: behind the scenes, need for
632 guidance, and a framework for moving forward. *Kidney international*. 2014;85(1):49-61.

633

634

635

636

637 Table 1. Characteristics of the study population according to the tertiles of serum free
638 kynurenine

Characteristics	Total	Tertiles of serum free kynurenine (mg/L)			P-value ²	Missing data
	N = 2406 ¹	T1 <0.11 (n=802) ¹	T2 [0.11-0.16] (n=801) ¹	T3 >=0.16 (n=803) ¹		
Age at baseline (years)	68 [60-76]	67 [58-74]	69 [60-76]	69 [62-77]	<0.0001	0%
Men	66%	68%	67%	63%	0.07	0%
eGFR at baseline (ml/min/1.73m²)	25 [18-33]	31 [24-40]	25 [19-32]	20 [15-26]	<0.0001	0%
Albumin- or protein-to-creatinine ratio (mg/g)	104 [21-491]	57 [14-345]	104 [23-440]	198 [34-721]	<0.0001	11.5%
History of acute kidney injury	23%	20%	24%	27%	0.005	7.2%
Smoking status					0.3	
Never-smoker	40%	41%	40%	40%		
Current smoker	13%	13%	13%	10%		0.6%
Former smoker	47%	46%	46%	50%		
Systolic blood pressure (mmHg)	140 [128-153]	138 [127-151]	140 [129-152]	140 [130-155]	0.014	0.5%
Diabetes	41%	35%	41%	47%	<0.0001	0.2%
Dyslipidemia	74%	70%	73%	77%	0.008	0.4%
History of cardiovascular disease	52%	46%	51%	60%	<0.0001	0.5%
Serum bicarbonate (mmol/L)	25 [23-27]	25.4 [23-27.4]	25 [22.4-27]	24.5 [22-27]	<0.0001	8.8%
Serum albumin (g/L)	40.4 [38-43]	41 [38.4-43.2]	41 [38-43]	40 [37-42]	<0.0001	14.5%
Hemoglobin (g/dL)	13 [11.8-14.2]	13.4 [12.3-14.5]	13 [11.9-14.2]	12.6 [11.5-13.7]	<0.0001	0.9%
High-sensitivity C-reactive protein (mg/L)	2.4 [1.1-5.1]	2 [0.9-4.1]	2.3 [1.1-4.8]	2.9 [1.3-6.5]	<0.0001	5.4%
Body mass index (kg/m²)	27.9 [24.7-31.7]	27.2 [24.3-30.8]	27.8 [24.5-31.6]	28.8 [25.4-32.8]	<0.0001	1.9%
PPI prescription at baseline	32%	30%	31%	36%	0.01	0.2%

Diuretics prescription at baseline	52%	43%	51%	63%	<0.0001	0.3%
Antihypertensive drugs prescription at baseline	2243 (94%)	722 (91%)	753 (94%)	768 (96%)	<0.0001	0.3%
Lipid-lowering drugs prescription at baseline	1520 (63%)	472 (59%)	510 (64%)	538 (67%)	0.005	0.3%
Antidiabetic drugs prescription at baseline	820 (34%)	231 (29%)	275 (34%)	314 (39%)	<0.001	0.3%
Free tryptophan (mg/L)	0.9 [0.7-1.2]	0.7 [0.6-0.9]	0.9 [0.8-1.1]	1.2 [0.9-1.5]	<0.0001	0%
Total tryptophan (mg/L)	12 [10-15]	12 [10-15]	12.6 [10-15]	12 [9.9-14.6]	0.1	0%
Free kynurenone (mg/L)	0.1 [0.09-0.2]	0.07 [0.06-0.08]	0.12 [0.11-0.14]	0.2 [0.18-0.26]	-	0%
Total kynurenone (mg/L)	1.2 [0.9-1.6]	0.9 [0.7-1.2]	1.2 [0.9-1.6]	1.4 [1.2-1.8]	<0.0001	0%

¹ Median [Q1-Q3]; %

² Kruskal-Wallis rank sum test; Pearson's Chi-squared test

eGFR: estimated glomerular filtration rate; PPI: proton pump inhibitor.

639

640

641

642

643 Table 2. Hazard ratio of cardiovascular events associated with a double increase in baseline
644 serum free kynurenone level (mg/L).

	Free kynurenone (mg/L)
Cardiovascular events	
Unadjusted HR [95% CI] – p-value	1.7 [1.5, 1.9] – <0.0001
Adjusted HR¹ [95% CI] – p-value	1.25 [1.09, 1.4] – 0.002
Adjusted HR² [95% CI] – p-value	1.18 [1.02, 1.33] – 0.04
Adjusted HR³ [95% CI] – p-value	1.19 [1.03, 1.39] – 0.01

645 ¹Model adjusted for age at baseline, sex, high-sensitivity C-reactive protein, serum albumin, urea, diabetes,
646 dyslipidemia, body mass index, smoking status, baseline estimated glomerular filtration rate, urine albumin- or
647 protein-to-creatinine ratio, systolic blood pressure, prescriptions of diuretics, antihypertensive drugs, lipid-
648 lowering drugs, and antidiabetic drugs.

649 ² 1+serum free tryptophan.

650 ³ 1+ serum free indoxyl sulfate, indole-3-acetic acid and p-Cresyl Sulfate.

651

652 Table 3. Hazard ratio of atheromatous cardiovascular events associated with a double increase
653 in baseline serum free kynurenone level (mg/L).

	Free kynurenone (mg/L)
Atheromatous cardiovascular events	
Unadjusted HR [95% CI] – p-value	1.4 [1.17, 1.69] – 0.0002

Adjusted HR¹ [95% CI] – p-value	1.15 [0.9, 1.4] – 0.2
Adjusted HR² [95% CI] – p-value	1.15 [0.89, 1.5] – 0.2
Adjusted HR³ [95% CI] – p-value	1.08 [0.86 , 1.4] – 0.5

654 ¹Model adjusted for age at baseline, sex, high-sensitivity C-reactive protein, serum albumin, urea, diabetes,
 655 dyslipidemia, body mass index, smoking status, baseline estimated glomerular filtration rate, urine albumin- or
 656 protein-to-creatinine ratio, systolic blood pressure, prescriptions of antihypertensive drugs, lipid-lowering drugs,
 657 and antidiabetic drugs.

658 ² 1+serum free tryptophan.

659 ³ 1+ serum free indoxyl sulfate, indole-3-acetic acid and p-Cresyl Sulfate.

660

661 Table 4. Hazard ratio of non-atheromatous cardiovascular events associated with a double
 662 increase in baseline serum free kynurenine level (mg/L).

	Free kynurenine (mg/L)
Non-atheromatous cardiovascular events	
Unadjusted HR [95% CI] – p-value	1.97 [1.7, 2.27] -- <0.001
Adjusted HR¹ [95% CI] – p-value	1.36 [1.14, 1.61] – 0.0007
Adjusted HR² [95% CI] – p-value	1.26 [1.03, 1.5] – 0.02
Adjusted HR³ [95% CI] – p-value	1.31 [1.09, 1.6] -- 0.003

663 ¹Model adjusted for age at baseline, sex, high-sensitivity C-reactive protein, serum albumin, urea, diabetes, body
 664 mass index, smoking status, baseline estimated glomerular filtration rate, urine albumin- or protein-to-creatinine
 665 ratio, systolic blood pressure, prescriptions of diuretics, antihypertensive drugs, and antidiabetic drugs.

666 ² 1+serum free tryptophan.

667 ³ 1+ serum free indoxyl sulfate, indole-3-acetic acid and p-Cresyl Sulfate.

668

669 Table 5. Hazard ratio of all-cause mortality associated with a double increase in baseline
 670 serum free kynurenine level (mg/L).

	Free kynurenine (mg/L)
Unadjusted HR [95% CI] – p-value	1.7 [1.5, 1.9] -- <0.001
Adjusted HR¹ [95% CI] – p-value	1.22 [1.02, 1.5] – 0.03
Adjusted HR² [95% CI] – p-value	1.12 [0.9, 1.4] – 0.3
Adjusted HR³ [95% CI] – p-value	1.18 [0.9, 1.4] – 0.07

671 ¹Model adjusted for age at baseline, sex, high-sensitivity C-reactive protein, serum albumin, urea, diabetes,
 672 dyslipidemia, body mass index, smoking status, baseline estimated glomerular filtration rate, urine albumin- or
 673 protein-to-creatinine ratio, systolic blood pressure, prescriptions of diuretics, antihypertensive drugs, lipid-
 674 lowering drugs, and antidiabetic drugs.

675 ² 1+serum free tryptophan.

676 ³ 1+ serum free indoxyl sulfate, indole-3-acetic acid and p-Cresyl Sulfate.

677

678 Table 6. Hazard ratio of non-cardiovascular mortality associated with a double increase in
 679 baseline serum free kynurenine level (mg/L).

	Free kynurenine (mg/L)
Unadjusted HR [95% CI] – p-value	1.5 [1.3, 1.8] – <0.001

Adjusted HR¹ [95% CI] – p-value	1.1 [0.9, 1.4] – 0.3
Adjusted HR² [95% CI] – p-value	1.03 [0.8, 1.32] – 0.8
Adjusted HR³ [95% CI] – p-value	1.1 [0.9, 1.4] – 0.3

¹Model adjusted for age at baseline, sex, high-sensitivity C-reactive protein, serum albumin, urea, diabetes, dyslipidemia, body mass index, smoking status, baseline estimated glomerular filtration rate, urine albumin- or protein-to-creatinine ratio, systolic blood pressure, prescriptions of diuretics, antihypertensive drugs, lipid-lowering drugs, and antidiabetic drugs.

² 1+serum free tryptophan.

³ 1+ serum free indoxyl sulfate indole-3-acetic acid and p-Cresyl Sulfate.

686

687 Table 7. Hazard ratio of cardiovascular mortality associated with a double increase in baseline
688 serum free kynurenine level (mg/L).

	Free kynurenine (mg/L)
Unadjusted HR [95% CI] – p-value	2.3 [1.7, 3.03] – <0.001
Adjusted HR¹ [95% CI] – p-value	1.8 [1.3, 2.5] – 0.001
Adjusted HR² [95% CI] – p-value	1.66 [1.1, 2.5] – 0.01
Adjusted HR³ [95% CI] – p-value	1.64 [1.1, 2.4] – 0.007

¹Model adjusted for age at baseline, sex, high-sensitivity C-reactive protein, serum albumin, urea, diabetes, dyslipidemia, body mass index, smoking status, baseline estimated glomerular filtration rate, urine albumin- or protein-to-creatinine ratio, systolic blood pressure, prescriptions of diuretics, antihypertensive drugs, lipid-lowering drugs, and antidiabetic drugs.

² 1+serum free tryptophan.

³ 1+ serum free indoxyl sulfate, indole-3-acetic acid and p-Cresyl Sulfate.

695

696

697

698

699

700

701

702

703

704

705

706

707

708

709

710

711

712

713

714

715

716

717

718

719

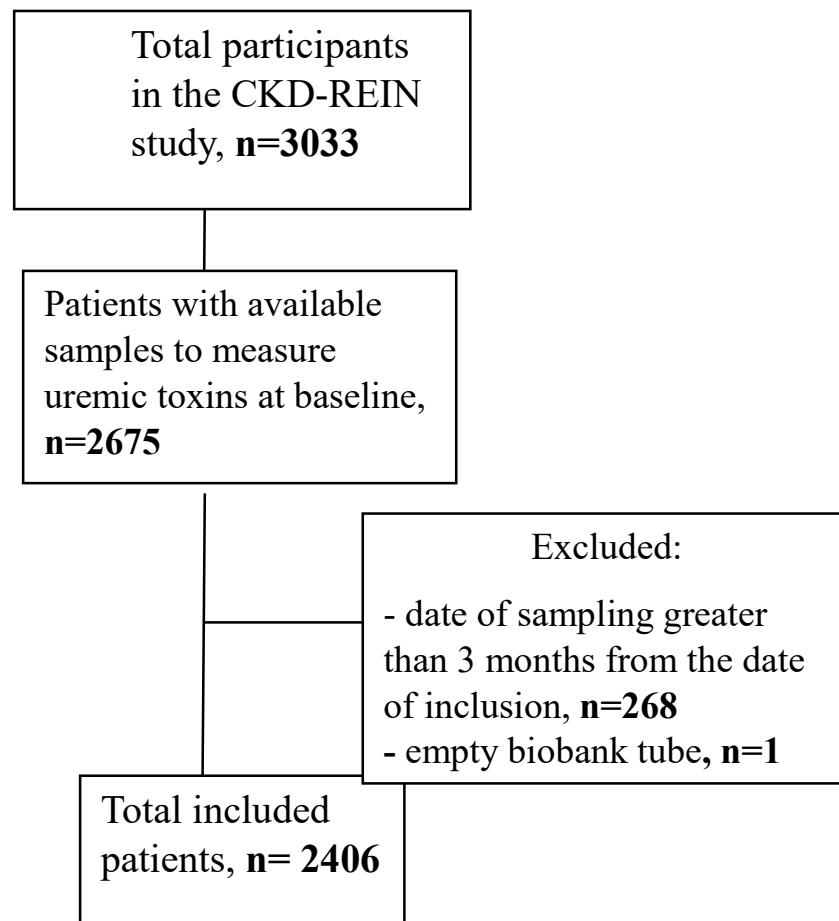
720

721

722

723

724



725 Figure 1. Flowchart of the study

726

Supplemental Material

Quantification of serum kynurenine and tryptophan

Collected uremic toxins serum samples were immediately stored at 4°C and aliquoted within 6 hours without additional processing. All CKD-REIN samples were stored deep frozen (-80°C) at the Biobanque de Picardie (BRIF number: BB-0033-00017) and shipped frozen to Paris for analysis. Both teams were blinded for outcome and patients' characteristics. Kynurenine, indoxyl sulfate, p-cresyl sulfate, indole-3-acetic acid and tryptophan fractions were assayed in serum using a validated liquid chromatography tandem mass spectrometry technique, as described previously.¹

To determine total kynurenine and tryptophan concentrations, 50 µL of serum samples were first precipitated with 340 µL of methanol in the presence of 25 µL of isotope labelled internal standards. After centrifugation for 10 min at 9000 g, the supernatant was evaporated under nitrogen stream and then reconstituted in 80 µL of water.

Free concentrations were determined by ultrafiltration; 150 µL of serum were introduced into an ultra-centrifugal filter of 30 kDa porosity, and then centrifuged at 13300 g for 20 min. Given that kynurenine and tryptophan are mainly bound to albumin (65 kDa, unable to pass through the filter), the residual filtrate contained only the free fraction.

Data collection

Trained clinical research associates collected data from medical records and patient interviews at baseline and then annually for 5 years. We collected patients' characteristics (age, sex, and smoking status) and detailed medical history, including any history of diabetes, hypertension, dyslipidemia, cardiovascular disease, and acute kidney injury. Patients were considered as having a history of cardiovascular disease if they had previous events of coronary heart disease, stroke, peripheral vascular disease, heart failure, dysrhythmia or valvular disease. They were considered as having diabetes if the condition was mentioned in their medical records, if they had serum levels of HbA1c ≥7%, fasting glucose ≥ 7.0 mmol/L, or random glucose ≥ 11.0 mmol/L, or if they used glucose-lowering medications. Likewise, patients were considered as having hypertension if mentioned in their medical records, if they had systolic blood pressure ≥140 mm Hg or diastolic blood pressure ≥90 mm Hg or if they were prescribed antihypertensive medications, and they were considered as having dyslipidemia if it was stated in their medical records or if they used lipid-lowering medications. Nephrologists or outpatient nurses measured patients' blood pressure, body weight, and height. Body mass index was then calculated as the

ratio of weight to height square. All patients were prescribed standard blood and urine tests (as recommended by the French health authorities for routine chronic kidney disease care), which were performed at their usual laboratory at study entry, or at a centralized laboratory for the measurement of serum creatinine, high-sensitivity C-reactive protein, and cystatin C. Blood hemoglobin, serum bicarbonate and albumin, and urine albumin or protein-to-creatinine ratio (ACR) were recorded as well. Estimated glomerular filtration rate was calculated from cystatin C using the Chronic Kidney Disease - Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) equation (2009) giving the most accurate and precise estimated glomerular filtration rate for the prediction of cardiovascular risk and mortality,² and the ACR was either measured or estimated by an equation based on proteinuria measurements.³

Information on medication use was obtained from drug prescriptions during the baseline interview. Patients were asked to bring all their drug prescriptions from the preceding three months to the enrolment visit. The clinical research associates used an electronic case report form (linked to the international Anatomical Therapeutic and Chemical [ATC] thesaurus) to enter standardized ATC codes. Proton pump inhibitors use included omeprazole, esomeprazole, pantoprazole, lansoprazole, or rabeprazole, and diuretic use thiazides, loop diuretics, or distal diuretics. Antidiabetic drugs included the different types of insulin, oral antidiabetic agents (metformin, repaglinide, sulfonylurea, alpha-glucosidase inhibitors, dipeptidyl peptidase-4 inhibitors) or Glucagon-like peptide-1 receptor agonists. Antihypertensive drugs included beta-blockers, calcium channel blockers, renin-angiotensin system inhibitors, aldosterone inhibitors, diuretics, or others (such as centrally acting agents). Lipid-lowering drugs included statins, fibrates, bile acid sequestrants, ezetimibe, or omega-3 fatty acids.

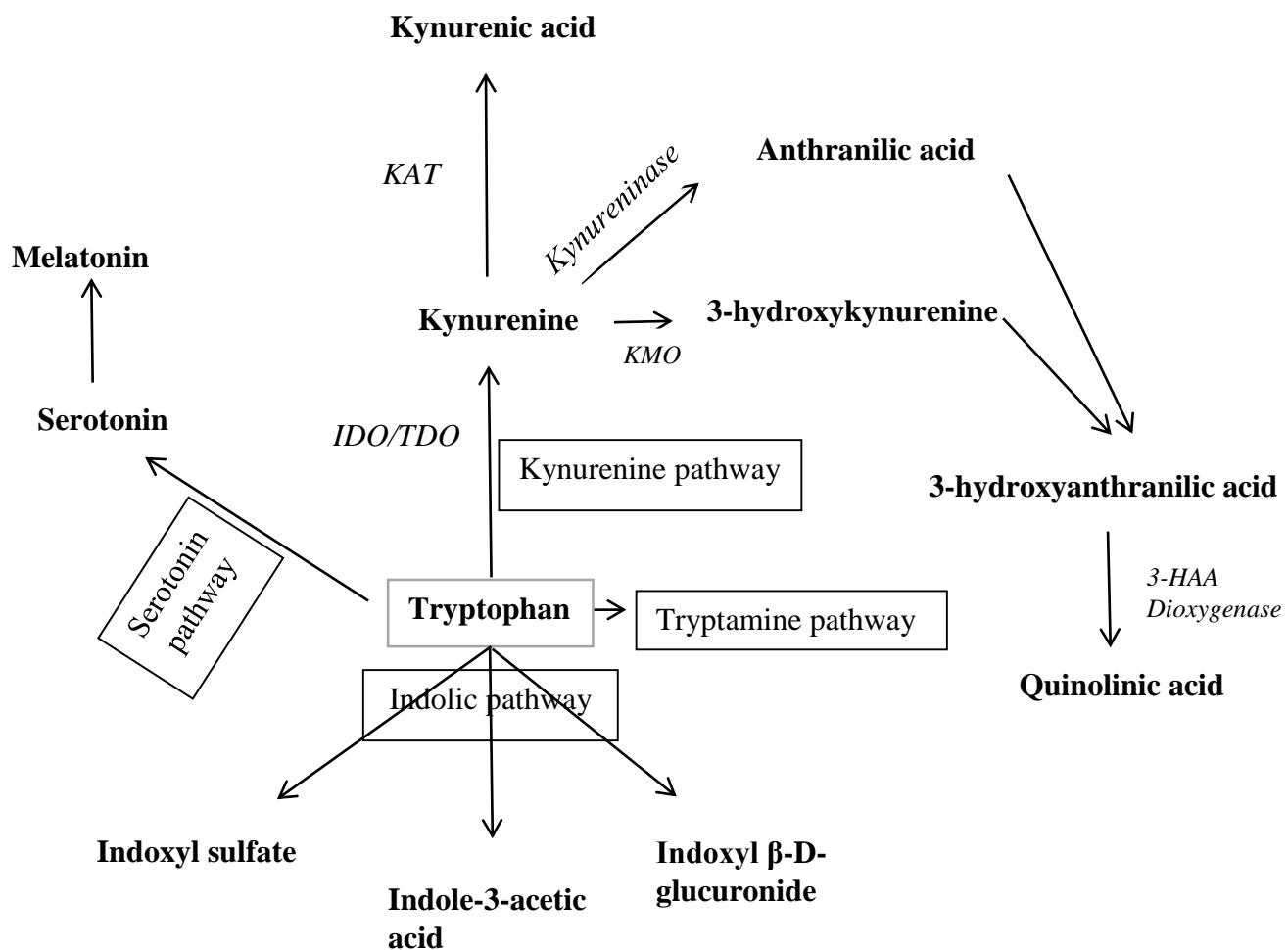
Statistical analysis

The Cox models were adjusted for a set of confounders, which were selected from a directed acyclic graph (DAG), i.e. a diagram of causal pathways summarizing a priori hypothetical causal relationship between variables (Supplemental Figures 3 and 4). This approach allows the selection of optimal set of adjustment factors (i.e. factors associated both with the exposure and the outcome), avoiding adjustment for unnecessary factors, mediators, and colliders.⁴ Associations between serum kynurenine and overall cardiovascular risks, all-cause mortality, cardiovascular and non-cardiovascular mortality risks were adjusted for age at baseline, sex,

high-sensitivity C-reactive protein (CRP), urea, diabetes, dyslipidemia, systolic blood pressure, body mass index (BMI), smoking status, baseline eGFR, urine albumin or protein-to-creatinine ratio (ACR), serum free tryptophan, serum free indoxyl sulfate, indol acetic acid and p-Cresyl Sulfate, prescriptions of diuretics, antihypertensive drugs, lipid-lowering drugs, and antidiabetic drugs. We excluded the prescription of diuretics in the adjustment models evaluating the association with atheromatous cardiovascular risk since no previous study found an association between them; and we excluded dyslipidemia and lipid-lowering drugs in the models evaluating the association with non-atheromatous cardiovascular risk. We added serum albumin to the models when evaluating serum free kynurenine given that kynurenine is a protein-bound molecule and any decrease in serum albumin would increase the free fraction of kynurenine. Proton pump inhibitors (PPIs) are known to increase mortality risk, however, given the limited sources of literature confirming a causal link between PPIs and kynurenine and the direction of association between them, a sensitivity analysis compared the results between an adjusted model including PPIs and another one excluding it. We did not find any difference in the results between these two models, therefore PPIs were not considered as a confounding factor and not included in the adjusted models when evaluating mortality outcomes.

Assuming that data were missing at random, we performed multiple imputation with chained equations (MICE),⁵ implemented in the MICE package in R software (version 4.1.2, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).⁶ Given the proportion of missing data, 20 complete datasets were imputed. All covariates present in the Cox models were included in the imputation model. The follow-up time included in the imputation model is the cumulative hazard rate created according to the Nelson-Aalen estimator of the MICE package in R. Fitted Cox models were generated for each dataset, and pooled regression coefficients were obtained using Rubin's rules.

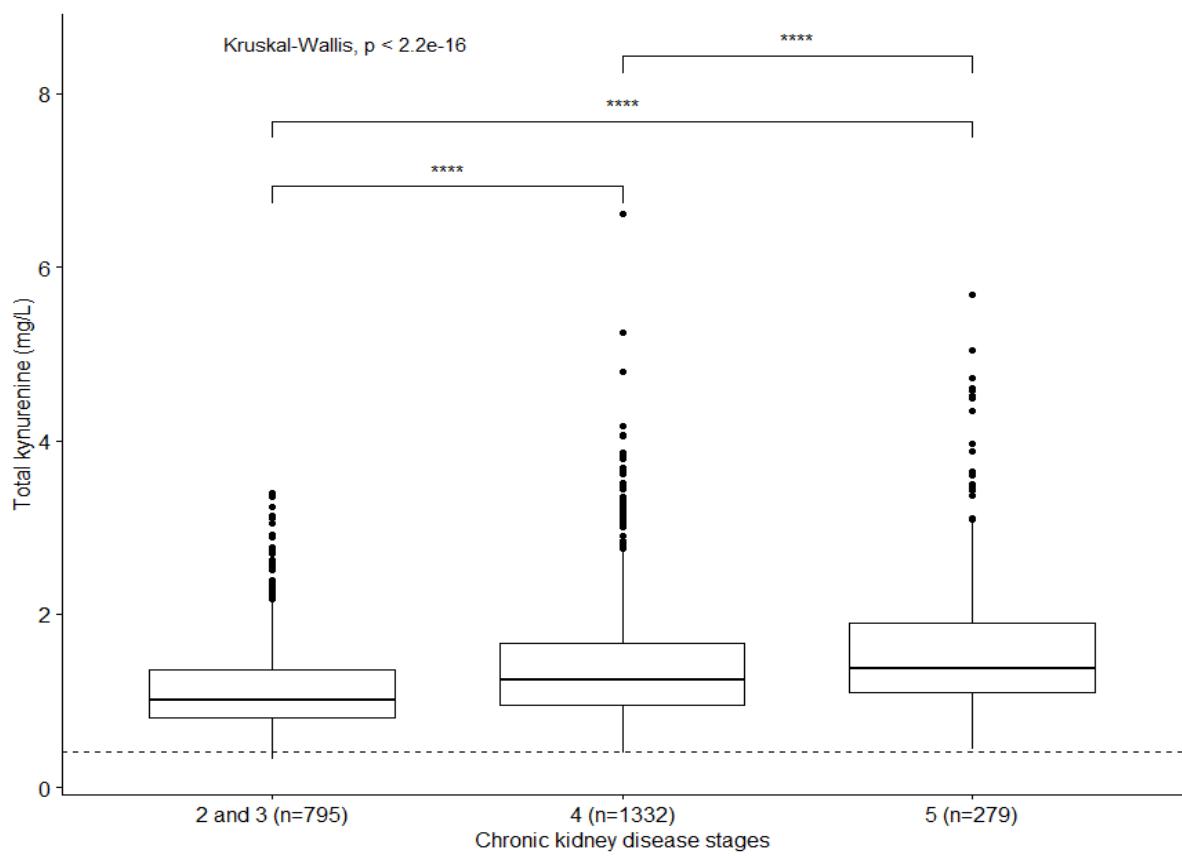
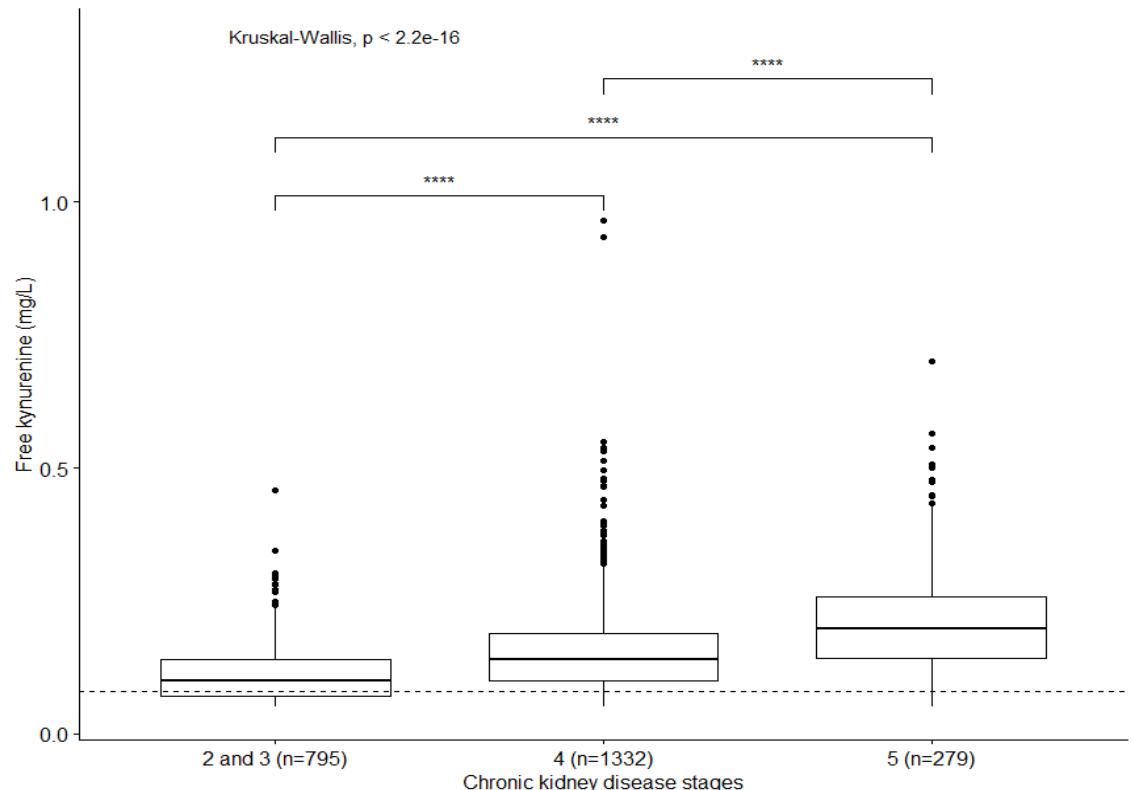
Figure S1. Tryptophan metabolism pathways.



IDO: indoleamine 2,3-dioxygenase; TDO: tryptophan dioxygenase; KAT: kynurenine aminotransferase; KMO: kynurenine monooxygenase; 3-HAA Dioxygenase: 3-hydroxyanthranilic acid dioxygenase.

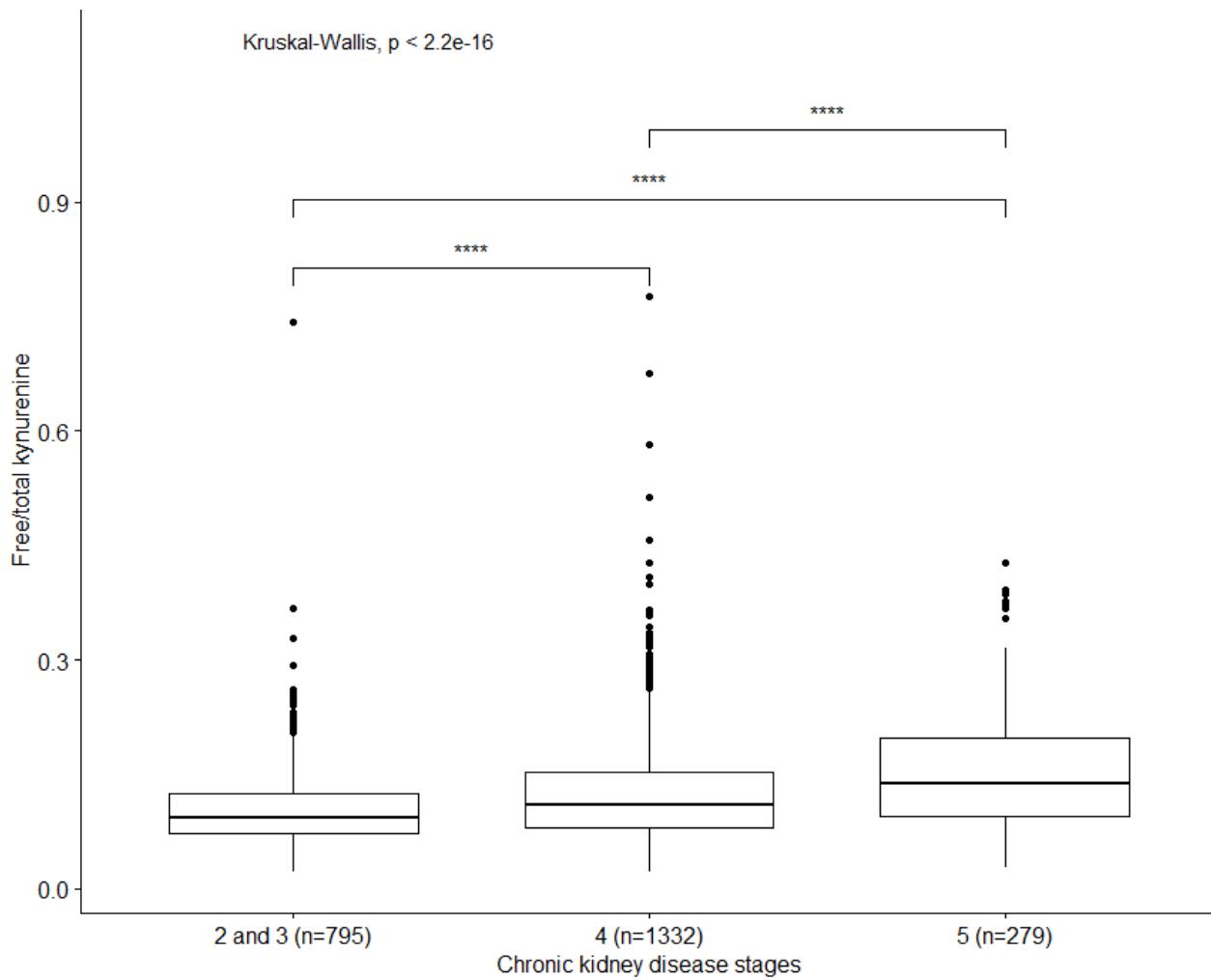
Adapted from Figure 1 in Sallée et al.⁷

Figure S2. Distribution of kynurenine according to the stages of chronic kidney disease.



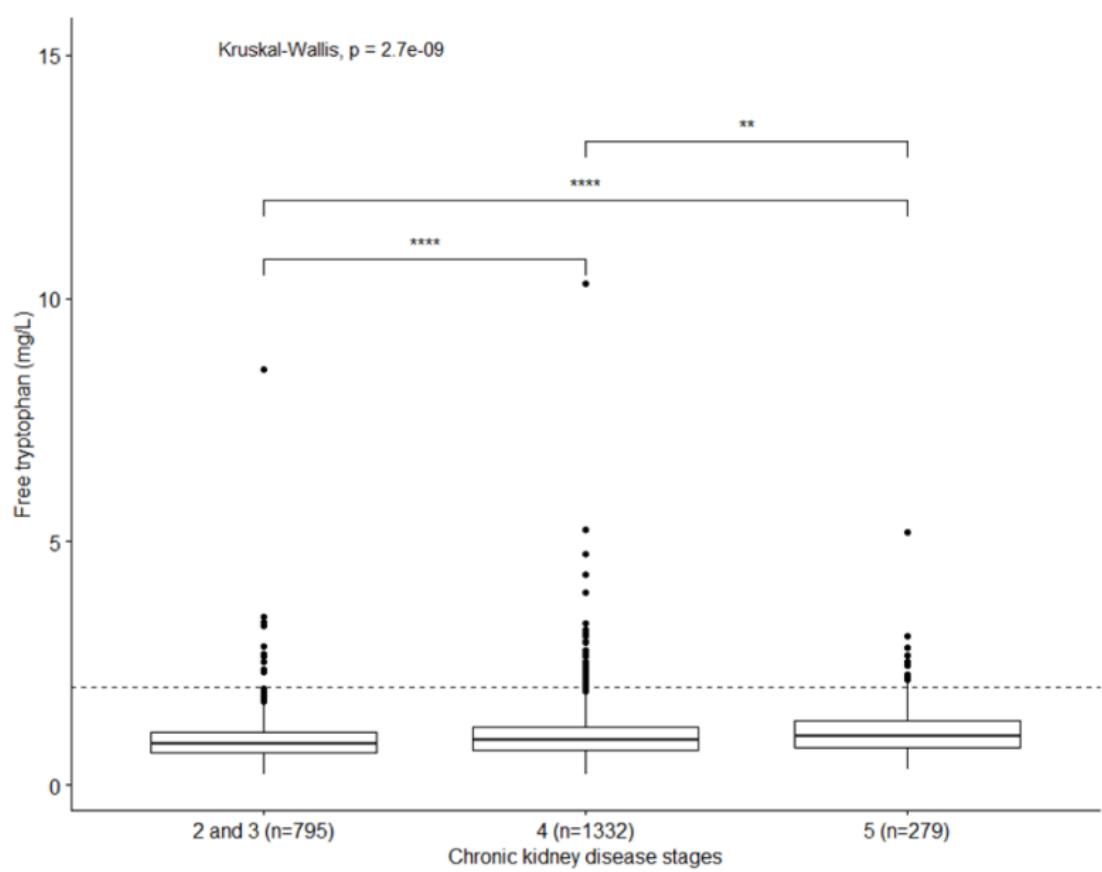
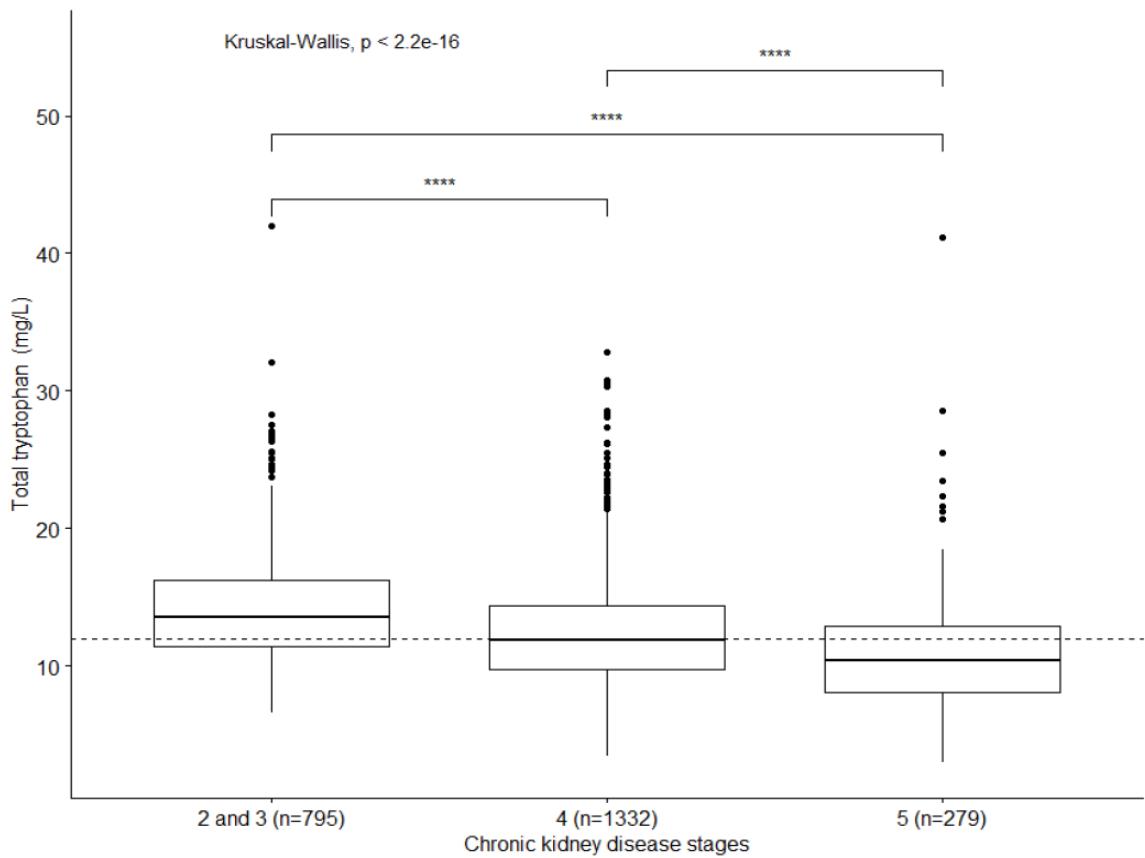
The dotted line indicates the reference value for healthy subjects.
P-values : **** : <0.001.

Figure S3. Distribution of free/total kynurenine according to the stages of chronic kidney disease.



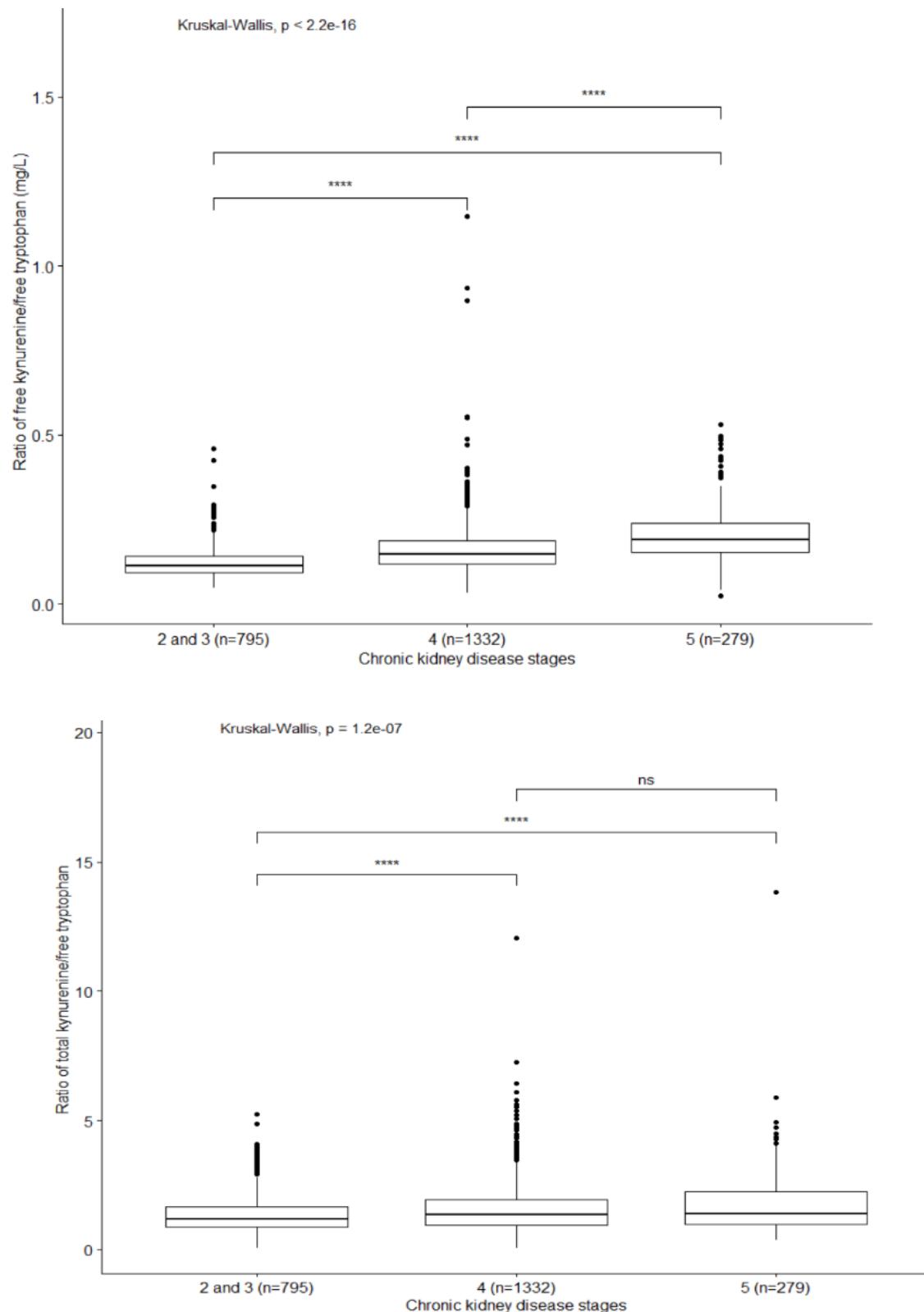
P-value : **** : <0.001.

Figure S4. Distribution of tryptophan according to the stages of chronic kidney disease



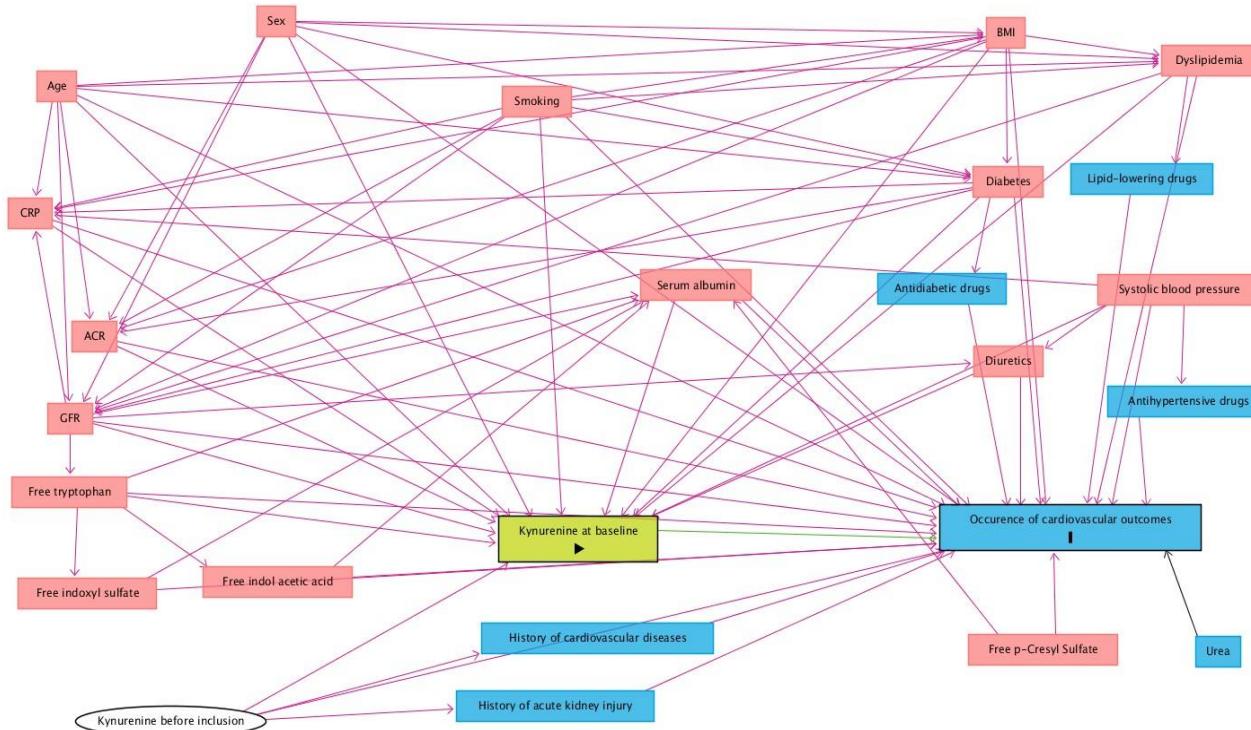
P-values: ** : <0.01 ; **** : <0.001.

Figure S5. Distribution of the ratio kynurenine/tryptophan according to the stages of chronic kidney disease



P-values : ns : non significant ; **** : <0.001.

Figure S6. Directed acyclic graph identifying the minimal sufficient adjustment set for estimating the kynureneine effect on cardiovascular events, atheromatous or not, fatal or not.



ACR : urine albumin-to-creatinine ratio; BMI : body mass index; CRP : C-Reactive Protein ; GFR : glomerular filtration rate.

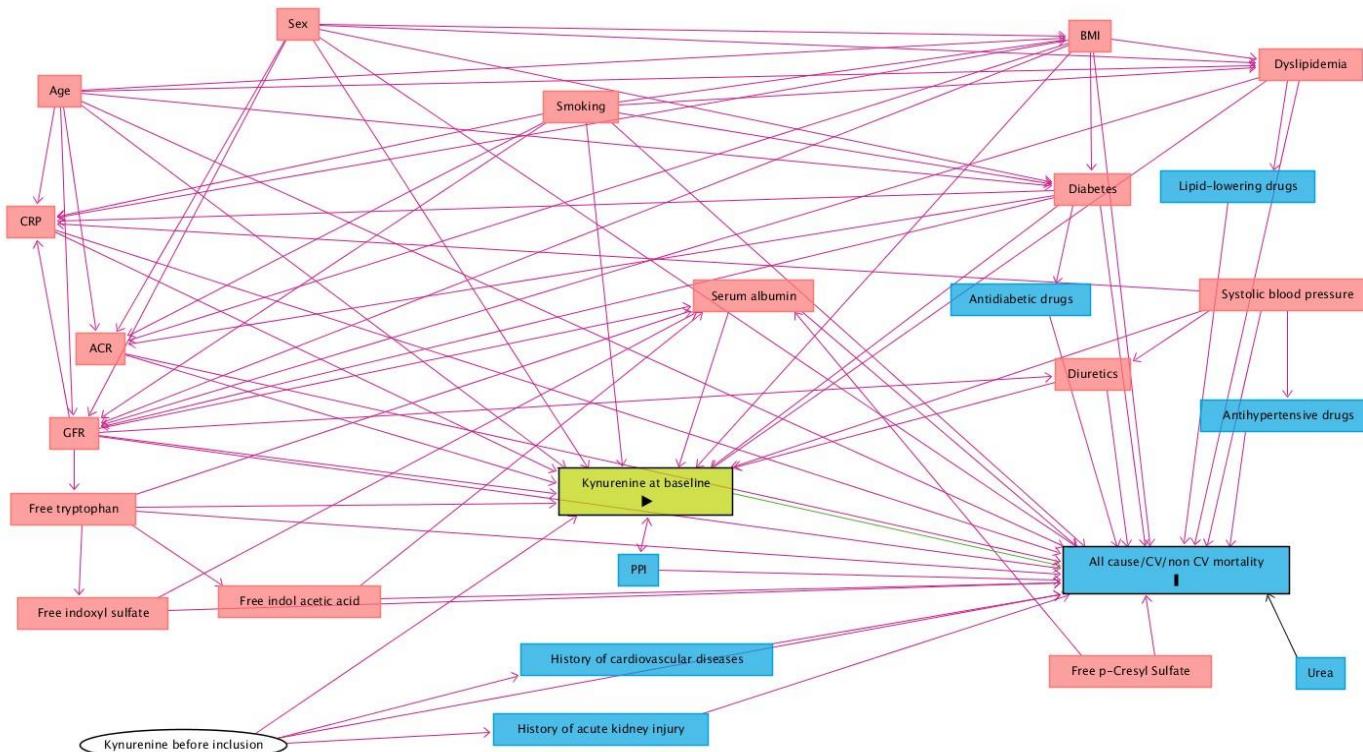
Legend :

- ▶ Exposure
- Outcome
- Risk factor linked to the exposure and outcome
- Risk factor linked to the outcome
- Unobserved variable

The variables selected from the DAG (Figure S6) are those associated with both exposure (kynureneine) and the endpoint (cardiovascular outcomes, fatal or not), or with the outcome only: age, sex, smoking, albuminuria ratio /creatinuria, glomerular filtration rate, CRP, body mass index, dyslipidemia, diabetes, urea, systolic blood pressure, free tryptophan, free indoxyl sulfate, indol acetic acid and p-Cresyl Sulfate, diuretics, antihypertensive drugs, lipid-lowering drugs, and antidiabetic drugs. We cannot adjust on the history of cardiovascular disease nor the history of acute kidney injury that will be considered as colliders and therefore cannot be included in the model in order to avoid biased results. The prescription of diuretics are not selected in the adjustment models evaluating the association with atheromatous

cardiovascular risk; and dyslipidemia and lipid-lowering drugs in the models evaluating the association with non-atheromatous cardiovascular risk. Serum albumin is selected for the models evaluating serum free kynurene.

Figure S7. Directed acyclic graph identifying the minimal sufficient adjustment set for estimating the kynurene effect on all cause/cardiovascular /non cardiovascular mortality.



ACR : urine albumin-to-creatinine ratio; BMI : body mass index; CRP : C-Reactive Protein ; CV : cardiovascular; GFR : glomerular filtration rate; PPI: proton pump inhibitors.

Legend :

- Exposure
- ─ Outcome
- Risk factor linked to the exposure and outcome
- Risk factor linked to the outcome
- Unobserved variable

The variables retained from the DAG (Figure S7) are those associated with both exposure (kynurene) and the endpoint (all-cause/CV/non CV mortality), or with the outcome only: age, sex, smoking, albuminuria ratio /creatinuria, glomerular filtration rate, CRP, body mass index, dyslipidemia, diabetes, urea, systolic blood pressure, free tryptophan, free indoxyl sulfate, indol acetic acid and p-Cresyl Sulfate, diuretics, antihypertensive drugs, lipid-lowering drugs, and antidiabetic drugs. Concerning PPIs, and given that we have no sources of literature confirming the causal link with kynurene and in which direction the association exists, a sensitivity analysis will be necessary to compare the results of a model

excluding this factor and another one including it. We cannot adjust on the history of cardiovascular disease nor the history of acute kidney injury that will be considered as colliders and therefore cannot be included in the model in order to avoid biased results. Serum albumin is selected for the models evaluating serum free kynurenine.

Table S1. Characteristics of the study population according to the tertiles of serum total kynurenine

Characteristics	Total	Tertiles of serum total kynurenine (mg/L)			P-value ²	Imputed data
	N = 2406 ¹	<0.99 (n=799) ¹	[0.99-1.4) (n=804) ¹	>=1.4 (n=803) ¹		
Age at baseline (years)	68 [60-76]	68 [60-75]	68 [59-76]	69 [62-76]	0.09	0%
Men	66%	65%	66%	66%	0.9	0%
eGFR at baseline (ml/min/1.73m²)	24.7 [18.4-33.1]	29 [22-38]	24 [17-32]	22 [17-28]	<0.0001	0%
Albumin- or protein-to-creatinine ratio (mg/g)	104 [21-491]	77 [18-382]	113 [22-546]	135 [28-566]	<0.0001	11.5%
History of acute kidney injury	23%	22%	23%	25%	0.6	7.2%
Smoking status					0.01	
Never-smoker	40.5%	41%	38%	42%		
Current smoker	12.5%	15%	12%	9.9%		0.6%
Former smoker	47%	44%	50%	48%		
Systolic blood pressure (mmHg)	140 [128-153]	139 [129-154]	139 [127-151]	140 [130-154]	0.1	0.5%
Diabetes	41%	39%	43%	42%	0.2	0.2%
Dyslipidemia	74%	73%	73%	74%	0.8	0.4%
History of cardiovascular disease	52%	49%	53%	55%	0.06	0.5%
Serum bicarbonate (mmol/L)	25 [23-27]	25 [23-27]	25 [23-27]	25 [22.6-27]	0.1	8.8%
Serum albumin (g/L)	40.4 [38-43]	40.3 [37.9-43]	40.6 [38-43]	40.4 (37.7-43)	0.6	14.5%
Hemoglobin (g/dL)	13 [11.8-14.2]	13.1[11.95-14.3]	13 [11.8-14.1]	12.9 [11.8-14.1]	0.1	0.9%
High-sensitivity C-reactive protein (mg/L)	2.4 [1.1-5.1]	2.1 [0.9-4.5]	2.2 [1.1-4.9]	2.7 [1.2-5.8]	<0.0001	5.4%

Body mass index (kg/m²)	27.9 [24.7-31.7]	27.1 [24.2-30.9]	28.1 [24.7-32]	28.4 [25.3-32.3]	<0.00 01	1.9%
PPI prescription at baseline	32%	32%	32%	34%	0.6	0.2%
Diuretics prescription at baseline	52%	48%	53%	56%	0.004	0.3%
Antihypertensive drugs prescription at baseline	2243 (94%)	729 (92%)	748 (94%)	766 (96%)	0.006	0.3%
Lipid-lowering drugs prescription at baseline	1520 (63%)	489 (61%)	502 (63%)	529 (66%)	0.2	0.3%
Antidiabetic drugs prescription at baseline	820 (34%)	255 (32%)	296 (37%)	269 (34%)	0.1	0.3%
Free tryptophan (mg/L)	0.91 [0.7-1.17]	0.85 [0.66-1.08]	0.94 [0.72-1.23]	0.96 [0.76-1.25]	<0.00 01	0%
Total tryptophan (mg/L)	12.3 [10-14.8]	10.7 [8.8-12.9]	12 [10.1-14.1]	14.4 [11.9-17.6]	<0.00 01	0%
Total kynurenine	1.19 [0.91-1.6]	0.8 [0.7-0.9]	1.18[1.08-1.3]	1.8[1.6-2.2]		0%
Free kynurenine	0.13 [0.09-0.18]	0.09 [0.07-0.12]	0.13[0.1-0.19]	0.16[0.1-0.2]	<0.00 01	0%

¹ Median [Q1-Q3]; %

² Kruskal-Wallis rank sum test; Pearson's Chi-squared test

eGFR: estimated glomerular filtration rate; PPI: proton pump inhibitor.

Table S2. Hazard ratio for fatal and nonfatal cardiovascular events, according to the baseline serum total kynurenine level (mg/L).

	Total kynurenine (mg/L)
Unadjusted HR [95% CI] – p-value	1.5 [1.3, 1.7] -- <0.001
Adjusted HR¹ [95% CI] – p-value	1.2 [1.05, 1.4] – 0.01
Adjusted HR² [95% CI] – p-value	1.2 [1.05, 1.4] – 0.01
Adjusted HR³ [95% CI] – p-value	1.2 [1.05, 1.4] -- 0.01

¹Model adjusted for age at baseline, sex, high-sensitivity C-reactive protein, urea, diabetes, dyslipidemia, body mass index, smoking status, baseline estimated glomerular filtration rate, urine albumin- or protein-to-creatinine ratio, systolic blood pressure, prescriptions of diuretics, antihypertensive drugs, lipid-lowering drugs, and antidiabetic drugs.

² 1+serum free tryptophan.

³ 1+ serum free indoxyl sulfate, indole-3-acetic acid and p-Cresyl Sulfate.

Table S3. Hazard ratio for atheromatous cardiovascular events, according to the baseline serum total kynurenine level (mg/L).

	Total kynurenine (mg/L)
Unadjusted HR [95% CI] – p-value	1.5 [1.2, 1.8] – 0.0003
Adjusted HR¹ [95% CI] – p-value	1.3 [1.04, 1.64] – 0.02 1.15 [1.01, 1.3] – 0.03
Adjusted HR² [95% CI] – p-value	1.3 [1.04, 1.6] – 0.02
Adjusted HR³ [95% CI] – p-value	1.29 [1.03, 1.6] – 0.02

¹Model adjusted for age at baseline, sex, high-sensitivity C-reactive protein, urea, diabetes, dyslipidemia, body mass index, smoking status, baseline estimated glomerular filtration rate, urine albumin- or protein-to-creatinine ratio, systolic blood pressure, prescriptions of antihypertensive drugs, lipid-lowering drugs, and antidiabetic drugs.

² 1+serum free tryptophan.

³ 1+ serum free indoxyl sulfate, indole-3-acetic acid and p-Cresyl Sulfate.

Table S4. Hazard ratio for non-atheromatous cardiovascular events, according to the baseline serum total kynurenine level (mg/L).

	Total kynurenine (mg/L)
Unadjusted HR [95% CI] – p-value	1.7 [1.4, 1.9] -- <0.001
Adjusted HR¹ [95% CI] – p-value	1.21 [1.006 , 1.46] – 0.04
Adjusted HR² [95% CI] – p-value	1.21 [1.009 , 1.46] – 0.04
Adjusted HR³ [95% CI] – p-value	1.2 [1.01, 1.46] – 0.03

¹Model adjusted for age at baseline, sex, high-sensitivity C-reactive protein, urea, diabetes, body mass index, smoking status, baseline estimated glomerular filtration rate, urine albumin- or protein-to-creatinine ratio, systolic blood pressure, prescriptions of diuretics, antihypertensive drugs, and antidiabetic drugs.

² 1+serum free tryptophan.

³ 1+ serum free indoxyl sulfate, indol-3-acetic acid and p-Cresyl Sulfate.

Table S5. Hazard ratio for all-cause mortality, according to the baseline serum total kynurenine level (mg/L).

	Total kynurenine (mg/L)
Unadjusted HR [95% CI] – p-value	1.4 [1.1, 1.6] -- 0.0009
Adjusted HR¹ [95% CI] – p-value	1.04 [0.9, 1.3] – 0.7
Adjusted HR² [95% CI] – p-value	1.04 [0.9, 1.3] – 0.7
Adjusted HR³ [95% CI] – p-value	1.04 [0.9, 1.3] – 0.6

¹Model adjusted for age at baseline, sex, high-sensitivity C-reactive protein, urea, diabetes, dyslipidemia, body mass index, smoking status, baseline estimated glomerular filtration rate, urine albumin- or protein-to-creatinine ratio, systolic blood pressure, prescriptions of diuretics, antihypertensive drugs, lipid-lowering drugs, and antidiabetic drugs.

² 1+serum free tryptophan.

³ 1+ serum free indoxyl sulfate, indol-3-acetic acid and p-Cresyl Sulfate.

Table S6. Hazard ratio for non-cardiovascular mortality, according to the baseline serum total kynurenine level (mg/L).

	Total kynurenine (mg/L)
Unadjusted HR [95% CI] – p-value	1.3 [1.07, 1.7] – 0.008
Adjusted HR¹ [95% CI] – p-value	1.01 [0.8, 1.3] – 0.9
Adjusted HR² [95% CI] – p-value	1.01 [0.8, 1.3] – 0.9
Adjusted HR³ [95% CI] – p-value	1.009 [0.8, 1.3] – 0.9

¹Model adjusted for age at baseline, sex, high-sensitivity C-reactive protein, urea, diabetes, dyslipidemia, body mass index, smoking status, baseline estimated glomerular filtration rate, urine albumin- or protein-to-creatinine ratio, systolic blood pressure, prescriptions of diuretics, antihypertensive drugs, lipid-lowering drugs, and antidiabetic drugs.

² 1+serum free tryptophan.

³ 1+ serum free indoxyl sulfate, indol-3-acetic acid and p-Cresyl Sulfate.

Table S7. Hazard ratio for cardiovascular mortality, according to the baseline serum total kynurenine level (mg/L).

	Total kynurenine (mg/L)
Unadjusted HR [95% CI] – p-value	1.5 [1.05, 2.04] – 0.02
Adjusted HR¹ [95% CI] – p-value	1.16 [0.8, 1.7] – 0.4
Adjusted HR² [95% CI] – p-value	1.16 [0.8, 1.7] – 0.4
Adjusted HR³ [95% CI] – p-value	1.17 [0.8, 1.7] – 0.4

¹Model adjusted for age at baseline, sex, high-sensitivity C-reactive protein, urea, diabetes, dyslipidemia, body mass index, smoking status, baseline estimated glomerular filtration rate, urine albumin- or protein-to-creatinine ratio, systolic blood pressure, prescriptions of diuretics, antihypertensive drugs, lipid-lowering drugs, and antidiabetic drugs.

² 1+serum free tryptophan.

³ 1+ serum free indoxyl sulfate, indol-3-acetic acid and p-Cresyl Sulfate.

List of biological resources centers

The authors would like to thank the teams of all the biological resources centers that participated in the CKD-REIN project:

- Biobanque de Picardie, CRB du Centre Hospitalier Universitaire Amiens Picardie, 1 Rond-Point du Pr Christian Cabrol, 80054 Amiens Cedex 1 (BRIF number: BB-0033-00017)
- NeuroBioTec, CRB des Hospices Civils de Lyon Groupement Hospitalier Est, Hôpital Neurologique, 59 Boulevard Pinel, 69677 Bron Cedex (BRIF number: BB-0033-00046)
- Centre de ressources biologiques du Centre Hospitalier Universitaire de Nantes Hôtel Dieu, Institut de biologie, 9, quai Moncousu, 44093 Nantes Cedex 1 (BRIF number: BB-0033-00040)
- Centre de ressources biologiques du Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes, Boulevard de la Chantourne, CS 10217, 38700 La Tronche (BRIF number: BB-0033-00069)
- Centre de ressources biologiques du Centre Hospitalier Régional Universitaire de Nancy, Hôpitaux de Brabois, Bâtiment Recherche Rue du Morvan, 54500 Vandoeuvre-les-Nancy (BRIF number: BB-0033-00035)

- Servicer de Néphrologie, Centre Hospitalier de Perpignan, 20 Avenue du Languedoc, 66046 Perpignan Cedex 9
- Plateforme de Ressources Biologiques, Hôpital Henri Mondor, 51 avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94000 Créteil (BRIF number: BB-0033-00021)
- CIC-1435, Centre d'Investigation Clinique Plurithématique, Centre Hospitalier Universitaire de Limoges, 2 Avenue Martin Luther King, 87042 Limoges Cedex
- Plateforme de Ressources Biologiques de l'Hôpital européen Georges-Pompidou, 20-40 rue Leblanc, 75015 Paris (BRIF number: BB-0033-00063)
- Etablissement Français du sang Hauts de France – Normandie, Site de Bois-Guillaume 609, chemin de la Bretèque, 76235 Bois-Guillaume
- Etablissement Français du sang Nouvelle Aquitaine, site Pellegrin, Place Amélie Raba Léon, CS 21010, 33075 Bordeaux Cedex
- Etablissement Français du sang Hauts de France – Normandie, Site de Loos-Eurasanté, Avenue Pierre Mauroy, Parc Eurasante Epi-de Soil, 59120 Loos
- Etablissement Français du sang Ile de France, Site Avicenne, Hopital Avicenne porte 8, 125 route de Stalingrad, 93009 Bobigny
- Etablissement Français du sang Occitanie, Site de Toulouse, 75 rue de Lisieux, 31300 Toulouse
- Etablissement Français du sang Grand-Est, Site de Colmar, 6 rue du Hohnack, 68025 Colmar Cedex
- Etablissement Français du sang Grand-Est, Site de Metz, 6 rue des Dames de Metz, 57000 Metz
- Etablissement Français du sang PACA-Corse, Site de Marseille, 149, boulevard Baille, 13392 Marseille Cedex 05

References

1. Fabresse N, Uteem I, Lamy E, Massy Z, Larabi IA, Alvarez J-C. Quantification of free and protein bound uremic toxins in human serum by LC-MS/MS: comparison of rapid equilibrium dialysis and ultrafiltration. *Clinica Chimica Acta*. 2020;507:228-235.
2. Lees JS, Welsh CE, Celis-Morales CA, et al. Glomerular filtration rate by differing measures, albuminuria and prediction of cardiovascular disease, mortality and end-stage kidney disease. *Nature medicine*. 2019;25(11):1753-1760.
3. Sumida K, Nadkarni GN, Grams ME, et al. Conversion of urine protein–creatinine ratio or urine dipstick protein to urine albumin–creatinine ratio for use in chronic kidney disease screening and prognosis: An individual participant–based meta-analysis. *Annals of internal medicine*. 2020;173(6):426-435.
4. Suttorp MM, Siegerink B, Jager KJ, Zoccali C, Dekker FW. Graphical presentation of confounding in directed acyclic graphs. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2015;30(9):1418-1423.
5. Buuren S, Groothuis-Oudshoorn K, Robitzsch A, Vink G, Doove L, Jolani S. mice: Multivariate Imputation by Chained Equations in R. *J Stat Softw* 2011 2011;45(1):1-67. . doi:10.18637/jss.v045.i03
6. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria Accessed March, 2023. <http://www.R-project.org/>
7. Sallée M, Dou L, Cerini C, Poitevin S, Brunet P, Burtey S. The aryl hydrocarbon receptor-activating effect of uremic toxins from tryptophan metabolism: a new concept to understand cardiovascular complications of chronic kidney disease. *Toxins*. 2014;6(3):934-949.

1 *Annexe 3*

2 *Article*

3 **Proton-pump inhibitors and serum concentrations of uremic 4 toxins in patients with chronic kidney disease**

5 Carolla El Chamieh ¹, Islam Amine Larabi ^{2†}, Solène M Laville ^{3,4†}, Christian Jacquelinet ^{1,5}, Christian Combe ^{6,7},
6 Denis Fouque ^{8,9}, Maurice Laville ⁹, Luc Frimat ^{10,11}, Roberto Pecoits-Filho ^{12,13}, Céline Lange ¹, Bénédicte Stengel ¹,
7 Natalia Alencar De Pinho ¹, Jean-Claude Alvarez ^{4#}, Ziad A Massy ^{5,14 #}, Sophie Liabeuf ^{1,3 *} on behalf of the Chronic
8 Kidney Disease-Renal Epidemiology and Information Network (CKD-REIN) Study Group

9 [†] These two authors contributed equally to the paper

10 [#] These two authors contributed equally to the paper

11

12 ¹ Centre for Research in Epidemiology and Population Health (CESP), INSERM UMRS 1018, Université Paris-Saclay,
13 Université Versailles Saint Quentin, F-94807 Villejuif, France

14 ² Department of Pharmacology and Toxicology, Inserm U-1173, UFR Simone Veil Santé UVSQ-Paris-Saclay University,
15 Raymond Poincaré Hospital, AP-HP, 104 Boulevard Raymond Poincaré, 92380 Garches, France

16 ³ Pharmacoepidemiology Unit, Department of Clinical Pharmacology, Amiens-Picardie University Medical Center,
17 F-80054 Amiens, France

18 ⁴ MP3CV Laboratory, Jules Verne University of Picardie, F-80054 Amiens, France

19 ⁵ Biomedecine Agency, F-93210 Saint Denis La Plaine, France

20 ⁶ Service de Néphrologie Transplantation Dialyse Aphérèse, Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, F-33076
21 Bordeaux, France

22 ⁷ INSERM, U1026, Univ Bordeaux Segalen, Bordeaux, France

23 ⁸ Nephrology Dept, Centre Hospitalier Lyon Sud, Université de Lyon, Carmen, F-69495 Pierre-Bénite, France

24 ⁹ Université de Lyon, CarMeN INSERM 1060, F-69008 Lyon, France

25 ¹⁰ Nephrology Department, CHRU de Nancy, F-54000 Vandoeuvre-lès-Nancy, France
Citation: To be added by editorial staff during production.

26 ¹¹ Lorraine University, APEMAC, F-54000 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Received: date

27 ¹² Arbor Research Collaborative for Health, Ann Arbor MI, USA

Revised: date

28 ¹³ School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil

Accepted: date

29 ¹⁴ Department of Nephrology, Ambroise Paré University Hospital, APHP, F-92104 Boulogne-Billancourt/Paris,
30 France

Published: date



Copyright: © 2022 by the author(s)

Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons

Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

*Correspondence: liabeuf.sophie@chu-amiens.fr

Abstract: Use of proton-pump inhibitors (PPIs) is common in patients with chronic kidney disease (CKD). PPIs and many uremic toxins (UTs) are eliminated by a kidney tubular organic anion transporter system. In a cross-sectional study, we sought to evaluate the association between PPI prescription and serum concentrations of various UTs. We studied a randomly selected subgroup of participants in the CKD-REIN cohort (adult patients with a confirmed diagnosis of CKD and estimated glomerular filtration rate (eGFR) <60ml/min/1.73m²) with available frozen samples collected at baseline. PPI prescription was recorded at baseline. Serum concentrations of 10 UTs were measured using a validated liquid chromatography tandem mass spectrometry technique. Multiple linear regression was performed, with the log UT concentration as the dependent variable. Of the 680 included patients [median age: 68 years; median eGFR: 32 ml/min/1.73 m²], 31% had PPI prescriptions at baseline. Patients using PPIs had higher levels of certain UTs in comparison to other patients, including total and free indoxyl sulfate (IS), total and free p-cresylsulfate, total and free p-cresylglucuronide (PCG), phenylacetylglutamine (PAG), free kynurenone, and free hippuric acid. After adjustment for baseline comorbidities, number of co-prescribed drugs and laboratory data including eGFR, associations between PPI prescription and elevated serum concentrations of free and total IS, free and total PCG, and PAG remained significant. Our results indicate that PPI prescription is independently associated with serum UT retention. These findings are interesting to better understand the factors that may modulate serum UT concentration in CKD patients, however, they will need to be confirmed by longitudinal studies.

Keywords: uremic toxins; indoxyl sulfate; proton-pump inhibitor; chronic kidney disease

Key Contribution: By finding an association between proton-pump inhibitor use and elevated serum concentrations of uremic toxins, this article highlights an important area of investigation to identify factors that may modulate serum uremic toxins concentrations and their deleterious effect in a chronic kidney disease setting.

1. Introduction

Chronic kidney disease (CKD) is a global health burden affecting between 8 and 16% of the adult population worldwide [1-4]. It is a progressive, irreversible condition that is responsible for a non-negligible rate of complications, affecting the quality of life and increasing hospitalization rates. Cardiovascular and overall mortality risks are increased with the progression of CKD [3].

This public health issue is characterized by the accumulation of uremic toxins (UTs) as the level of kidney function decreases. In fact, UTs constitute one of the non-traditional risk factors associated with the progression of CKD and an elevated incidence of cardiovascular (CV) morbidity and mortality, neurotoxicity, and/or bone disease [2, 5]. Hence, there is a fundamental need to identify factors that can impact UT concentrations.

Many UTs and drugs administered to CKD patients are organic anions, which are physiologically eliminated by the organic anion transporter (OAT) system [6, 7]. OATs (mainly expressed in the kidney, liver, and brain) are known to be involved in the transportation of a number of commonly prescribed drugs, such as proton-pump inhibitors (PPIs), diuretics and antibiotics [8,9]. Moreover, the results of recent in vitro and in vivo studies have demonstrated that over 35 UTs (especially the protein-bound toxins, like indoxyl sulfate (IS) and p-cresyl sulfate (PCS)) are substrates for the main renal toxin and drug transporters OAT1 (also known as SLC22A6) and OAT3 (also known as SLC22A8) expressed in the proximal tubule in the kidney [10, 11]. Therefore, potential UT-drug competition might explain changes in the concentrations of certain UTs and might accentuate toxic cascade effects.

A few studies have shown that the inhibition of OAT1/OAT3 transporters (whether renal or neuronal) induces the accumulation of UTs [7, 8, 12]. For example, an in vivo

study in rats demonstrated that the administration of ciprofloxacin decreased the renal clearance of IS [13].

Patients with CKD usually suffer from multiple comorbidities. Thus, polypharmacy is highly prevalent in this population and frequently involves PPIs [14]. The latter drugs are well known to be OAT1/OAT3 inhibitors; one can therefore reasonably hypothesize that PPIs and UTs interact. The adverse outcomes associated with PPI use in CKD patients have been investigated, with associations between PPI prescription and acute kidney injury (AKI), progression to end-stage kidney disease, and mortality [14].

To the best of our knowledge, the association between PPI prescription and serum UT concentrations has not previously been investigated in patients with non-dialysis-dependent (NDD) CKD. Our starting hypothesis was that serum UT concentrations are higher in patients using PPIs than in those who do not, and that this association is independent of other determinants of UT level including estimated glomerular filtration rate (eGFR). The main objective of the present cross-sectional study was to evaluate a putative, independent association between PPI prescription and baseline serum concentrations of various UTs in a sub-cohort of patients with NDD CKD, after adjustment for the eGFR and other confounding factors.

2. Results

2.1. Baseline patients' characteristics

A total of 680 patients were analyzed in this study, with overall patients' characteristics described in Table 1. The median [interquartile range (IQR)] age of the participants was 68 [61–77] years, 31% were women, and the median body mass index (BMI) was 28 [25.2–31.4] kg/m². A large proportion of the participants had diabetes (40%). Almost all the participants had hypertension (96.6%). 49% of the participants were former smokers, and 21% presented a history of AKI. 31% of patients had a PPI prescription at inclusion. The median eGFR was 32 [23–41] ml/min/1.73 m². PPI users differed significantly from non-users with regard to baseline characteristics. Patients with a PPI prescription were significantly older, more likely to be female, had higher serum high-sensitivity C-reactive protein (CRP) levels, a greater prevalence of comorbidities, a greater median total number of medications, and lower serum levels of eGFR, albumin, and hemoglobin ($P < 0.05$).

The distribution of log normalized UT serum levels by CKD stage is shown in Figure S1 in the supplementary material. Patients with more advanced CKD had significantly higher UT concentrations, except for the free 3-carboxy-4-ethyl-5-propyl-2-furanpropionic acid (CMPF) fraction.

Table 1. Baseline characteristics of the study population.

Characteristics	Total (N=680) ^a	PPI use (n=211) ^a	No PPI use (n=469)	P-value ^b	Imputed data
Age at baseline (years)	68 [61-77]	71 [65-78]	67 [59-75]	<0.001	0%
Women	31%	37%	28%	0.02	0%
eGFR at baseline (ml/min/1.73 m²)	32 [23-41]	30 [22-39]	32 [24-42]	0.02	0%
Albuminuria categories				0.38	8%
A1 (Normal to mildly increased)	30%	27%	31%		
A2 (Moderately increased)	30%	33.5%	28%		
A3 (Severely increased)	40%	39.5%	41%		
History of acute kidney injury	21%	28%	17.5%	0.002	7.5%

Smoking status					
Never-smoker	38%	39.5%	37.5%	0.69	0.7%
Current smoker	13%	13.5%	12%		
Former smoker	49%	47%	50.5%		
Hypertension	96.6%	98%	96%	0.16	0.3%
Diabetes	40%	44%	38.5%	0.16	0.3%
Dyslipidemia	73%	79.4%	69.6%	0.008	0.4%
History of cardiovascular disease	52%	63.5%	47.3%	<0.001	0.6%
Serum albumin (g/l)	40.5 [37.8-43]	40 [37.5-42]	41 [38-43]	0.03	14%
Hemoglobin (g/dl)	13.1 (1.64)	12.8 (1.7)	13.2 (1.5)	0.002	0.6%
High-sensitivity C-reactive protein (mg/l)	2 [1-6]	4 [2-8]	2 [1-5]	<0.001	0%
Body mass index (kg/m²)	28 [25.2-31.4]	28.5 [25.1-32.4]	27.8 [25.2-31]	0.38	1.1%
Total number of medications	8 [5-10]	10 [8-12]	7 [4-9]	<0.001	0.29%

^a Median [interquartile range] or mean (standard deviation); %

^b Wilcoxon rank sum test or t test ; Pearson's Chi-squared test.

The most three prescribed PPIs in our study are esomeprazole, lansoprazole, and omeprazole respectively (Table 2).

Table 2. Description of types of PPI prescription.

Types of PPI	PPI prescription (N=211)^a
Omeprazole	41 (19.5%)
Esomeprazole	100 (47.5%)
Pantoprazole	11 (5%)
Lansoprazole	48 (23%)
Rabeprazole	11 (5%)

^a n (%)

2.2. Crude analysis: associations between uremic toxins and proton-pump inhibitors

Table 3 summarizes the distribution of each UT concentration in the study population and the comparisons of their respective levels according to PPI prescription. Both free and total fractions of UTs are given for protein-bound UTs.

The median serum levels of free and total IS, free kynurenone, free and total PCS, free and total p-cresyl glucuronide (PCG), phenylacetylglutamine (PAG), and free hippuric acid (HA) were significantly higher for PPI users than for the other patients.

We did not observe significant intergroup differences for free and total indole-3-acetic acid (IAA), total kynurenone, total kynurenic acid (KA), total HA, free and total CMPF, trimethylamine N-oxide (TMAO), or urea. Hence, possible associations between these variables and PPIs were not assessed further by adjustment for confounding factors in multiple regression analysis.

141
142

143

Table 3. Median serum uremic toxin concentrations according to PPI use at baseline.

Uremic toxin	Total (N=680) ^a	PPI use (n=211) ^a	No PPI use(n=469) ^a	P-value ^b	Impute d data
Indoxyl sulfate (mg/l)					0%
Free	0.06 [0.03-0.1]	0.08 [0.04-0.14]	0.05 [0.03-0.1]	<0.001	
Total	4.7 [2.7-8.0]	5.7 [3.3-10.60]	4.3 [2.4-7.20]	<0.001	
Indole-3-acetic acid (mg/l)					0%
Free	0.034 [0.023-0.053]	0.035 [0.024-0.056]	0.034 [0.023-0.05]	0.31	
Total	0.59 [0.38-0.88]	0.57 [0.37-0.80]	0.6 [0.4-0.90]	0.60	
Kynurenone (mg/l)					0%
Free	0.15 [0.10-0.20]	0.2 [0.1-0.22]	0.15 [0.1-0.2]	0.04	
Total	1.40 [1.07-1.86]	1.44 [1.04-1.90]	1.38 [1.08-1.80]	0.97	
Kynurenic acid (mg/l)					0%
Free	< LOD	NA	NA		
Total	0.029 [0.018-0.043]	0.03 [0.02-0.04]	0.03 [0.02-0.04]	0.54	
P-cresyl sulfate (mg/l)					0%
Free	0.22 [0.11-0.47]	0.31 [0.15-0.57]	0.20 [0.09-0.41]	<0.001	
Total	16 [8-27]	18 [11-30]	15 [8-25]	0.003	
P-cresyl glucuronide (mg/l)					0%
Free	0.06 [0.02-0.13]	0.09 [0.04-0.17]	0.05 [0.02-0.11]	<0.001	
Total	0.08 [0.03-0.19]	0.13 [0.05-0.24]	0.06 [0.03-0.16]	<0.001	
Hippuric acid (mg/l)					0%
Free	0.91 [0.44-1.91]	1.05 [0.50-2.07]	0.86 [0.42-1.78]	0.025	
Total	3.7 [1.9-7.8]	4.2 [2.1-8.2]	3.5 [1.8-7.3]	0.17	
3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid (mg/l)					0%
Free	0.011 [0.006-0.017]	0.010 [0.005-0.016]	0.011 [0.006-0.017]	0.11	
Total	2.9 [1.4-5.5]	2.6 [1.2-5.2]	3.0 [1.6-5.7]	0.06	
Phenylacetylglutamine (mg/l)	2.55 [1.31-4.25]	3.21 [1.87-5.44]	2.22 [1.17-3.74]	<0.001	0%
Trimethylamine N-oxide (mg/l)	1.48 [0.87-2.56]	1.49 [0.86-2.54]	1.48 [0.87-2.56]	0.9	0%
Urea (mmol/l)	12.6 [9.5-17.5]	12.8 [9.8-17.3]	12.4 [9.5-17.5]	0.57	6.1%

^a Median [interquartile range]. ^b Wilcoxon rank sum test. Statistically significant P-values are given in bold type. LOD : limit of detection (0.01 mg/L). NA : not applicable.

144
145

146

147
148

2.3. Adjusted analyses: associations between uremic toxins and proton-pump inhibitors

The multiple linear regression analysis (showed in Table 4) confirmed the association between PPIs and elevated serum concentrations of free and total IS, free and total PCG,

149
150
151
152
153
and PAG, even after adjustment for age, sex, the total number of co-prescribed medications, a history of AKI, serum CRP and albumin levels, diabetes, BMI, smoking status, urine albumin-to-creatinine ratio or protein-to-creatinine ratio (ACR), and eGFR.

154
155
However, after adjustment for the same confounding factors, free kynureneine, free and total PCS, and free HA were no longer significantly associated with PPI use (Table 4).

Table 4. Crude and adjusted coefficients of log uremic toxin concentrations associated with proton-pump inhibitors.

Log uremic toxin	Crude analysis		Adjusted analysis	
	Beta [95% CI]	P-value	Beta [95% CI]	P-value ^a
Free indoxyl sulfate	0.40 [0.24, 0.57]	< 0.001	0.19 [0.02, 0.35]	0.02
Total indoxyl sulfate	0.37 [0.22, 0.51]	< 0.001	0.24 [0.1, 0.3]	0.001
Free kynureneine	0.10 [0.02, 0.18]	0.02	0.01 [-0.1, 0.07]	0.7
Free p-cresyl sulfate	0.38 [0.19, 0.58]	< 0.001	0.05 [-0.1, 0.2]	0.6
Total p-cresyl sulfate	0.23 [0.06, 0.39]	0.003	0.002 [-0.17, 0.17]	0.9
Free p-cresyl glucuronide	0.51 [0.33, 0.70]	< 0.001	0.24 [0.05, 0.4]	0.01
Total p-cresyl glucuronide	0.52 [0.33, 0.72]	< 0.001	0.23 [0.02, 0.4]	0.02
Free hippuric acid	0.20 [0.03, 0.37]	0.02	0.13 [-0.04, 0.3]	0.1
Phenylacetylglutamine	0.36 [0.22, 0.50]	< 0.001	0.14 [0.09, 0.2]	0.03

156
157
158
^a Each model was adjusted for: age, sex, total number of co-prescribed medications, history of AKI, serum CRP, serum albumin, diabetes, BMI, smoking status, ACR categories, and eGFR (in mL/min per 1.73 m²). Statistically significant P-values are given in bold type.

159 3. Discussion

160
161
162
163
164
165
166
167
In this cross-sectional study, we sought to evaluate the association between PPI use (well-known OAT1/OAT3 inhibitors) and baseline concentrations of serum UTs in a random selected subgroup of the nationwide CKD-REIN cohort of patients with moderate-to-advanced CKD under nephrology care. Our study is the first to show that (i) serum levels of PAG, free and total IS, and free and total PCG are significantly higher in patients taking PPI than in those who do not, and (ii) this association remains statistically significant after adjustment for eGFR, age, sex, history of AKI, serum CRP and albumin levels, diabetes, BMI, smoking status, ACR and the total number of co-prescribed medications.

168
169
170
171
172
It is well known that UTs are associated with CKD progression and several CKD-related complications (e.g. neurological complications and bone diseases) and a rise in mortality rates. Furthermore, a growing body of evidence shows that UTs (mainly IS) have a major role in the development of atheromatous and/or non-atheromatous CV diseases – the leading cause of death in patients with CKD [2].

173
174
175
176
A better understanding of the factors responsible for modulating serum UT concentrations (independently of the effect of renal dysfunction) is essential for limiting the harmful effects of UTs, improving life expectancy among patients with CKD, and facilitating the development of novel therapeutic strategies.

177
178
179
180
181
182
183
184
PPIs are among the world's most frequently prescribed drugs – especially in patients with CKD, where the prevalence varies from 30% to 45% [14, 15]. The use of PPIs by patients with CKD is commonly associated with polypharmacy and/or with concomitant antithrombotic drugs [14]. However, PPIs may be overprescribed and are often inappropriately used [16]. Although PPIs are considered to be effective and medically important for many patients, long-term prescription of these drugs needs to be re-evaluated with a view to avoiding both non-serious and serious long-term adverse drug reactions [17]. Several studies have described the direct toxicity of PPIs. Long-term PPI intake is associated

185 with osteoporosis, hypomagnesemia, AKI, CKD progression, drug interactions, and mor-
186 tality [18,19]. Our group has recently found that new PPI intake was associated with an
187 increased risk of AKI and progression to kidney failure [14]. Xie et al. also showed that
188 PPI intake is significantly associated with elevated mortality [20].

189 Notably, affinity to OAT varies between UTs [10] and according to the type and/or
190 dose of PPI [21–26] (Supplementary Tables S2 and S3). The most three prescribed PPIs in
191 our study seem to have high affinity for OAT3 and two of them strongly high affinity for
192 OAT1, concluding for their high potential effect in modulating serum concentrations of
193 UTs that are also eliminated by the transport system OAT1/3. In the present analysis, we
194 reported that PPIs are associated with serum UT concentrations, the potential interaction
195 between PPIs and UTs had been poorly investigated in the literature. A recent study of
196 kidney transplant recipients showed that the use of at least one OAT1/OAT3 inhibitor
197 (such as a PPI) was associated with the accumulation of certain UTs that are substrates for
198 these transporters [12]. Likewise, the results of a few animal studies show that some
199 OAT1/OAT3-inhibiting drugs decrease the excretion of UTs (notably IS) [13, 27].

200 Among the UTs known to be transported by OAT1/OAT3 and assessed in our
201 study, only serum levels of IS were significantly elevated in patients using PPIs – even
202 after considering confounding factors such as the eGFR. No previous preclinical or clinical
203 studies have shown this specific association. However, the few *in vivo* studies to have
204 evaluated drug-UT interactions for OATs concluded that IS clearance is decreased by the
205 administration of certain drugs transported by OAT1 or OAT3. The drugs that interact
206 with OAT1 and OAT3 include β -lactam antibiotics, diuretics, uricosuric agents, and non-
207 steroidal anti-inflammatory drugs [28]. A recent study of rats by Luo et al. demonstrated
208 that the administration of ciprofloxacin was associated with less renal IS excretion [13]. In
209 Granados et al.'s study of a cohort of probenecid-treated 20 subjects, high levels of trypt-
210 tophean-derived metabolites (including IS, IAA and kynurenine) were observed [29]. Pro-
211 benecid is an uricosuric drug used in the treatment of gout and also used in preclinical
212 trials as a positive control for OAT1/OAT3 inhibition [28]. Another animal study by Yu et
213 al. concluded that the nonsteroidal anti-inflammatory drugs diclofenac and ketoprofen
214 inhibited the clearance of IS by inhibiting OAT1/OAT3-mediated uptake of IS [27]. How-
215 ever, in contrast to PPIs, the latter drugs are rarely prescribed to patients with CKD [30].
216 As above mentioned, PPIs are also considered to be OAT inhibitors; hence, in mechanistic
217 terms, one can reasonably hypothesize that PPIs and IS interact through OAT and thus
218 that PPI use increases serum IS levels.

219 However, we found no significant association between other UTs transported by
220 OAT1/OAT3 included in our study (IAA, kynurenine, KA, PCS, HA, and CMPPF) and PPI
221 prescription. These results might be influenced by the dose of each PPI, a factor that was
222 not included in our analysis, that could interact differently with each UT serum concen-
223 tration. PPIs have a dose dependent effect and a concentration dependent manner to block
224 OATs [21]. Independently, each PPI and UT has different affinity to OATs and different
225 binding regions. The specific UT affinity to OAT might be also modulated by other OAT
226 inhibitor drugs, such as diuretics that may have different capacity to interact with OATs
227 [12].

228 A study has shown that probenecid significantly reduces the uptake of PCS by renal
229 cells [31]. PCS accumulation was also confirmed in a recent clinical study by André et al.
230 [12], who concluded that the prescription of at least one OAT1/OAT3 inhibitor was inde-
231 pendently associated with the serum accumulation of PCS after adjusting for eGFR, age,
232 the plasma albumin level, and time since transplantation. Our study revealed a significant
233 crude association between PPI prescription and elevated serum free PCS concentrations,
234 but this association was no longer significant after adjustment. PCS retention caused by
235 OAT-excreted medications other than PPIs might explain the disparity between André et
236 al.'s [12] findings and our negative result.

237 Furthermore, we found that PPI prescription was significantly associated with ele-
238 vated serum concentrations of PAG, and both free and total PCG, after adjustment for

239 confounding factors. For instance, it has not been shown that PCG and PAG are trans-
240 ported by OAT. Nevertheless, several studies have demonstrated that PPIs can modulate
241 the composition and metabolism of the gut microbiota [32]. These changes might modu-
242 late concentrations of UTs formed in the digestive tract, such as PCG, PAG, and IS [2, 33].
243 However, the enzymes involved in the gut microbiota metabolism have not yet been in-
244 vestigated, and preclinical studies are warranted to explain and validate this possible
245 mechanism. Regarding other gut-derived UTs that are not OAT substrates, no association
246 was found with PPI, assuming that other confounding factors could influence serum UT
247 levels such as the dietary index. Plasma levels of dietary and gut-derived UTs might have
248 been modulated by the content of dietary intake (protein and fiber) [34].

249 The present study had some strengths. Although we did not assess all the partici-
250 pants in the CKD-REIN cohort (given the cost and time-consuming nature of the UT as-
251 says), this representative number was still large enough to enable the inclusion of a suffi-
252 cient number of confounders in the multiple analysis and to have enough statistical
253 power. More importantly, all UTs were quantified in the same laboratory, resulting in
254 centralized UT assays that were measured using the validated robust ultra-high-perfor-
255 mance liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) technique.

256 While analyzing our data, it is important to keep in mind a few limitations. Firstly,
257 our cross-sectional design had some drawbacks. Given the observational type of our
258 study, we cannot conclude for any causal relationship between the observed associations.
259 Consequently, longitudinal studies are needed to confirm our results, and preclinical
260 studies must be conducted to explain the pathogenic mechanisms. Secondly, our results
261 might have been influenced by residual confounding, given that unknown risk factors
262 might not have been included in our analyses. Nevertheless, when evaluating the inde-
263 pendent association of PPI with serum UT levels, we adjusted for many major parameters
264 known to influence UTs, PPIs, and gut microbiota including renal function. Lastly, our
265 definition of PPI exposure was based on prescriptions, without considering the effects of
266 PPI dose [21] or duration of therapy prior to the baseline interview.

267 In conclusion, this study is the first to indicate that the PPIs commonly prescribed to
268 CKD patients are linked to elevated serum UT concentrations (namely IS, PCG, and PAG,
269 in the present work). And given the association between UTs and CKD-related morbidity
270 and mortality, our findings are interesting to better understand the potential factors that
271 may modulate serum UT concentration in CKD patients, however, they will need to be
272 confirmed by longitudinal studies.

273 4. Materials and Methods

274 4.1. Study design and participants

275 The Chronic Kidney Disease-Renal Epidemiology and Information Network (CKD-
276 REIN) is a large prospective cohort in 40 representative nephrology outpatient clinics in
277 France. In brief, the eligibility criteria were age 18 or over, a confirmed diagnosis of mod-
278 erate or advanced CKD (eGFR <60 ml/min/1.73 m²), and no prior maintenance dialysis or
279 kidney transplantation. Between July 2013 and April 2016, 3033 adult patients gave their
280 informed consent to participate in the cohort and were included for five years of annual
281 follow-up. Details of the study protocol have been published elsewhere [35].

282 The present study is based on a sub-cohort of 30% of the CKD-REIN participants
283 selected at random, giving a total of 680 participants whose characteristics are comparable
284 to those of the overall cohort (except for a slight difference for sex) (Supplementary Table
285 S1).

286 Data were collected by trained clinical research associates from medical records or
287 patient interviews at baseline and then annually.

288 4.2. Medication exposure

Information on medication use (including PPIs) was obtained from drug prescriptions during the baseline interview. The PPIs included omeprazole, esomeprazole, pantoprazole, lansoprazole, and rabeprazole. Dates of PPIs prescription are concomitant with the dates of UTs' serum sampling; all patients considered as PPI users have a PPI prescription at the date of serum sampling.

4.3. Outcome: quantification of UTs

The study primary outcome was the serum levels of UT at baseline. Indeed, upon enrollment of the patients, serum samples were collected, immediately stored at 4°C and aliquoted within 6 hours without additional processing. All CKD-REIN samples were stored frozen (-80°C) at the Biobanque de Picardie (BRIF number: BB-0033-00017) and shipped frozen to Paris for analysis. Both teams were blind for outcome and patients' characteristics. UTs fractions were assayed in serum using a previously validated LC-MS/MS technique, as described previously [36]. In the CKD-REIN cohort, serum levels of the following 10 UTs were assessed: IS, IAA, kynurenine, KA, PCS, PCG, HA, CMPF, TMAO, and PAG. Among these UTs, TMAO and PAG are small, water-soluble molecules, while the others are protein-bound molecules. Therefore, serum concentrations were reported as free and total only for the protein-bound UTs.

To determine total UT (free and protein-bound) concentrations, 50 µL of serum samples were first precipitated with 340 µL of methanol in the presence of 25 µL of isotope-labeled internal standards. After centrifugation for 10 min at 9000 g, the supernatant was evaporated under nitrogen stream and then reconstituted in 80 µL of water.

Free UT concentrations were determined by ultrafiltration; 150 µL of serum were introduced into an ultracentrifugal filter of 30 kDa porosity, and then centrifuged at 13300 g for 20 min. Given that UTs are mainly bound to albumin (65 kDa, which does not pass through the filter), the residual filtrate contained only the free UT fraction. Free KA was below the limit of detection (<0.01 mg/L) in most of the patients and so was not included in our analysis.

4.4. Covariates

We collected the patients' characteristics (age, sex, and smoking status) and detailed medical history, including any history of diabetes, hypertension, dyslipidemia, CV disease, and AKI. Patients were classified with a history of CV disease if they had a history of coronary heart disease, stroke, peripheral vascular disease, heart failure, dysrhythmia, or valvular disease. They were classified as having diabetes if the condition was mentioned in their medical records, if they had an HbA1c level $\geq 7\%$, or if they used glucose-lowering medication. Likewise, patients were classified as having hypertension if this was mentioned in their medical records, if they had a measured systolic blood pressure ≥ 140 mm Hg or a diastolic blood pressure ≥ 90 mm Hg or if they use antihypertensive medication, and if they were classified as having dyslipidemia if it was stated in their medical records or if they used lipid-lowering medication. Nephrologists or outpatient nurses measured the patients' blood pressure, weight, and height and calculated the BMI. All patients were prescribed standard blood and urine tests (as recommended by the French health authorities for routine CKD care), which were performed at their usual laboratory at study entry, or at a centralized laboratory for the measurement of CRP and creatinine. We recorded data on the serum hemoglobin, CRP, urea, creatinine and albumin levels, and the ACR. The eGFR was calculated from serum creatinine using the Chronic Kidney Disease - Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) equation [37], and the ACR was classified according to the Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) guidelines [38].

4.5. Statistical analysis

338 Continuous variables were quoted as the median [IQR] or the mean (standard deviation)
339 as appropriate, and categorical variables are quoted as the percentage. The
340 Wilcoxon rank sum test or Student's t-test was used (as appropriate) to compare continuous
341 variables in two groups, the Chi-squared test was used to compare two categorical
342 variables. Given that the UT concentration values were not normally distributed; they
343 were log-transformed prior to tests that assume a Gaussian distribution. The Kruskal-
344 Wallis test was used to compare the levels of each UT in the various CKD stages, followed
345 by a post-hoc analysis using Dunn's test (supplementary Figure S1).

346 For each studied UT, a linear regression was performed to assess the crude association
347 between PPI prescription and UT levels. Each UT-PPI associations found to be statistically
348 significant in the crude analysis was further assessed in a multiple analysis approach. A multiple linear regression was performed for each UT with the log UT concentration as the dependent variable. Clinically relevant variables preselected following a review of the literature and those with $p < 0.2$ in the univariate analysis were included in the multiple analysis model: age at inclusion, sex, serum CRP level, history of AKI, smoking status, albuminemia, diabetes, BMI, total number of co-prescribed medications, ACR, and eGFR at inclusion. The assumptions required by the linear regression analysis were checked and met in all cases.

356 Patients whose urea concentration values were considered to be outliers (serum urea
357 <2.5 mM or >100 mM) were considered as missing data.

358 Assuming that data were missing at random, we performed multiple imputation
359 with chained equations (MICE) [39], implemented in the MICE package in R software
360 (version 4.1.2, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) [40]. Given the
361 proportion of missing data, 32 complete datasets were imputed. The imputation model
362 included all the variables present in the models (UTs, PPI, and each model's covariates).
363 Linear regression models were generated for each dataset, and pooled regression coefficients
364 were obtained according to Rubin's rules. The threshold for statistical significance
365 was $P < 0.05$. All statistical analyses were performed with R software.

366 **Supplementary Materials:** STROBE statement; Table S1: Characteristics comparison between included and non-included patients in the sub-cohort; Figure S1: Distribution of log normalized uremic toxins according to the stages of chronic kidney disease; Figure S2: Distribution of log normalized uremic toxins according to proton-pump inhibitor use; List of biological resources centers.

370 **Author Contributions:** Conceptualization, Z.A.M. and S.L.; Methodology, C.E.C., I.A.L., N.A.D. P.
371 and J.-C.A.; Software, not applicable; Data curation, C.E.C., and C.L.; Formal analysis, C.E.C.; Funding
372 acquisition, B.S. and Z.A.M.; Investigation, B.S., support of CKD-REIN study group; Project adminis-
373 tration, Z.A.M and S.L.; Resources, C.E.C., I.A.L., J.-C.A., B.S., Z.A.M., and the support of the
374 CKD-REIN study group; Supervision, Z.A.M and S.L.; Validation, Z.A.M and S.L.; Visualization,
375 C.E.C., Ziad A Massy and Sophie Liabeuf; Writing – original draft, Carolla El Chamieh, , Z.A.M.
376 and S.L.; Writing – review & editing, S.M.L., C.J., C.C., D.F., M.L., L.F., R.P.-F., B.S., N.A.D. P., Z.A.M.
377 and S.L. All authors have read and agreed to the submitted version of the manuscript.

378 **Funding:** CKD-REIN is funded by the Agence Nationale de la Recherche through the 2010 «Cohortes-Investissements d'Avenir » program (ANR-IA-COH-2012/3731) and by the 2010 national
379 Programme Hospitalier de Recherche Clinique. CKD-REIN is also supported through a public-private
380 partnership with Fresenius Medical Care and GlaxoSmithKline (GSK) since 2012 and Vifor
381 France since 2018, Sanofi-Genzyme from 2012 to 2015, Baxter and Merck Sharp & Dohme-Chibret
382 (MSD France) from 2012 to 2017, Amgen from 2012 to 2020, Lilly France from 2013 to 2018, Otsuka
383 Pharmaceutical from 2015 to 2020, and AstraZeneca from 2018 to 2021. Inserm Transfert set up and
384 has managed this partnership since 2011.

386 **Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the
387 Declaration of Helsinki, and approved by the institutional review board at the French National Institute
388 of Health and Medical Research (INSERM; reference: IRB00003888), and the study was registered at ClinicalTrials.gov (NCT03381950).

390 **Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the
391 study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to confidential reasons of the national CKD-REIN study.

Acknowledgments: We acknowledge the CKD-REIN study coordination staff for their efforts in setting up the CKD-REIN cohort (M. Metzger, E. Speyer, C. Lange and all the clinical research associates) as well as the CKD-REIN clinical sites and investigators: Alsace : Prs T. Hannedouche et B. Moulin (CHU, Strasbourg), Dr A. Klein (CH Colmar) Aquitaine : Pr C. Combe (CHU, Bordeaux), Dr J.P. Bourdenx (Clinique St Augustin, Bordeaux), Dr A. Keller, Dr C. Delclaux (CH, Libourne), Dr B. Vendrely (Clinique St Martin, Pessac), Dr B. Derouze (Clinique Delay, Bayonne), Dr A. Lacraz (CH, Bayonne) Basse Normandie : Dr T. Lobbedez (CHU, Caen), Dr I. Landru (CH, Lisieux) Ile de France : Pr Z. Massy (CHU, Boulogne – Billancourt), Pr P. Lang (CHU, Créteil), Dr X. Belenfant (CH, Montreuil), Pr E. Thervet (CHU, Paris), Dr P. Urena (Clinique du Landy, St Ouen), Dr M. Delahousse (Hôpital Foch, Suresnes) Languedoc – Roussillon : Dr C. Vela (CH, Perpignan) Limousin : Pr M. Essig, Dr D. Clément (CHU, Limoges) Lorraine : Dr H. Sekhri, Dr M. Smati (CH, Epinal) Dr M. Jamali, Dr B. Hacq (Clinique Louis Pasteur, Essey-les-Nancy), Dr V. Panescu, Dr M. Bellou (Polyclinique de Gentilly, Nancy), Pr Luc Frimat (CHU, Vandœuvre-les-Nancy) Midi-Pyrénées : Pr N Kamar (CHU, Toulouse) Nord-Pas-de-Calais : Prs C. Noël et F. Glowacki (CHU, Lille), Dr N. Maisonneuve (CH, Valenciennes), Dr R. Azar (CH, Dunkerque), Dr M. Hoffmann (Hôpital privé La Louvière, Lille) Pays-de-la Loire : Pr M. Hourmant (CHU, Nantes), Dr A. Testa (Centre de dialyse, Rezé), Dr D. Besnier (CH, St Nazaire) Picardie : Pr G. Choukroun (CHU, Amiens), Dr G. Lambrey (CH, Beauvais) Provence-Alpes - Côte d'Azur : Pr S. Burtey (CHU, Marseille), Dr G. Lebrun (CH, Aix-en-Provence), Dr E. Magnant (Polyclinique du Parc Rambot, Aix-en-Provence) Rhône-Alpes : Pr M. Laville, Pr D. Fouque (CHU, Lyon-Sud) et L. Juillard (CHU Edouard Herriot, Lyon), Dr C. Chazot (Centre de rein artificiel Tassin Charcot, Ste Foy-les-Lyon), Pr P. Zaoui (CHU, Grenoble), Dr F. Kuentz (Centre de santé rénale, Grenoble).

The authors are grateful to all biological resources centers for their participation in the project: the Biobanque de Picardie (BB-0033-00017), NeuroBioTec (BB-0033-00046), Centre de ressources biologiques (CRB)-Centre Hospitalier Universitaire de Nantes Hôtel Dieu (BB-0033-00040), CRB-Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes (BB-0033-00069), CRB-Centre Hospitalier Régional Universitaire de Nancy (BB-0033-00035), Service de Néphrologie, Centre Hospitalier de Perpignan, the Plateforme de Ressources Biologiques-Hôpital Henri Mondor (BB-0033-00021), the Centre d'Investigation Clinique Plurithématique CIC-1435, Plateforme de Ressources Biologiques-Hôpital européen Georges-Pompidou (BB-0033-00063), L'Etablissement Français du sang (EFS) Hauts de France – Normandie (Site de Bois-Guillaume, Site de Loos-Eurasanté), EFS Nouvelle Aquitaine (site Pellegrin), EFS Ile de France (Site Avicenne), EFS Occitanie (Site de Toulouse), EFS Grand-Est (Site de Colmar, Site de Metz), EFS PACA-Corse (Site de Marseille) (supplementary material).

We thank M.David Fraser for editing the English version.

Conflicts of Interest: C.E.C., I.A.L., S.M.L., C.J., C.C., D.F., M.L., L.F., R.P-F, C.L., N.A.D.P., J-C.A., and S.L., declare no conflict of interest. B.S. coordinates the CKD-REIN cohort study, funded by the Agence Nationale de la Recherche through the 2010 “Cohortes-Investissements d’Avenir” program and by the 2010 national Programme Hospitalier de Recherche Clinique. CKD-REIN is also supported through a public-private partnership with Amgen, Fresenius Medical Care, and GlaxoSmithKline (GSK), since 2012, Lilly France since 2013, and Otsuka Pharmaceutical since 2015, Baxter and Merck Sharp & Dohme-Chibret (MSD France) from 2012 to 2017, Sanofi-Genzyme from 2012 to 2015, Vifor Fresenius, and AstraZeneca, since 2018. Inserm Transfert set up and has managed this partnership since 2011. Z.A.M. reports having received grants for CKD-REIN and other research projects from Amgen, Baxter, Fresenius Medical Care, GlaxoSmithKline, Merck Sharp and Dohme-Chibret, Sanofi-Genzyme, Lilly, Otsuka, Astra Zeneca, Vifor and the French government, as well as fees and grants to charities from Astra Zeneca, Boehringer Ingelheim, and GlaxoSmithKline.

The sponsors had no role in the design, execution, interpretation, or writing of the study.

References

1. Charles C, Ferris AH. Chronic kidney disease. Primary Care: Clinics in Office Practice. 2020;47(4):585-95.
 2. El Chamieh C, Liabeuf S, Massy Z. Uremic Toxins and Cardiovascular Risk in Chronic Kidney Disease: What Have We Learned Recently beyond the Past Findings? Toxins. 2022;14(4):280.
 3. Bikbov B, Purcell CA, Levey AS, Smith M, Abdoli A, Abebe M, et al. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. The lancet. 2020;395(10225):709-33.

- 448 4. Mills KT, Xu Y, Zhang W, Bundy JD, Chen C-S, Kelly TN, et al. A systematic analysis of worldwide population-based data on
449 the global burden of chronic kidney disease in 2010. *Kidney international*. 2015;88(5):950-7.
- 450 5. Liabeuf S, Drüeke TB, Massy ZA. Protein-bound uremic toxins: new insight from clinical studies. *Toxins*. 2011;3(7):911-9.
- 451 6. Bush KT, Singh P, Nigam SK. Gut-derived uremic toxin handling in vivo requires OAT-mediated tubular secretion in chronic
452 kidney disease. *JCI insight*. 2020;5(7).
- 453 7. Mihaila SM, Faria J, Stefens MF, Stamatialis D, Verhaar MC, Gerritsen KG, et al. Drugs commonly applied to kidney patients
454 may compromise renal tubular uremic toxins excretion. *Toxins*. 2020;12(6):391.
- 455 8. Nigam SK, Bush KT, Martovetsky G, Ahn S-Y, Liu HC, Richard E, et al. The organic anion transporter (OAT) family: a systems
456 biology perspective. *Physiological reviews*. 2015;95(1):83-123.
- 457 9. Huo X, Liu K. Renal organic anion transporters in drug–drug interactions and diseases. *European Journal of Pharmaceutical
458 Sciences*. 2018;112:8-19.
- 459 10. Wu W, Bush KT, Nigam SK. Key role for the organic anion transporters, OAT1 and OAT3, in the in vivo handling of uremic
460 toxins and solutes. *Scientific reports*. 2017;7(1):1-9.
- 461 11. Nigam SK, Wu W, Bush KT, Hoenig MP, Blantz RC, Bhatnagar V. Handling of drugs, metabolites, and uremic toxins by kidney
462 proximal tubule drug transporters. *Clinical journal of the American Society of Nephrology*. 2015;10(11):2039-49.
- 463 12. André C, Mernissi T, Choukroun G, Bennis Y, Kamel S, Liabeuf S, et al. The Prescription of Drugs That Inhibit Organic Anion
464 Transporters 1 or 3 Is Associated with the Plasma Accumulation of Uremic Toxins in Kidney Transplant Recipients. *Toxins*.
465 2021;14(1):15.
- 466 13. Luo S-S, Yu C-P, Hsieh Y-W, Chao P-DL, Sweet DH, Hou Y-C, et al. Effects of antibiotics on the pharmacokinetics of indoxyl
467 sulfate, a nephro-cardiovascular toxin. *Xenobiotica*. 2020;50(5):588-92.
- 468 14. Liabeuf S, Lambert O, Metzger M, Hamroun A, Laville M, Laville SM, et al. Adverse outcomes of proton pump inhibitors in
469 patients with chronic kidney disease: The CKD-REIN cohort study. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2021;87(7):2967-
470 76.
- 471 15. Lee HJ, Lee H, Oh SH, Park J, Park S, Jeon JS, et al. Chronic kidney disease (CKD) patients are exposed to more proton pump
472 inhibitor (PPI) s compared to non-CKD patients. *PLoS One*. 2018;13(9):e0203878.
- 473 16. Forgacs I, Loganayagam A. Overprescribing proton pump inhibitors. British Medical Journal Publishing Group; 2008. p. 2-3.
- 474 17. Dharmarajan TS. The use and misuse of proton pump inhibitors: an opportunity for deprescribing. *Journal of the American
475 Medical Directors Association*. 2021;22(1):15-22.
- 476 18. Haastrup PF, Thompson W, Søndergaard J, Jarbøl DE. Side effects of long-term proton pump inhibitor use: a review. *Basic &
477 clinical pharmacology & toxicology*. 2018;123(2):114-21.
- 478 19. Islam M, Poly TN, Walther BA, Dubey NK, Anggraini Ningrum DN, Shabbir S-A. Adverse outcomes of long-term use of proton
479 pump inhibitors: a systematic review and meta-analysis. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*.
480 2018;30(12):1395-405
- 481 20. Xie Y, Bowe B, Yan Y, Xian H, Li T, Al-Aly Z. Estimates of all cause mortality and cause specific mortality associated with proton
482 pump inhibitors among US veterans: cohort study. *Bmj*. 2019;365.
- 483 21. Chioukh R, Noel-Hudson M-S, Ribes S, Fournier N, Becquemont L, Verstuyft C. Proton pump inhibitors inhibit methotrexate
484 transport by renal basolateral organic anion transporter hOAT3. *Drug Metabolism and Disposition*. 2014;42(12):2041-8.
- 485 22. Wang Y, Ren J, Sun Q, Zhang Z, Lin Y, Deng S, et al. Organic anion transporter 3 (OAT3)-mediated transport of dicaffeoylquinic
486 acids and prediction of potential drug-drug interaction. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019;133:95-103.
- 487 23. Narumi K, Sato Y, Kobayashi M, Furugen A, Kasashi K, Yamada T, et al. Effects of proton pump inhibitors and famotidine on
488 elimination of plasma methotrexate: evaluation of drug–drug interactions mediated by organic anion transporter 3.
489 *Biopharmaceutics & drug disposition*. 2017;38(9):501-8.
- 490 24. Santucci R, Levèque D, Lescoute A, Kemmel V, Herbrecht R. Delayed elimination of methotrexate associated with co-
491 administration of proton pump inhibitors. *Anticancer research*. 2010;30(9):3807-10.
- 492 25. Ikemura K, Hamada Y, Kaya C, Enokiya T, Muraki Y, Nakahara H, et al. Lansoprazole exacerbates pemetrexed-mediated
493 hematologic toxicity by competitive inhibition of renal basolateral human organic anion transporter 3. *Drug Metabolism and
494 Disposition*. 2016;44(10):1543-9.
- 495 26. Hamada Y, Ikemura K, Iwamoto T, Okuda M. Stereoselective inhibition of renal basolateral human organic anion transporter 3
496 by lansoprazole enantiomers. *Pharmacology*. 2018;101(3-4):176-83.
- 497 27. Yu C-P, Sweet DH, Peng Y-H, Hsieh Y-W, Chao P-DL, Hou Y-C, et al. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the
498 renal excretion of indoxyl sulfate, a nephro-cardiovascular toxin, in rats. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*.
499 2017;101:66-70.
- 500 28. Cunha RSd, Azevedo CAB, Falconi CA, Ruiz FF, Liabeuf S, Carneiro-Ramos MS, et al. The Interplay between Uremic Toxins
501 and Albumin, Membrane Transporters and Drug Interaction. *Toxins*. 2022;14(3):177.
- 502 29. Granados JC, Richelle A, Gutierrez JM, Zhang P, Zhang X, Bhatnagar V, et al. Coordinate regulation of systemic and kidney
503 tryptophan metabolism by the drug transporters OAT1 and OAT3. *Journal of Biological Chemistry*. 2021;296.
- 504 30. Laville SM, Metzger M, Stengel B, Jacquelinet C, Combe C, Fouque D, et al. Evaluation of the adequacy of drug prescriptions
505 in patients with chronic kidney disease: results from the CKD-REIN cohort. *British journal of clinical pharmacology*.
506 2018;84(12):2811-23.

- 507 31. Watanabe H, Sakaguchi Y, Sugimoto R, Kaneko K-i, Iwata H, Kotani S, et al. Human organic anion transporters function as a
508 high-capacity transporter for p-cresyl sulfate, a uremic toxin. *Clinical and experimental nephrology*. 2014;18(5):814-20.
- 509 32. Bruno G, Zaccari P, Rocco G, Scalese G, Panetta C, Porowska B, et al. Proton pump inhibitors and dysbiosis: Current knowledge
510 and aspects to be clarified. *World journal of gastroenterology*. 2019;25(22):2706.
- 511 33. Rysz J, Franczyk B, Ławiński J, Olszewski R, Ciałkowska-Rysz A, Gluba-Brzózka A. The impact of CKD on uremic toxins and
512 gut microbiota. *Toxins*. 2021;13(4):252.
- 513 34. Rossi M, Johnson D, Xu H, Carrero J, Pascoe E, French C, et al. Dietary protein-fiber ratio associates with circulating levels of
514 indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate in chronic kidney disease patients. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*.
515 2015;25(9):860-5.
- 516 35. Stengel B, Combe C, Jacquelinet C, Briançon S, Fouque D, Laville M, et al. The French chronic kidney disease-renal epidemiol-
517 ogy and information network (CKD-REIN) cohort study. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2014;29(8):1500-7.
- 518 36. Fabresse N, Uteem I, Lamy E, Massy Z, Larabi IA, Alvarez J-C. Quantification of free and protein bound uremic toxins in human
519 serum by LC-MS/MS: comparison of rapid equilibrium dialysis and ultrafiltration. *Clinica Chimica Acta*. 2020;507:228-35.
- 520 37. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang Y, Castro III AF, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration
521 rate. *Annals of internal medicine*. 2009;150(9):604-12.
- 522 38. Levey AS, Eckardt K-U, Dorman NM, Christiansen SL, Hoorn EJ, Ingelfinger JR, et al. Nomenclature for kidney function and
523 disease: report of a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Consensus Conference. *Kidney international*.
524 2020;97(6):1117-29.
- 525 39. Buuren S, Groothuis-Oudshoorn K, Robitzsch A, Vink G, Doove L, Jolani S. Multivariate imputation by chained equations.
526 Comprehensive R Archive. 2019;587.
- 527 40. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. 2013 [Available from: <http://www.R-project.org/.>]

Table S1. Characteristics comparison between included and non-included patients in the sub-cohort

Characteristics	Overall (N = 3033) ^a	Included in the sub-cohort (n=680) ^a	Not included in the sub-cohort (n=2353) ^a	<i>P</i> -value ^b
Age at baseline (years)	69 [60-76]	68 [61-77]	69 [60-76]	0.77
Men	65.4%	69%	64.3%	0.02
eGFR at baseline (ml/min/1.73 m²)	32 [23-41]	32 [23-41]	32 [23-41]	0.89
Albuminuria categories				0.39
A1 (Normal to mildly increased)	27.8%	30%	27.2%	
A2 (Moderately increased)	31.2%	30%	31.6%	
A3 (Severely increased)	40.9%	40%	41.1%	
NA	275	58	217	
History of acute kidney injury	23.6%	21%	24.4%	0.08
NA	244	51	193	
Smoking status				0.17
Never-smoker	41.3%	38%	42%	
Current smoker	11.9%	13%	12%	
Former smoker	46.8%	49%	46%	
NA	23	5	18	
Hypertension	96.3%	96.6%	96.2%	0.64
NA	7	2	5	
Diabetes	43.2%	40%	44%	0.08
NA	7	2	5	
Dyslipidemia	73.6%	73%	73.9%	0.46
NA	14	3	11	
History of cardiovascular disease	53.3%	52%	53.6%	0.52
NA	42	4	38	
Serum albumin (g/l)	40.3 [38.0-43.0]	40.5 [37.8-43]	40.2 [38.0-43.0]	0.91
NA	489	94	395	
Hemoglobin (g/dl)	13 (1.65)	13.1 (1.64)	12.9 (1.65)	0.07
NA	23	4	19	
High-sensitivity C-reactive protein (mg/l)	2 [1-6]	2 [1-6]	3 (1, 6)	0.92
NA	356	0	356	
Body mass index (kg/m²)	27.8 [24.6-31.8]	28 [25.2-31.4]	27.8 [24.5-31.9]	0.56
NA	65	8	57	
Proton pump inhibitor	32.8%	31%	33.3%	0.25
NA	7	0	7	

Total number of medications	8 [5-10]	8 [5-10]	8 (5, 10)	0.36
NA	9	2	7	

^a Median [interquartile range] or mean (standard deviation); %

^b Wilcoxon rank sum test; Pearson's Chi-squared test

Table S2. Different types of PPI and their affinity to OAT1/3

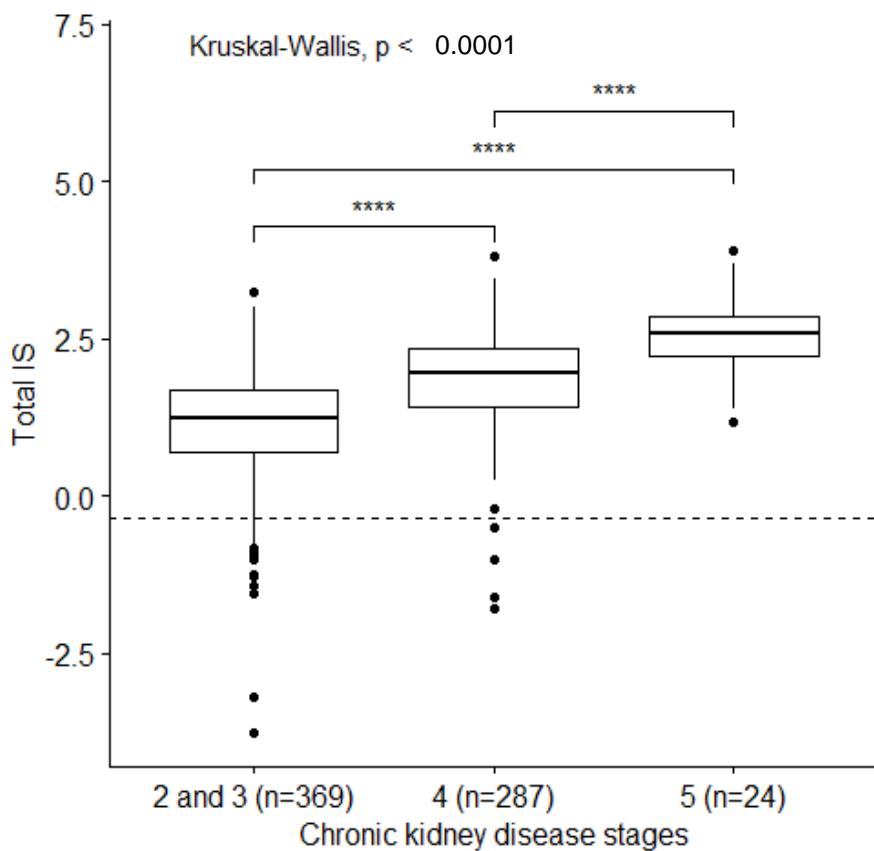
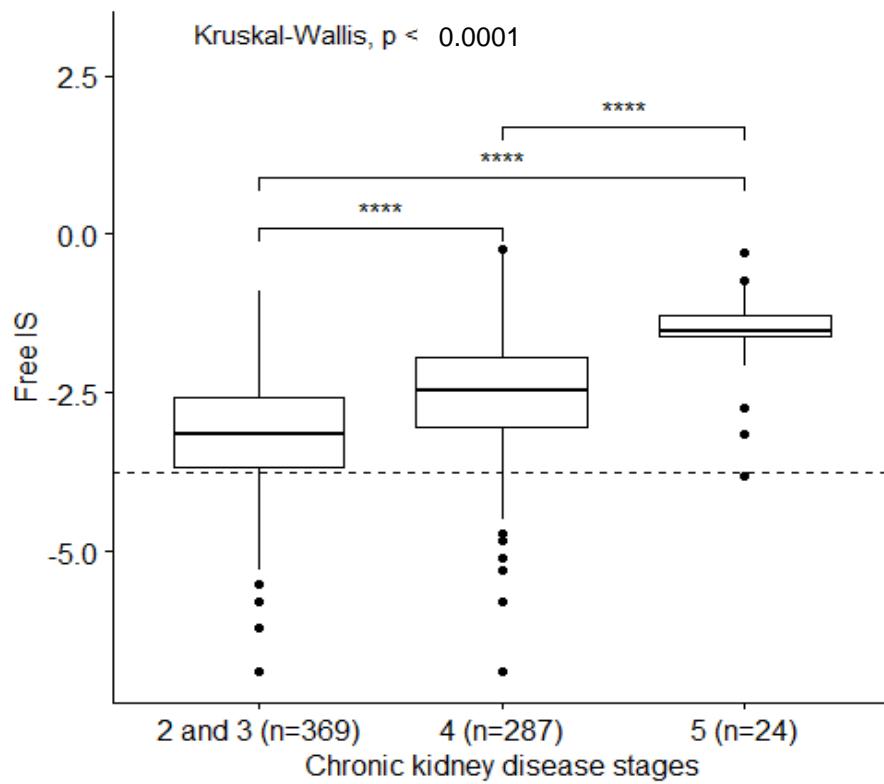
Types of PPI	Plasma Protein Binding [22]	Affinity to OAT1	Affinity to OAT3
Omeprazole	95-96%	Strongly high affinity [21, 23]	High affinity [21-24]
Esomeprazole	97%	Limited data [23]	High affinity [22-24]
Pantoprazole	92%	Moderate affinity [21]	High affinity [21,22,24]
Lansoprazole	97%	Strongly high affinity [21]	High affinity [21-26]
Rabeprazole	97%	Limited data [23]	High affinity [22,23]

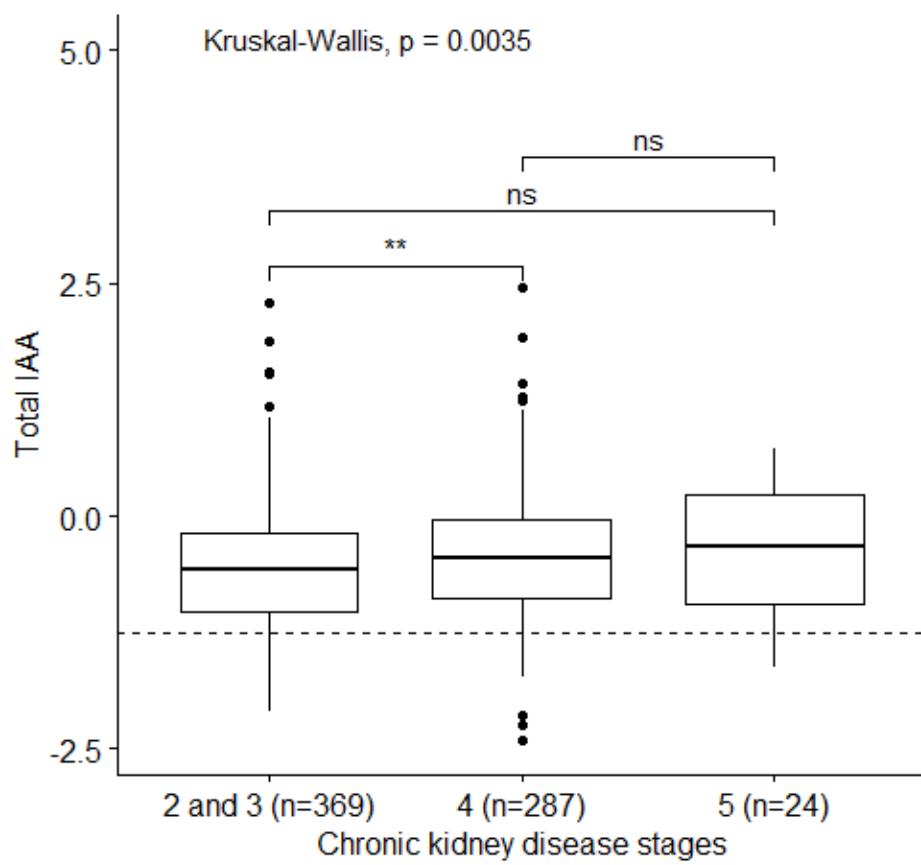
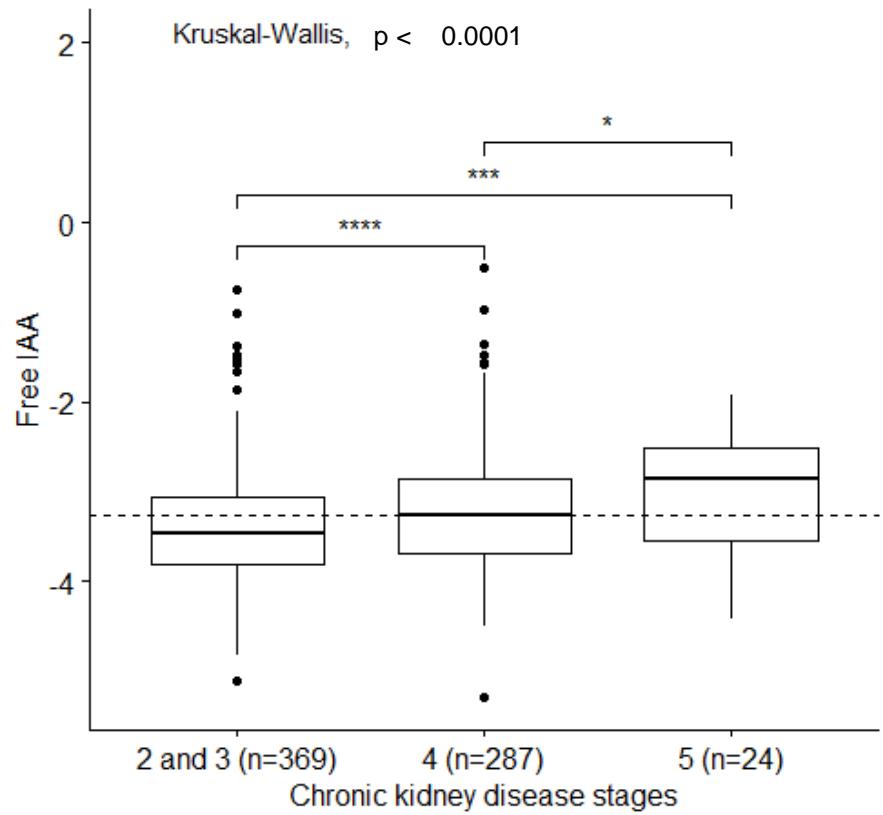
^a n (%)

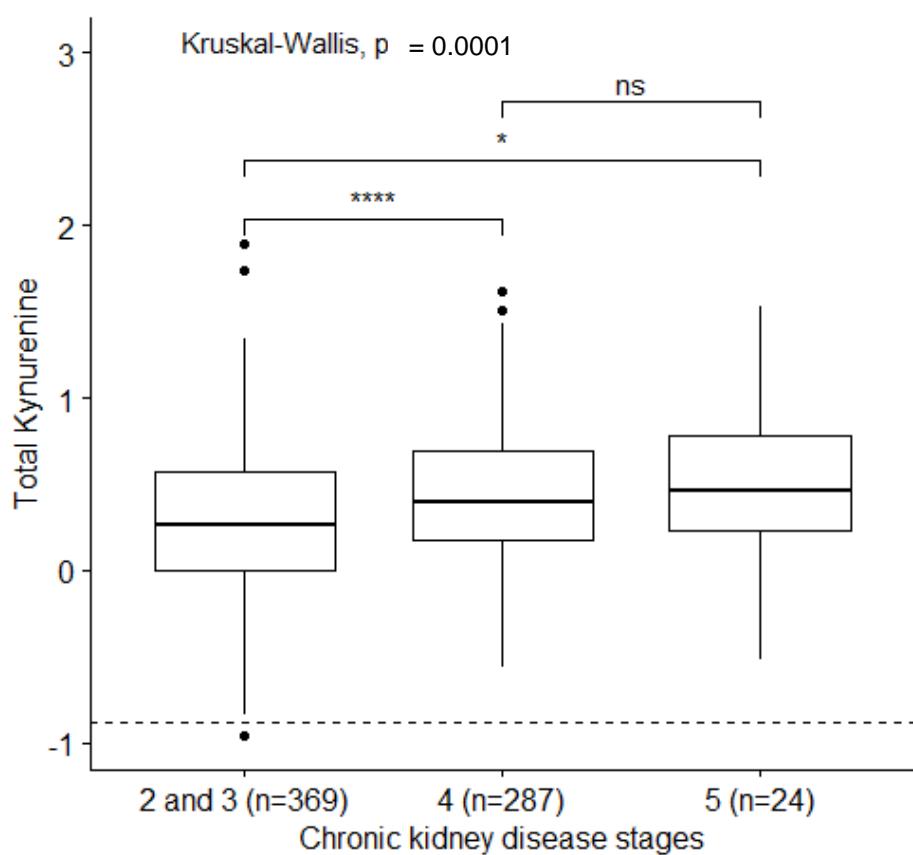
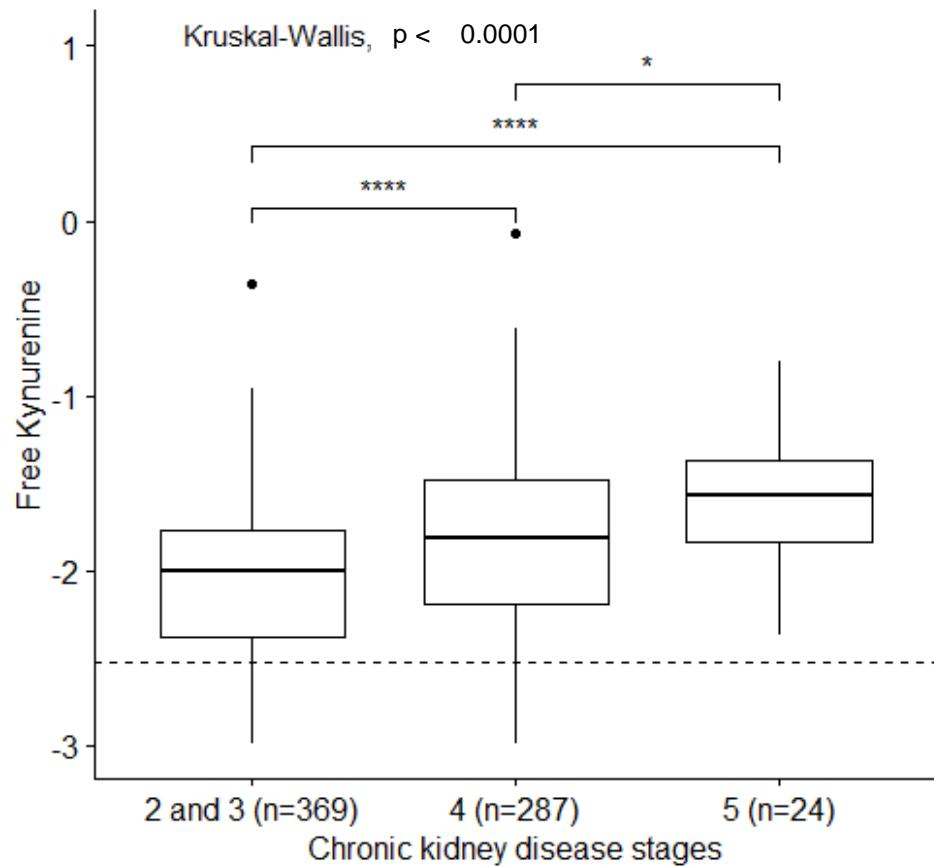
Table S3. Affinity of uremic toxins to OAT1/3

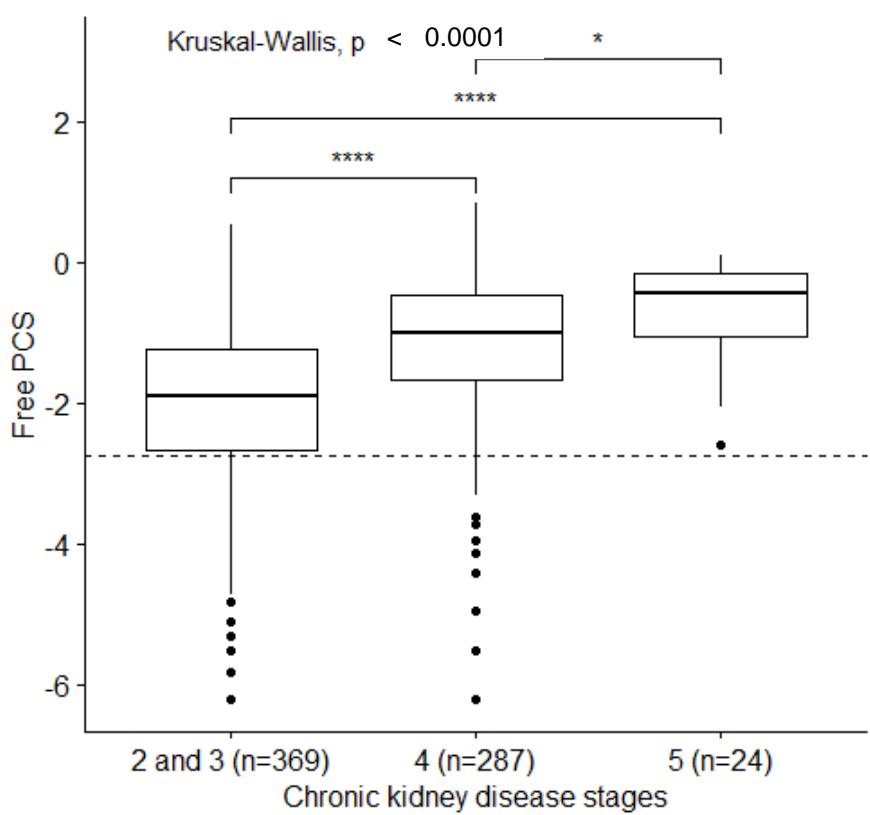
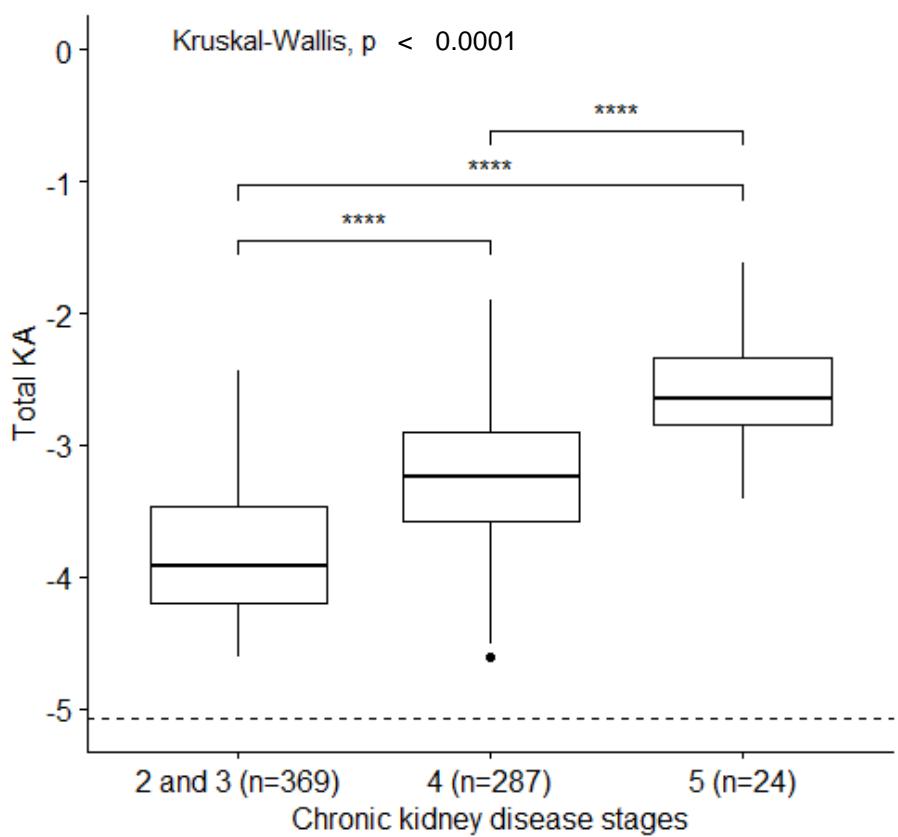
Uremic toxin	Affinity to OAT1/3 [10]	Gut-derived [2]
Indoxyl sulfate	High affinity for both	yes
Indole-3-acetic acid	Moderate affinity for both	yes
Kynurenine	High affinity for both	yes
Kynurenic acid	Moderate affinity for both	yes
p-cresyl sulfate	High affinity for both	yes
p-cresyl glucuronide	No affinity	yes
Hippuric acid	High affinity for both	yes
Phenylacetylglutamine	No affinity	yes
CMPF	More studies are needed to confirm, affinity rather for OAT3)	no
TMAO	Not confirmed yet	yes
Urée	No affinity	no

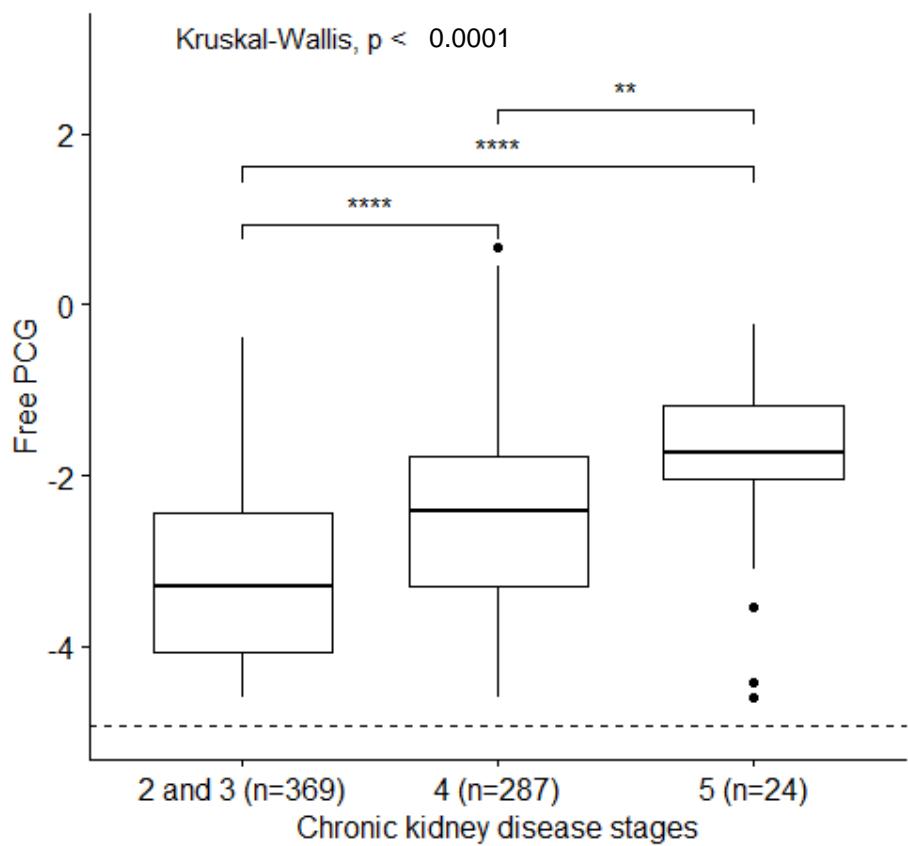
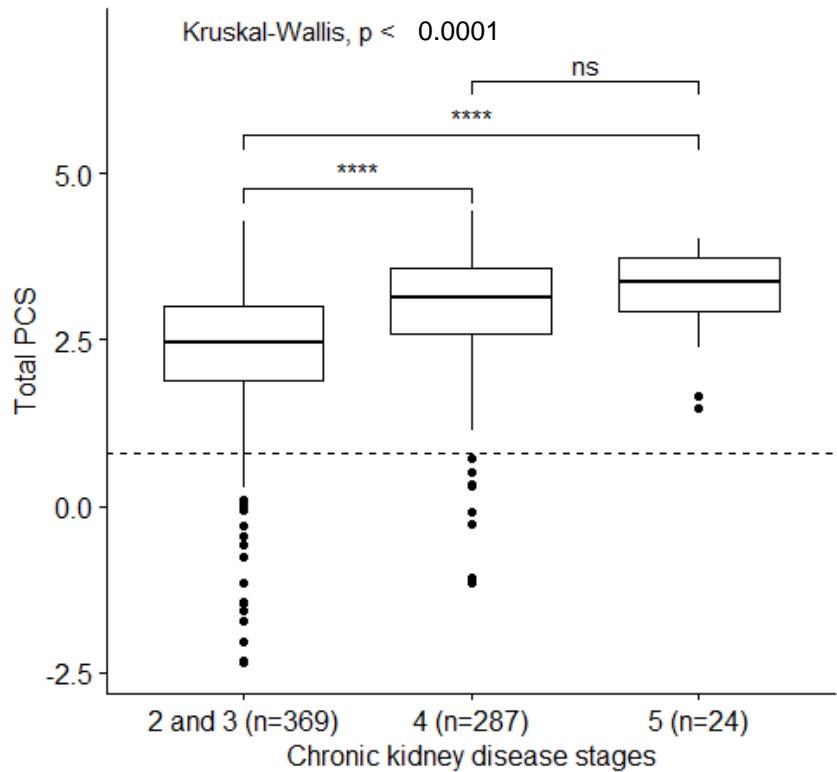
Figure S1. Distribution of log normalized uremic toxins according to the stages of chronic kidney disease.

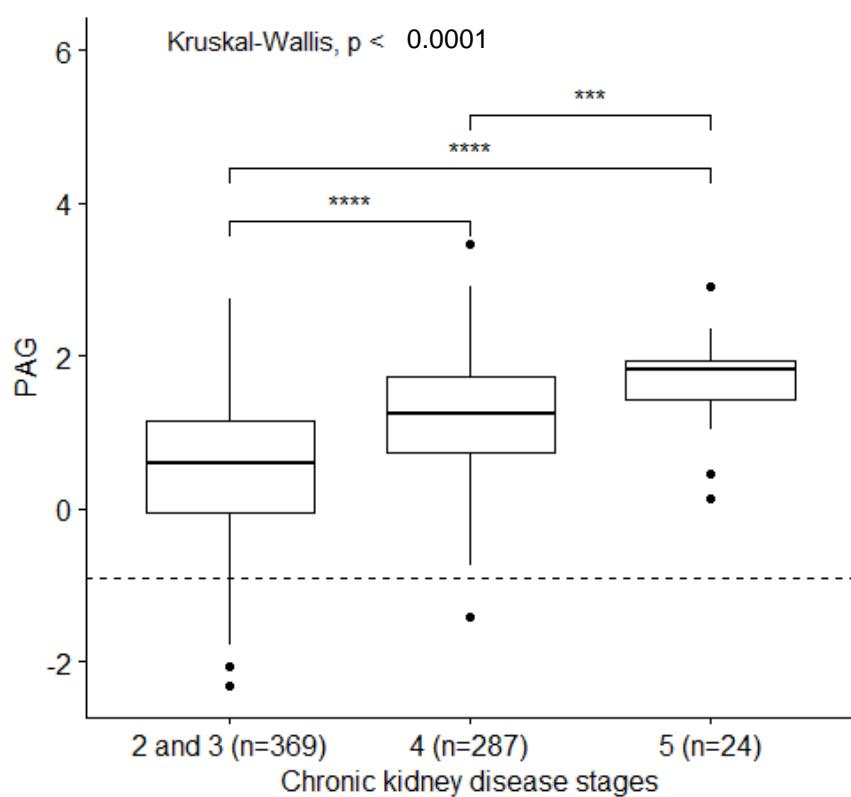
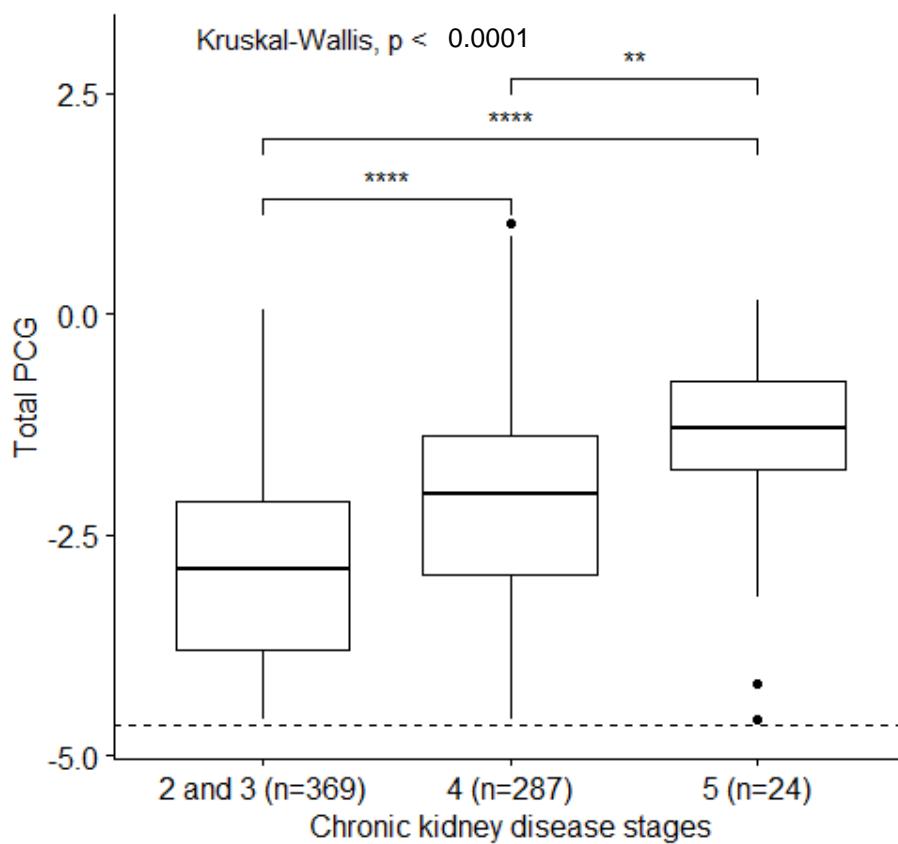


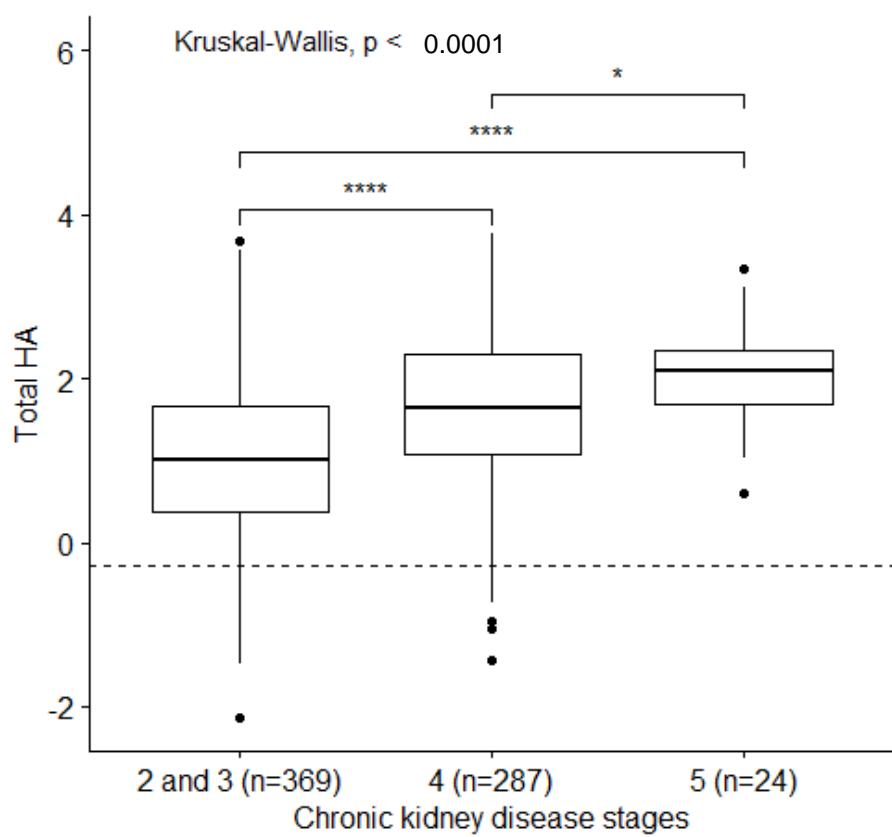
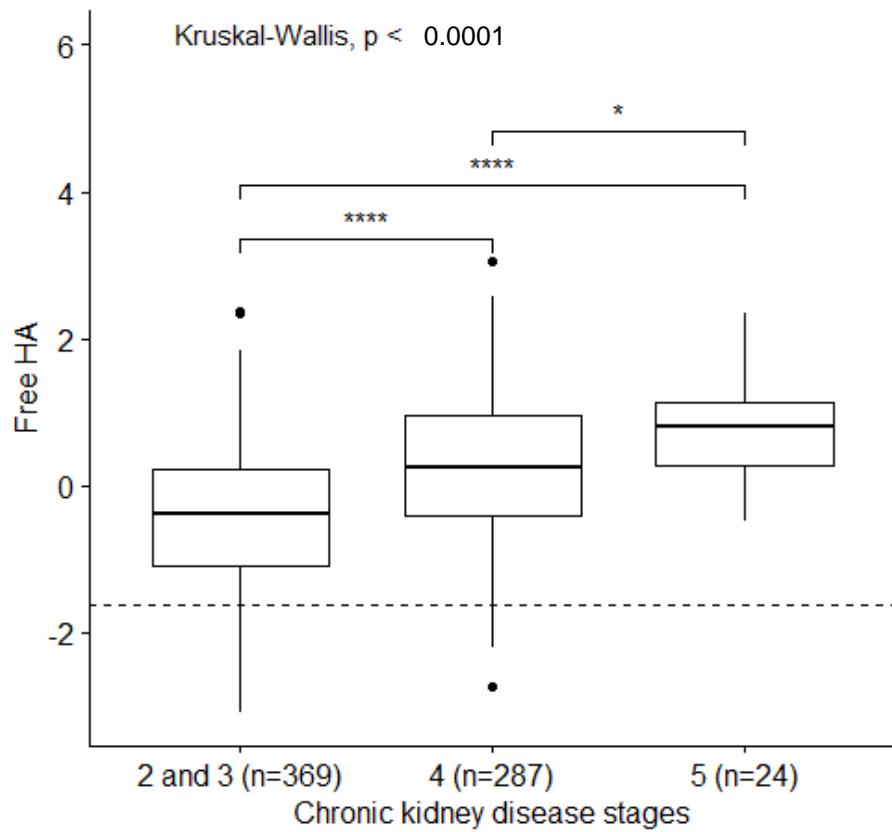


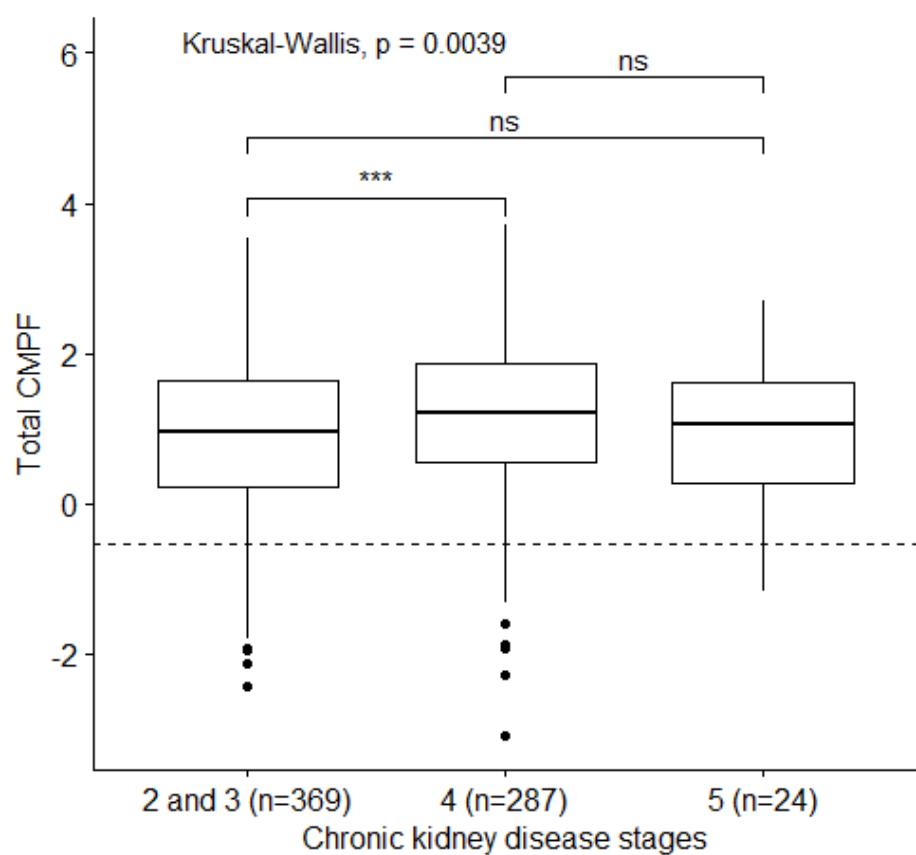
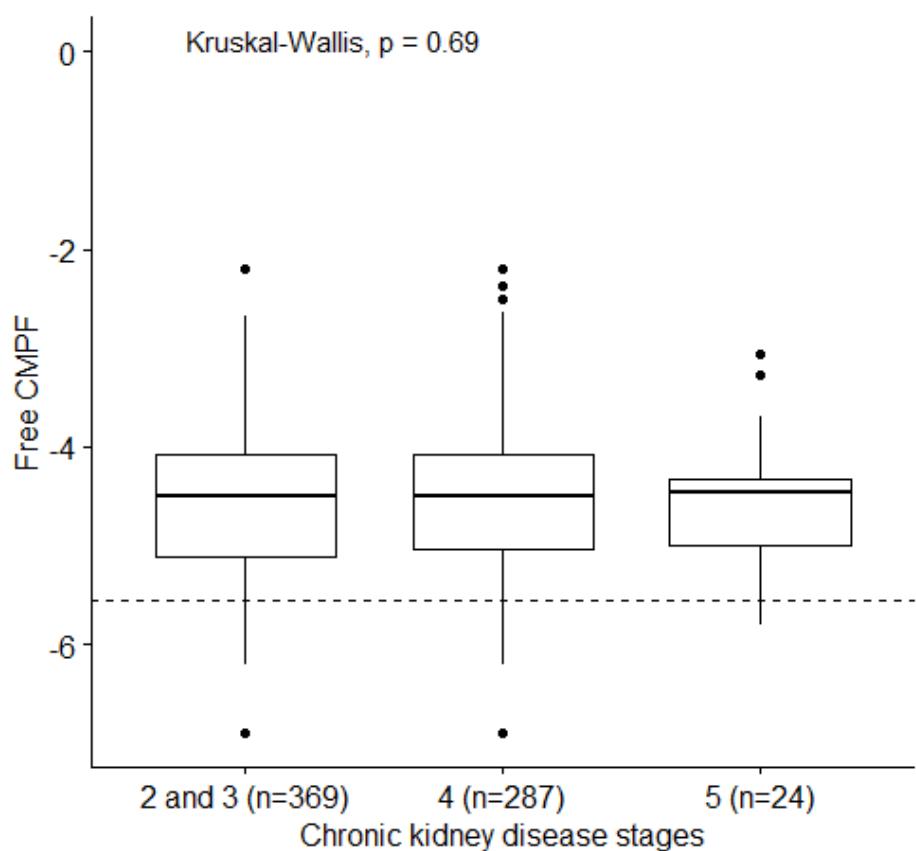


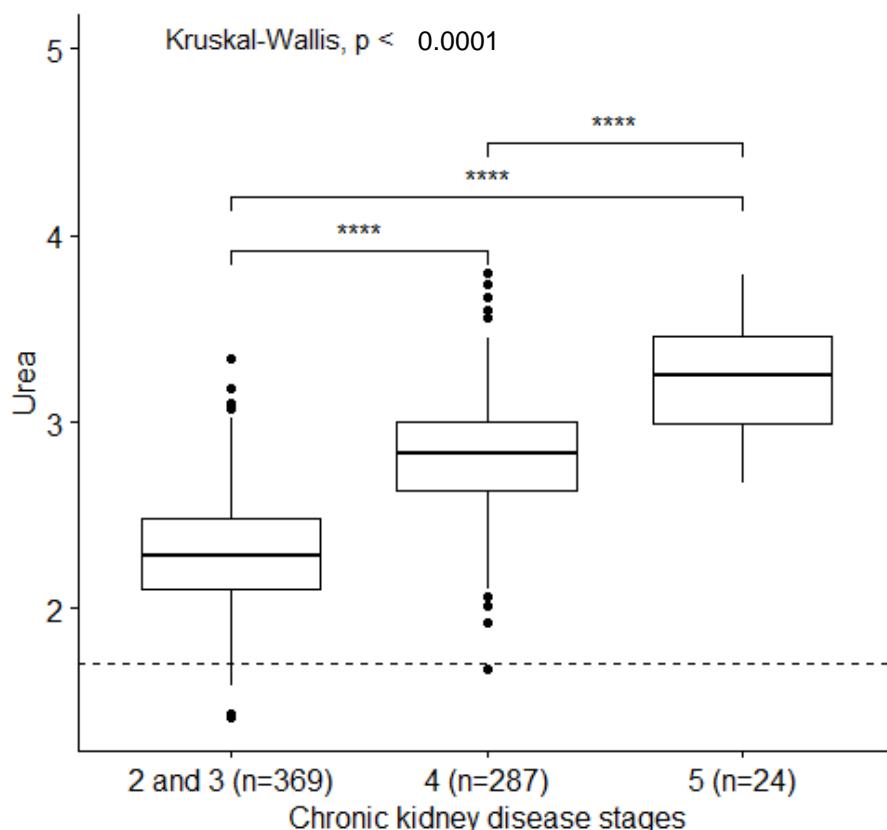
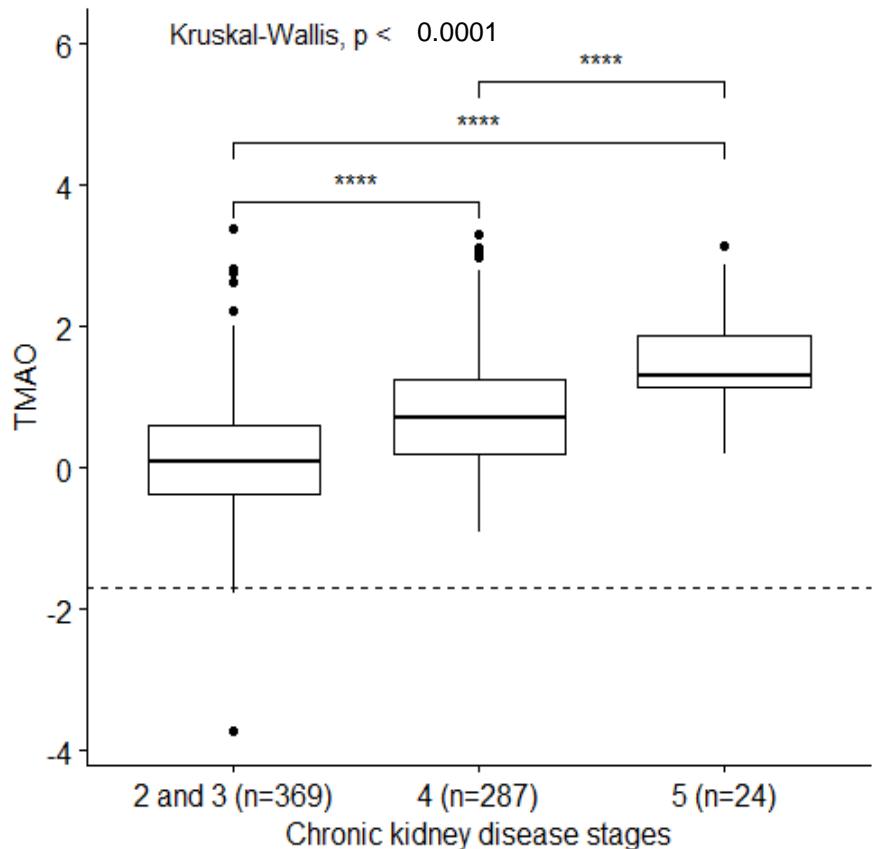










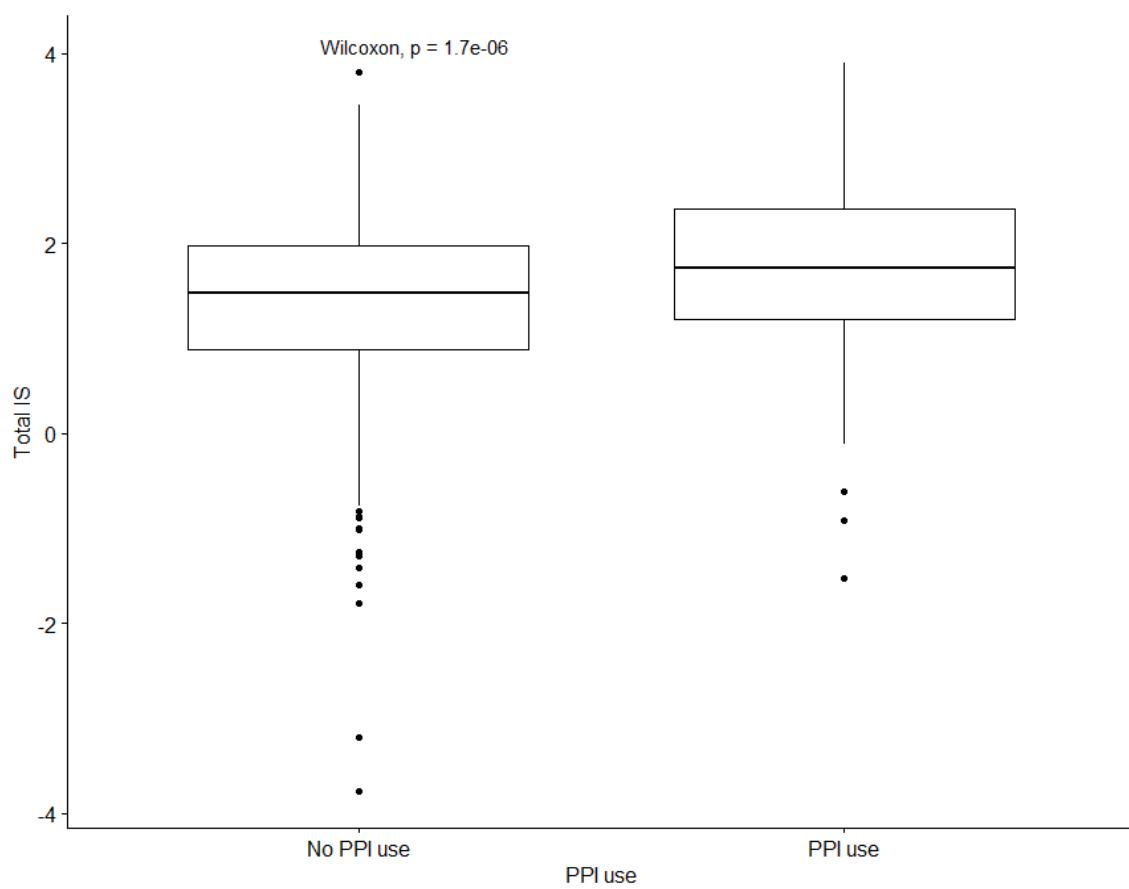
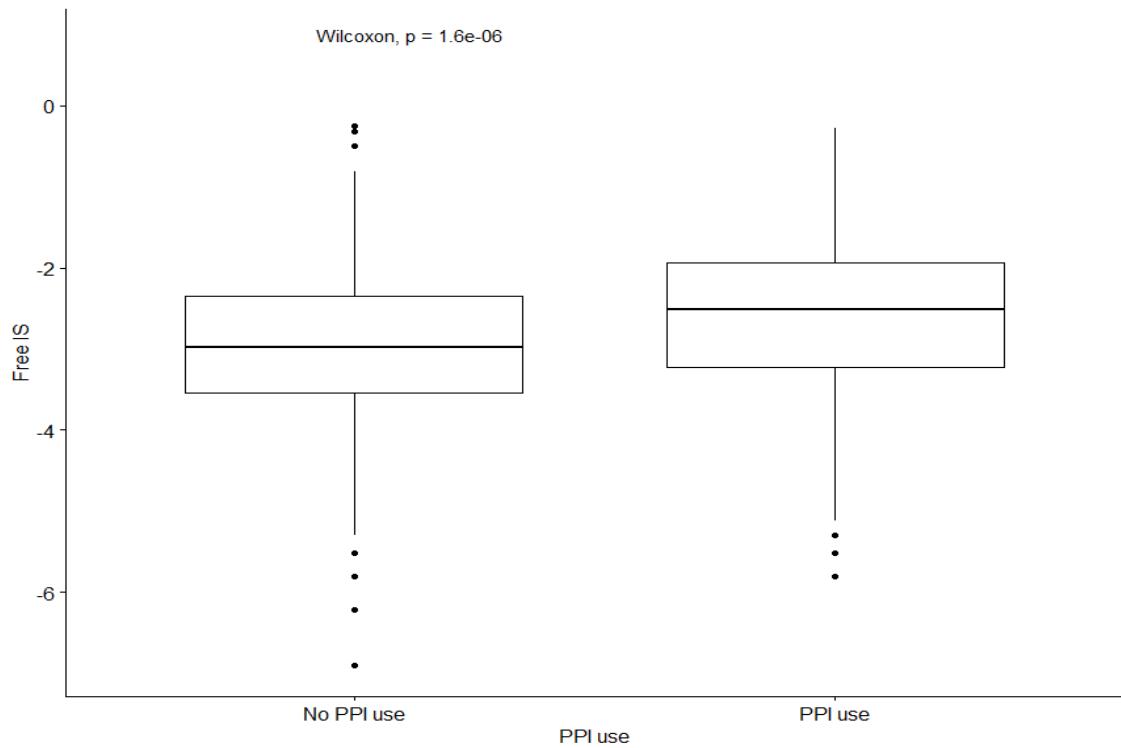


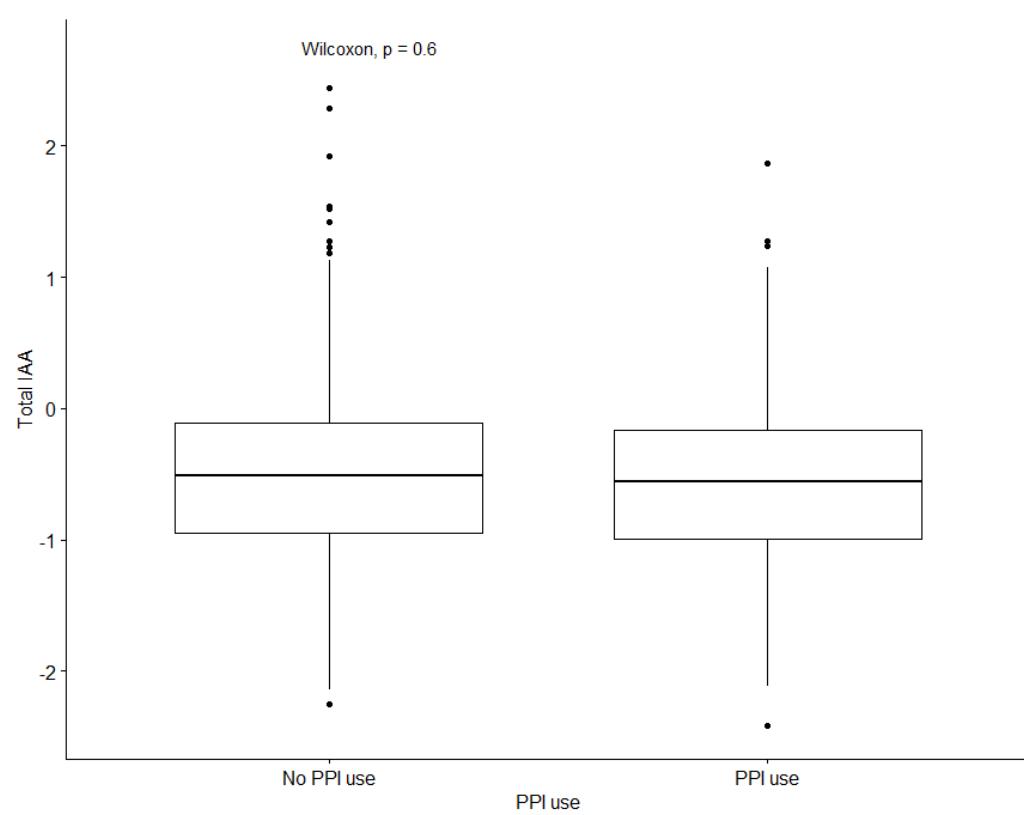
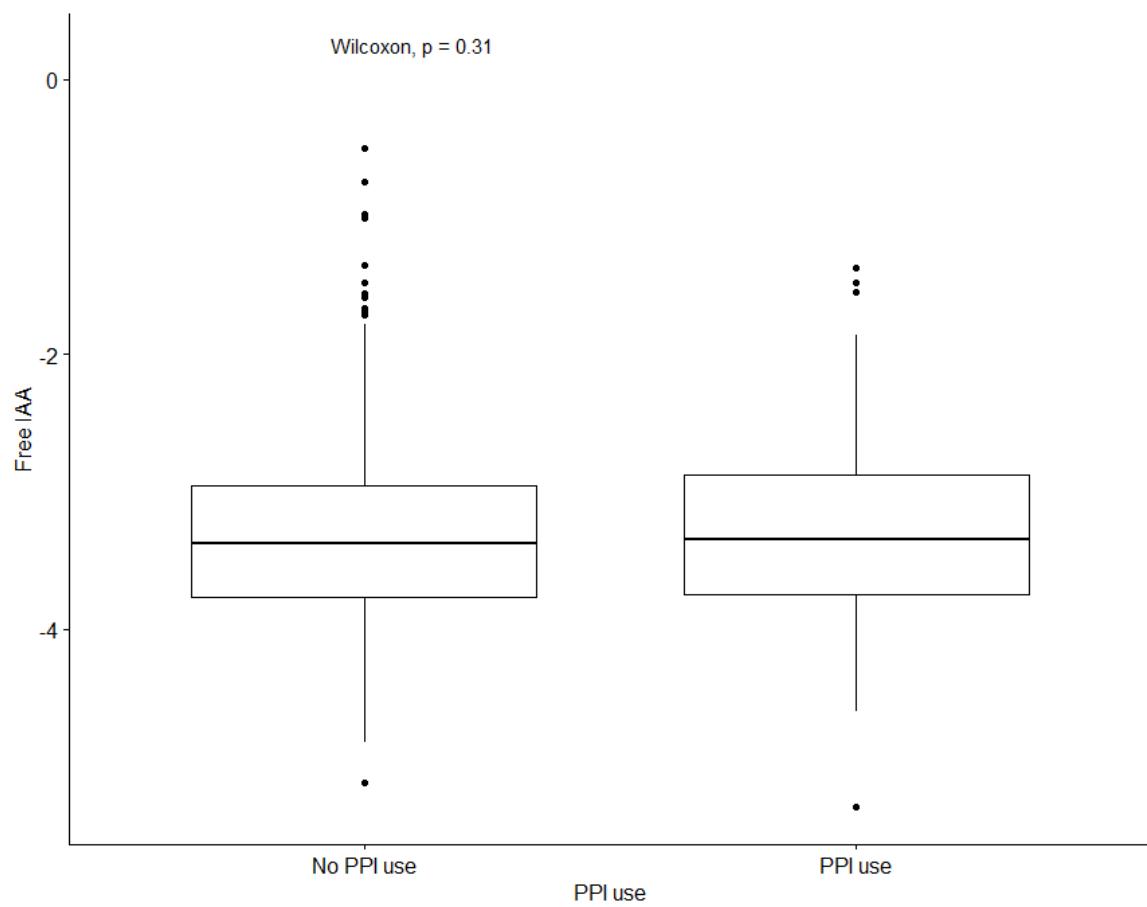
The dotted line indicates the reference value for healthy subjects.

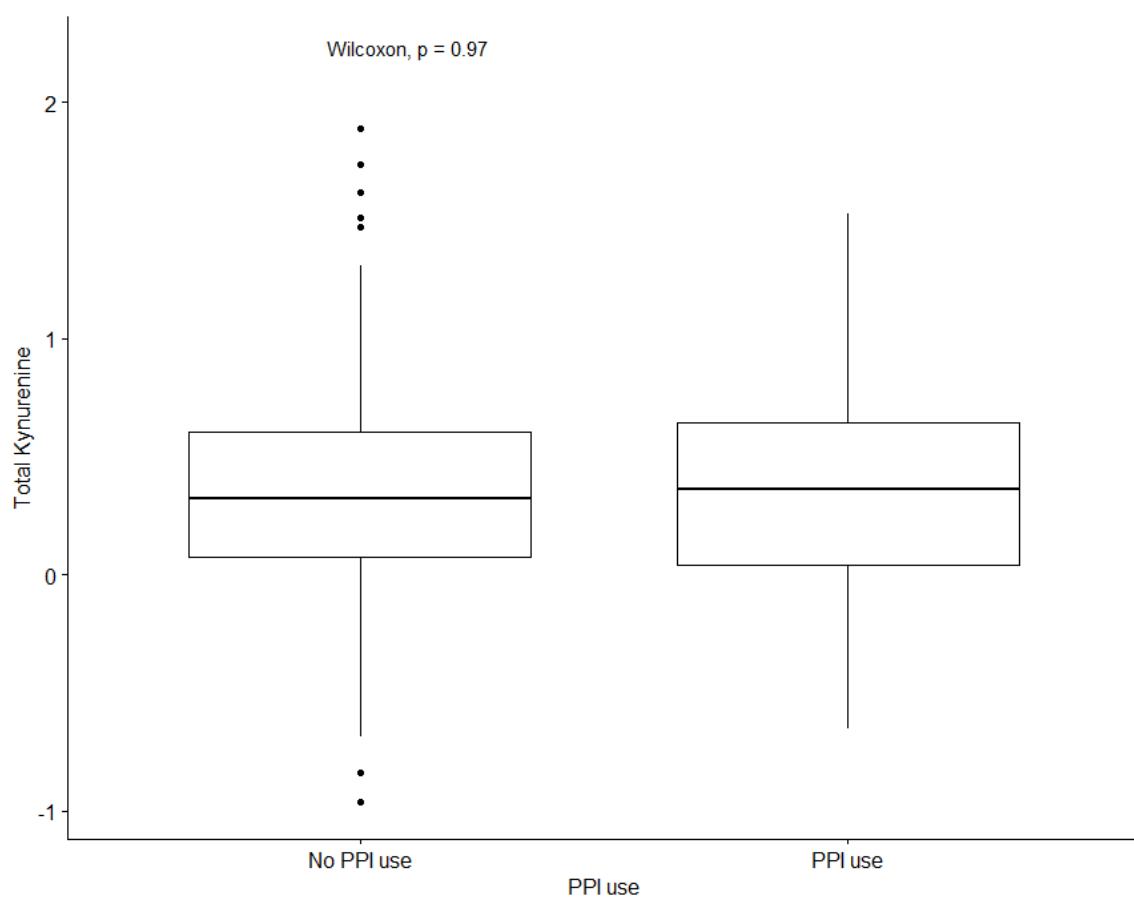
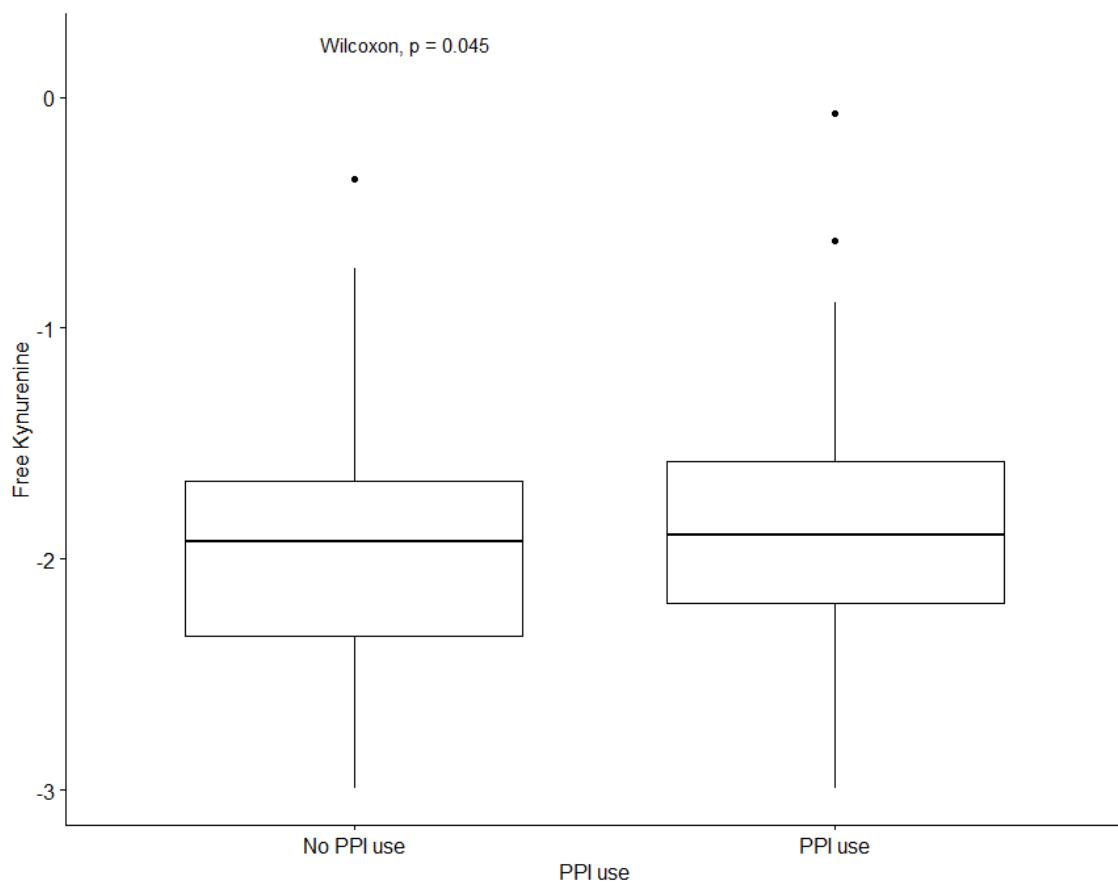
P -values : ns : non significant ; * : <0.05 ; ** : <0.01 ; *** : <0.001 ; **** : <0.0001 .

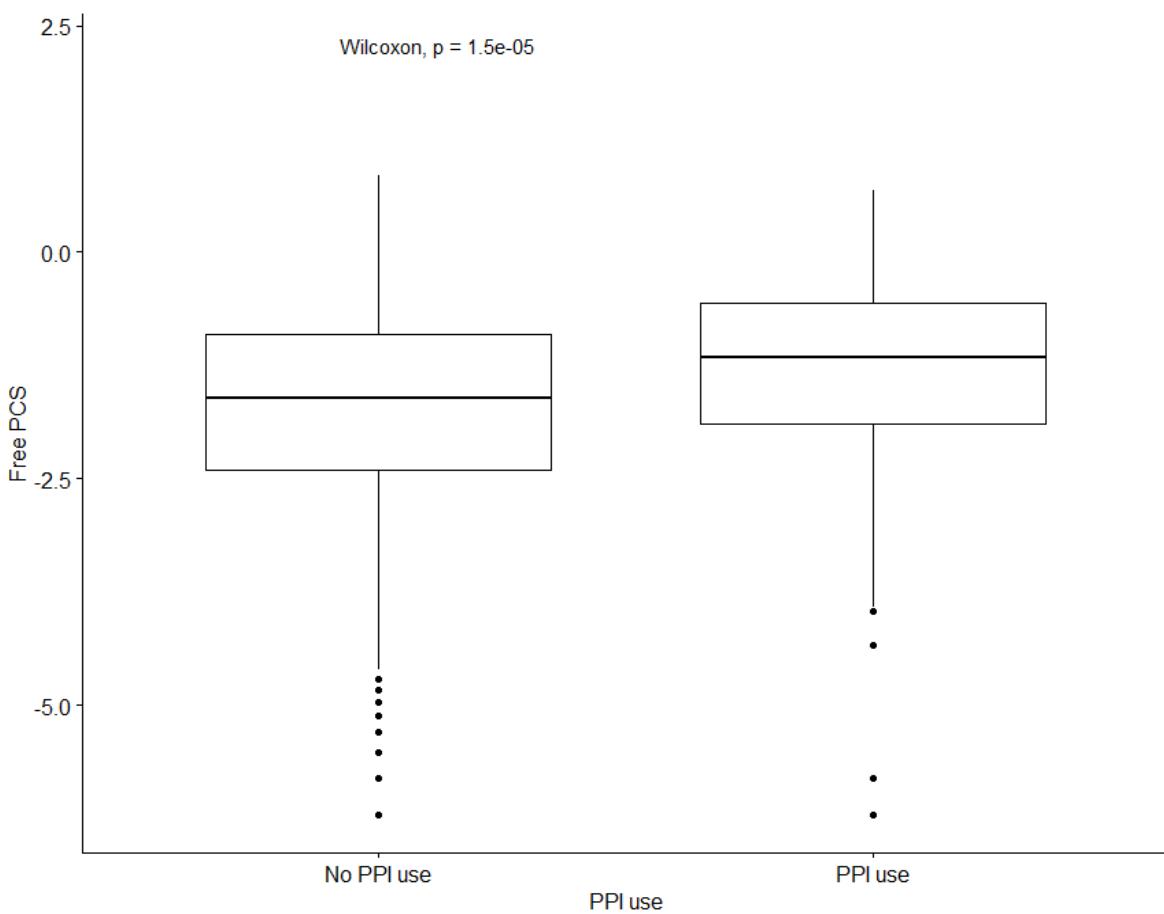
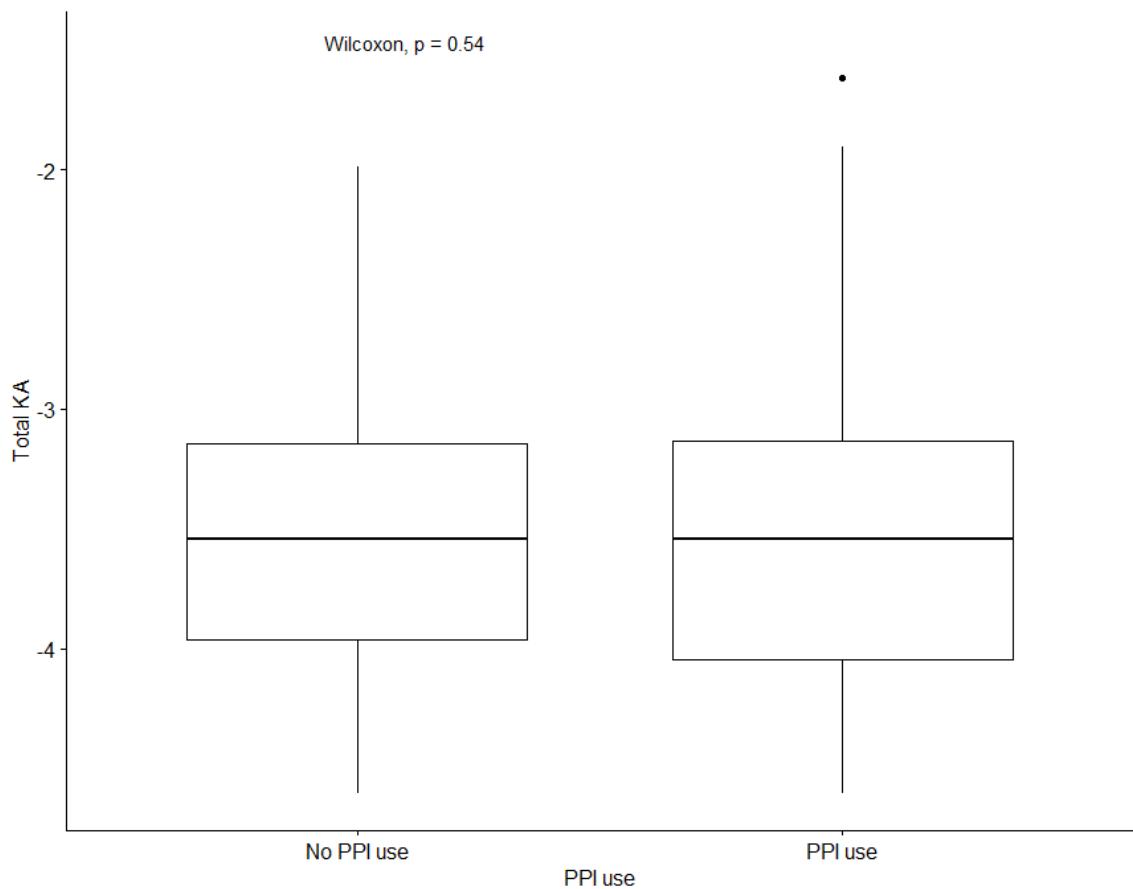
Abbreviations : IS, indoxyl sulfate ; IAA, indole-3-acetic acid ; KA, kynurenic acid ; PCS, p-cresyl sulfate ; PCG, p-cresyl glucuronide ; PAG, phenylacetylglutamine ; HA, hippuric acid ; CMPF, 3-carboxy-4-ethyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid ; TMAO, trimethylamine N-oxide.

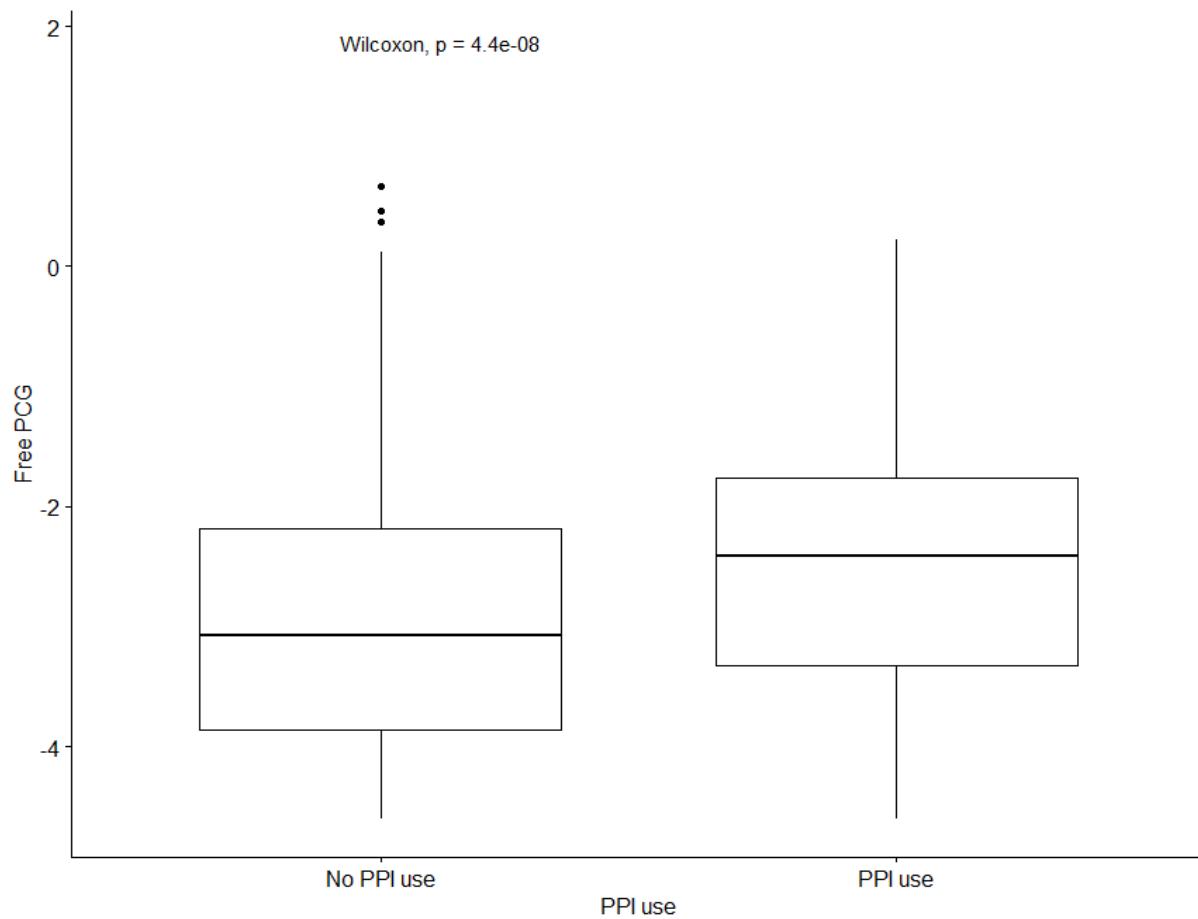
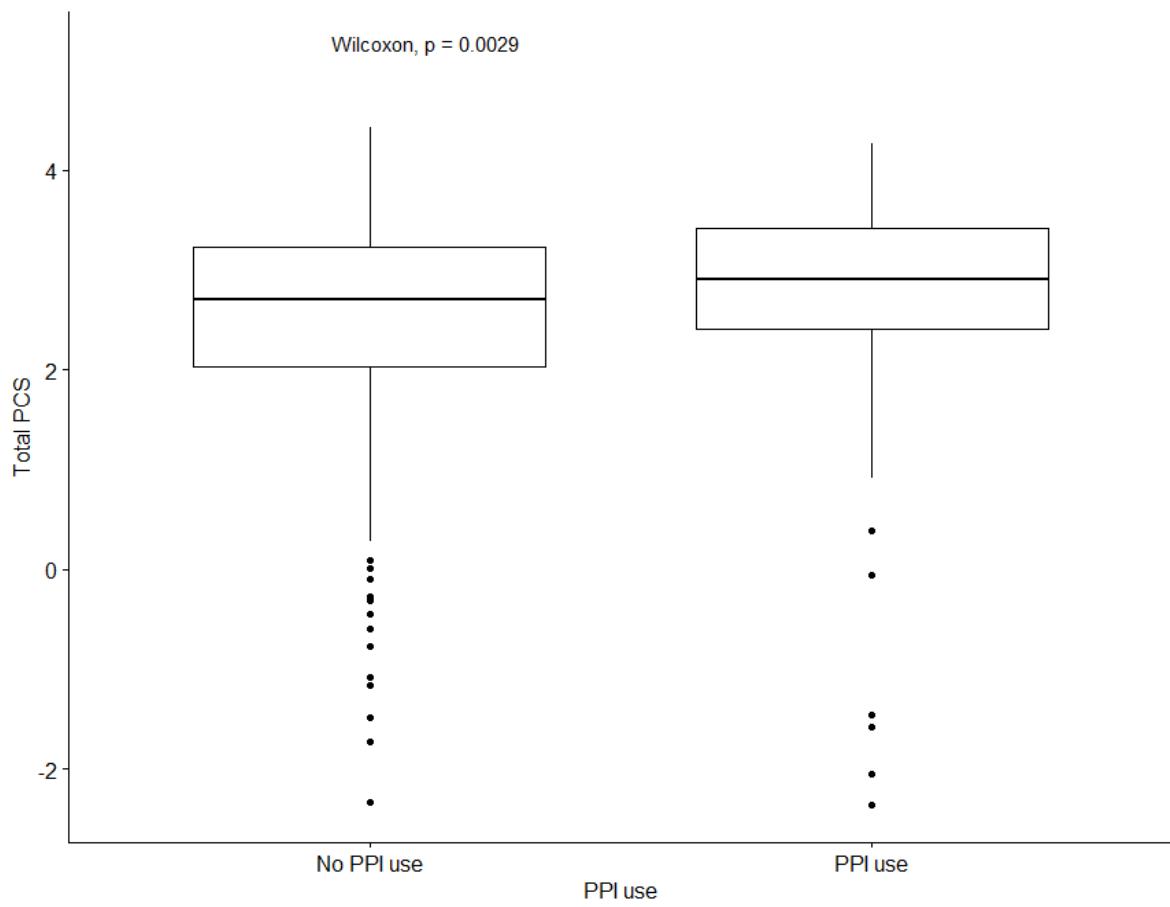
Figure S2. Distribution of log normalized uremic toxins according to proton-pump inhibitor use.

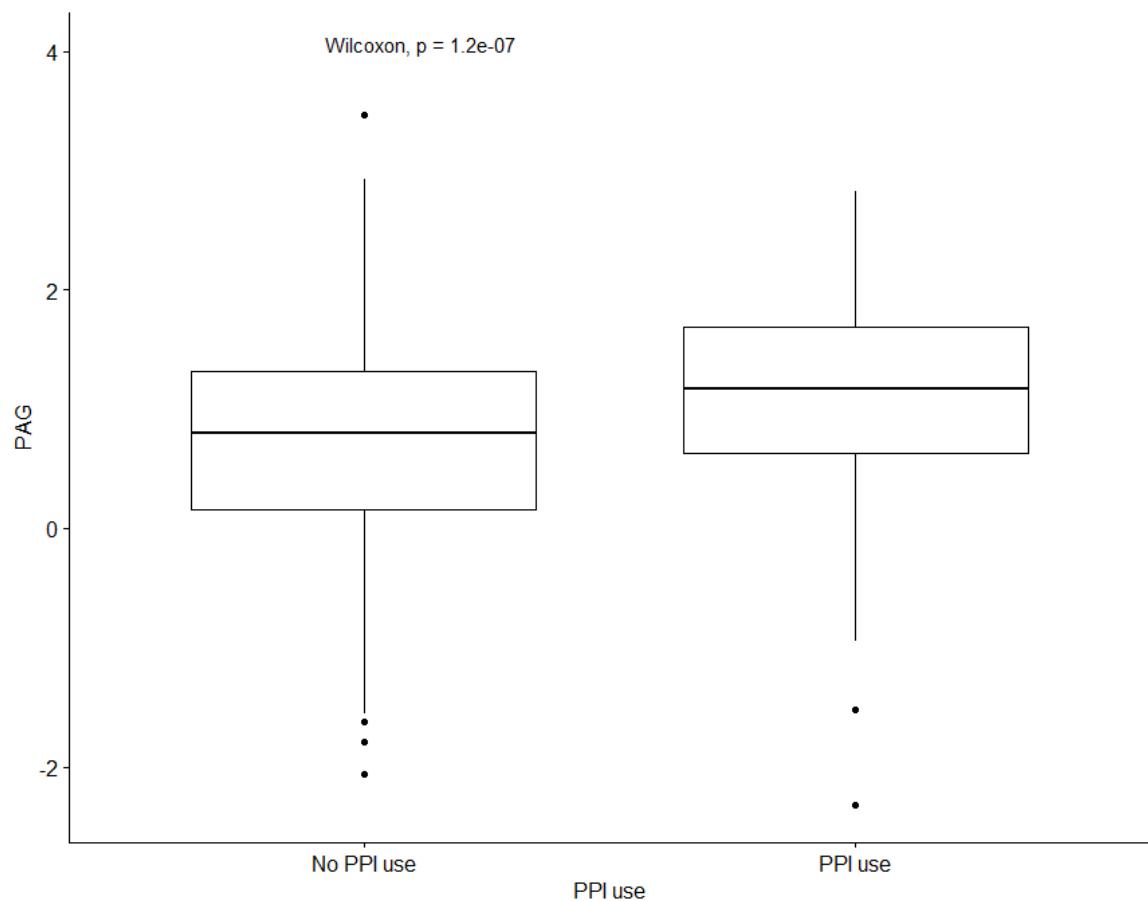
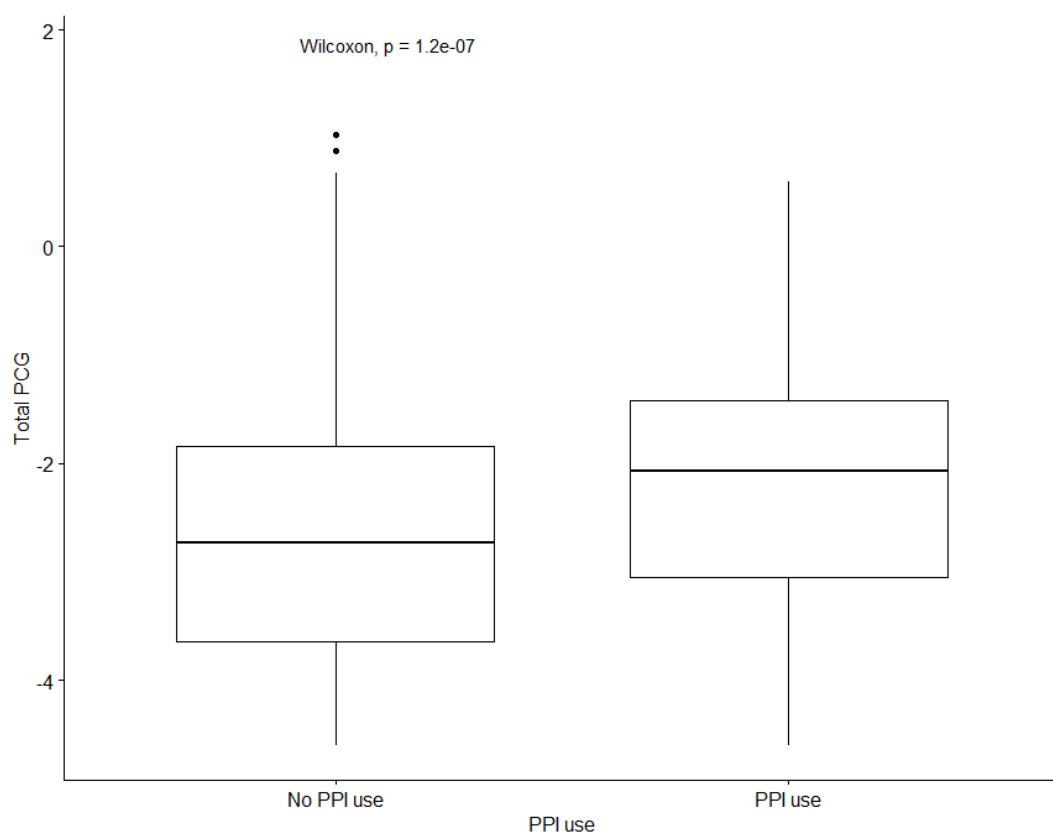


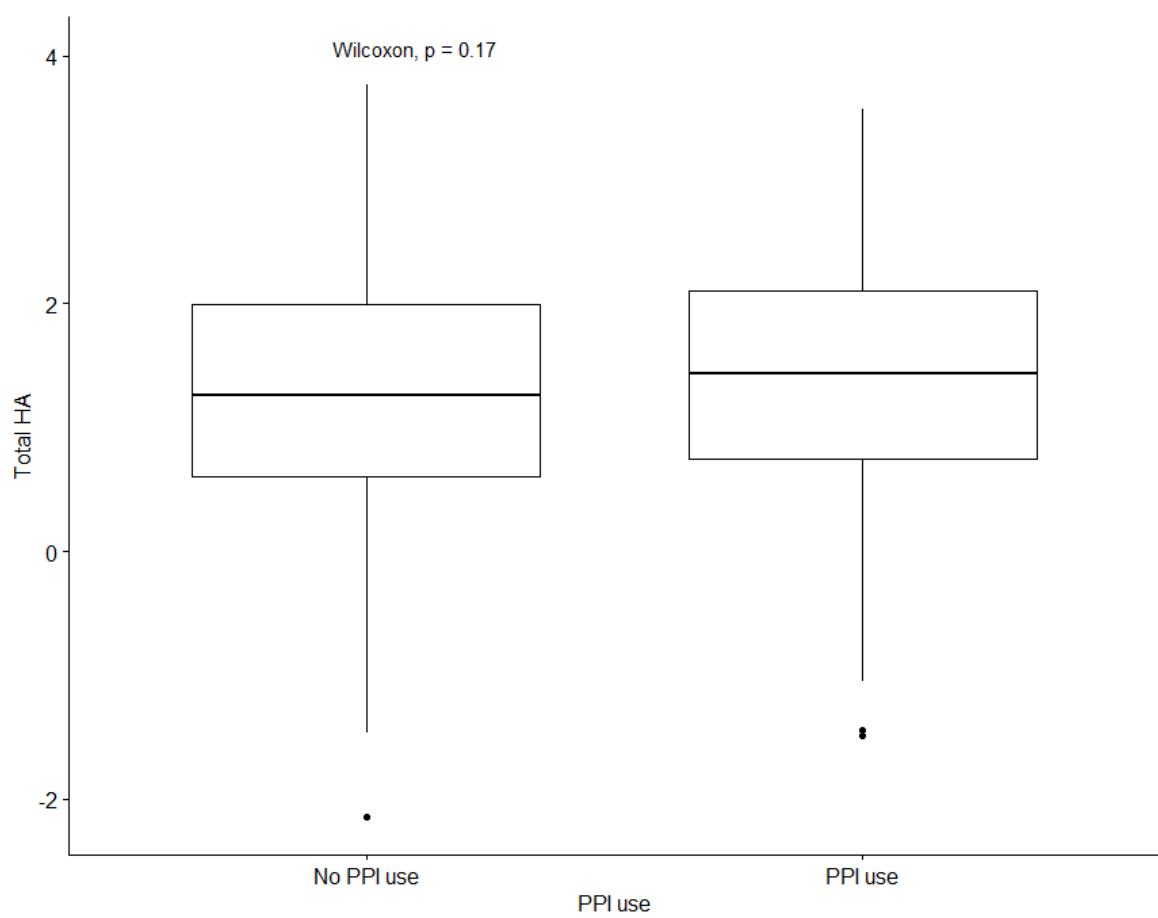
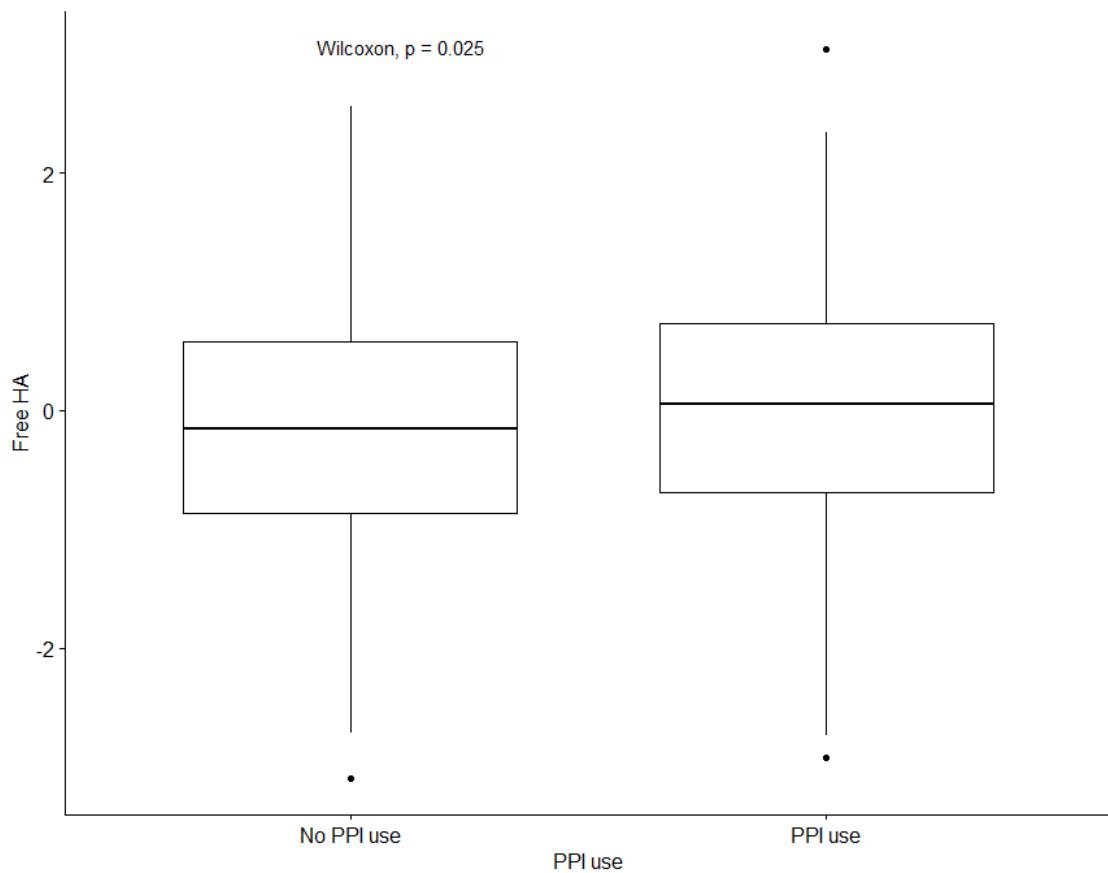


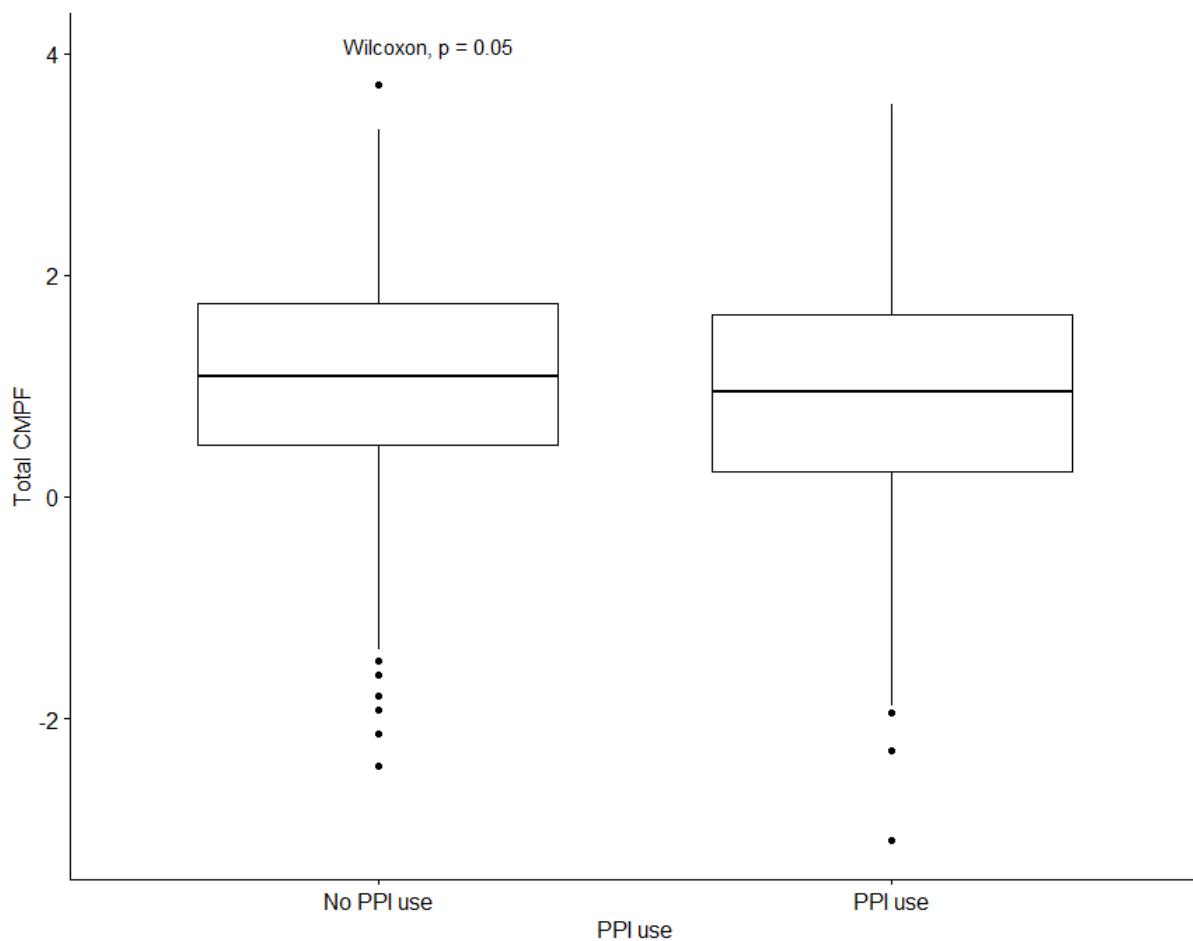
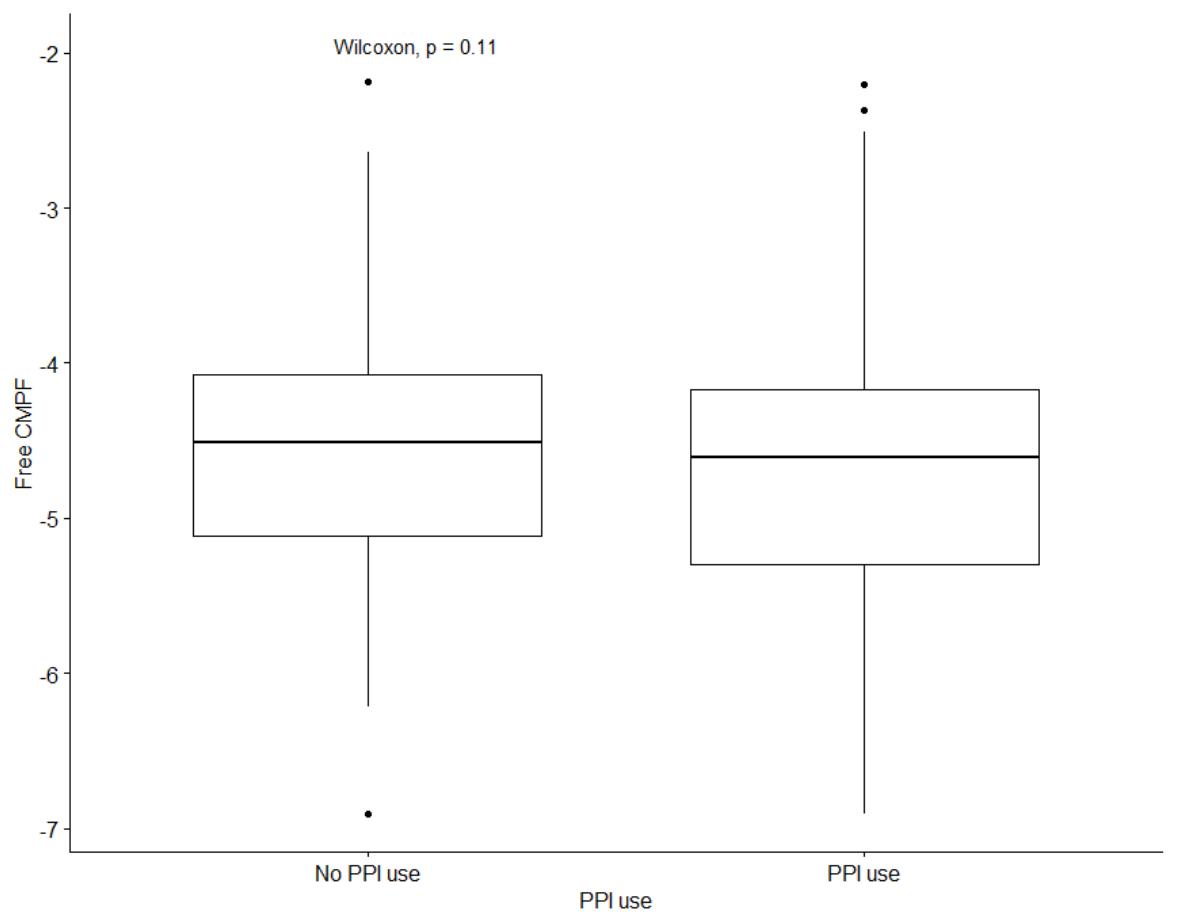


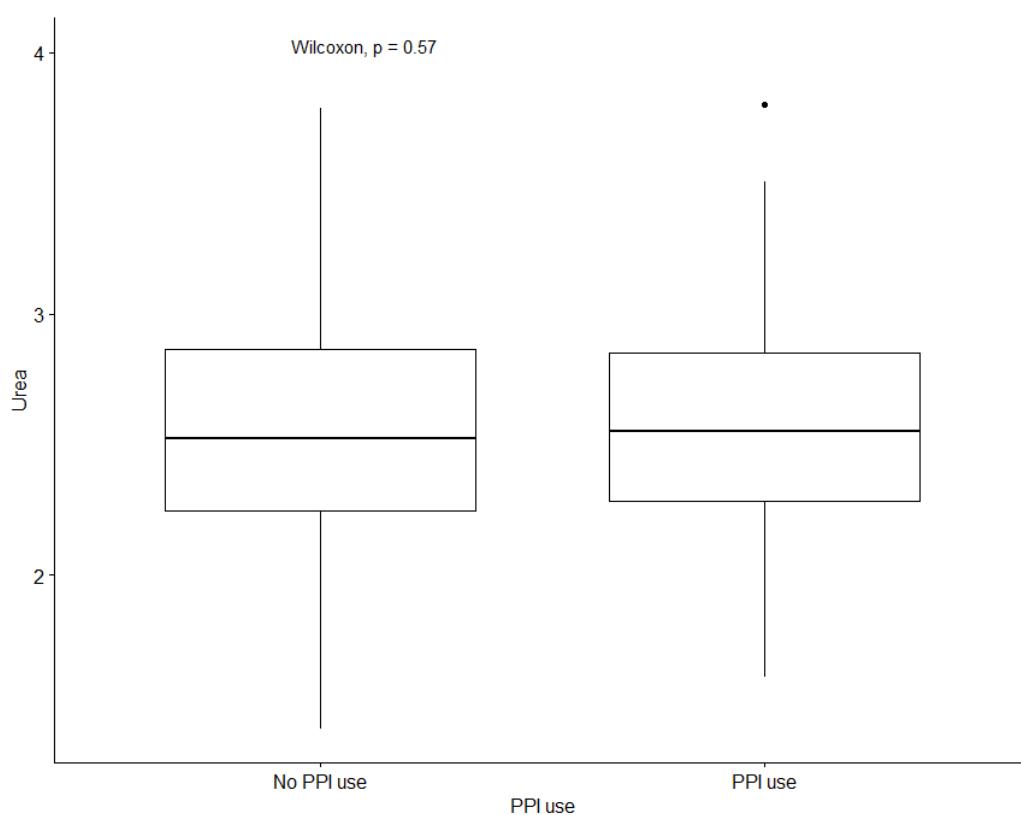
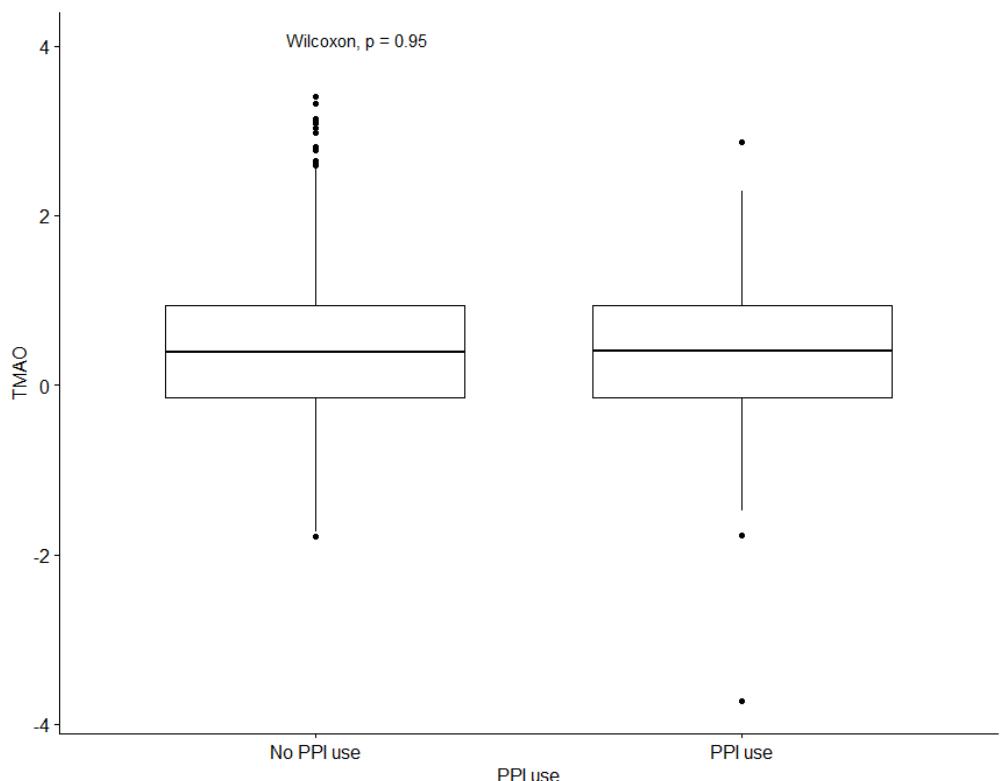












Abbreviations : PPI : proton pump inhibitor ; IS, indoxyl sulfate ; IAA, indole-3-acetic acid ; KA, kynurenic acid ; PCS, p-cresyl sulfate ; PCG, p-cresyl glucuronide ; PAG, phenylacetylglutamine ; HA, hippuric acid ; CMPF, 3-carboxy-4-ethyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid ; TMAO, trimethylamine N-oxide.

List of biological resources centers

The authors would like to thank the teams of all the biological resources centers that participated in the CKD-REIN project:

- Biobanque de Picardie, CRB du Centre Hospitalier Universitaire Amiens Picardie, 1 Rond-Point du Pr Christian Cabrol, 80054 Amiens Cedex 1 (BRIF number: BB-0033-00017)
- NeuroBioTec, CRB des Hospices Civils de Lyon Groupement Hospitalier Est, Hôpital Neurologique, 59 Boulevard Pinel, 69677 Bron Cedex (BRIF number: BB-0033-00046)
- Centre de ressources biologiques du Centre Hospitalier Universitaire de Nantes Hôtel Dieu, Institut de biologie, 9, quai Moncousu, 44093 Nantes Cedex 1 (BRIF number: BB-0033-00040)
- Centre de ressources biologiques du Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes, Boulevard de la Chantourne, CS 10217, 38700 La Tronche (BRIF number: BB-0033-00069)
- Centre de ressources biologiques du Centre Hospitalier Régional Universitaire de Nancy, Hôpitaux de Brabois, Bâtiment Recherche Rue du Morvan, 54500 Vandoeuvre-les-Nancy (BRIF number: BB-0033-00035)
- Servicer de Néphrologie, Centre Hospitalier de Perpignan, 20 Avenue du Languedoc, 66046 Perpignan Cedex 9
- Plateforme de Ressources Biologiques, Hôpital Henri Mondor, 51 avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94000 Créteil (BRIF number: BB-0033-00021)
- CIC-1435, Centre d'Investigation Clinique Plurithématique, Centre Hospitalier Universitaire de Limoges, 2 Avenue Martin Luther King, 87042 Limoges Cedex
- Plateforme de Ressources Biologiques de l'Hôpital européen Georges-Pompidou, 20-40 rue Leblanc, 75015 Paris (BRIF number: BB-0033-00063)
- Etablissement Français du sang Hauts de France – Normandie, Site de Bois-Guillaume 609, chemin de la Bretèque, 76235 Bois-Guillaume
- Etablissement Français du sang Nouvelle Aquitaine, site Pellegrin, Place Amélie Raba Léon, CS 21010, 33075 Bordeaux Cedex
- Etablissement Français du sang Hauts de France – Normandie, Site de Loos-Eurasante, Avenue Pierre Mauroy, Parc Eurasante Epi-de Soil, 59120 Loos
- Etablissement Français du sang Ile de France, Site Avicenne, Hopital Avicenne porte 8, 125 route de Stalingrad, 93009 Bobigny
- Etablissement Français du sang Occitanie, Site de Toulouse, 75 rue de Lisieux, 31300 Toulouse
- Etablissement Français du sang Grand-Est, Site de Colmar, 6 rue du Hohnack, 68025 Colmar Cedex
- Etablissement Français du sang Grand-Est, Site de Metz, 6 rue des Dames de Metz, 57000 Metz
- Etablissement Français du sang PACA-Corse, Site de Marseille, 149, boulevard Baille, 13392 Marseille Cedex 05

Annexe 4 : Financements, coordination et investigateurs de la cohorte CKD-REIN

Financement de la cohorte CKD-REIN

La cohorte CKD-REIN est financée par l'Agence Nationale de la Recherche via le programme *Cohortes-Investissements d'Avenir* et par le *Programme Hospitalier de Recherche Clinique*. La cohorte CKD-REIN est également financée par un partenariat public-privé avec Amgen, Fresenius Medical Care, et GlaxoSmithKline depuis 2012; Lilly France depuis 2013; Otsuka Pharmaceutical depuis 2015; Baxter et Merck Sharp & Dohme-Chibret (MSD France) de 2012 à 2017; Sanofi-Genzyme de 2012 à 2015; et Vifor Fresenius et AstraZeneca depuis 2018. Inserm Transfert a mis en place et gère ce partenariat depuis 2011.

Composition des comités de pilotage et de coordination

Les membres de ces comités sont : Carole Ayav, Serge Briançon, Dorothée Cannet, Christian Combe, Denis Fouque, Luc Frimat, Yves-Edouard Herpe, Christian Jacquelinet, Maurice Laville, Ziad A. Massy, Christophe Pascal, Bruce M. Robinson, Bénédicte Stengel, Céline Lange, Karine Legrand, Sophie Liabeuf, Marie Metzger, Elodie Speyer et Natalia Alencar De Pinho.

Investigateurs et collaborateurs

Les investigateurs et collaborateurs de CKD-REIN sont : Thierry Hannedouche, Bruno Moulin, Sébastien Mailliez, Gaétan Lebrun, Éric Magnant, Gabriel Choukroun, Benjamin Deroure, Adeline Lacraz, Guy Lambrey, Jean Philippe Bourdenx, Marie Essig, Thierry Lobbedez, Raymond Azar, Hacène Sekhri, Mustafa Smati, Mohamed Jamali, Alexandre Klein, Michel Delahousse, Christian Combe, Séverine Martin, Isabelle Landru, Éric Thervet, Ziad A Massy, Philippe Lang, Xavier Belenfant, Pablo Urena, Carlos Vela, Luc Frimat, Dominique Chauveau, Viktor Panescu, Christian Noel, François Glowacki, Maxime Hoffmann, Maryvonne Hourmant, Dominique Besnier, Angelo Testa, François Kuentz, Philippe Zaoui, Charles Chazot, Laurent

Liste des centres de ressources biologiques

- Biobanque de Picardie, CRB du Centre Hospitalier Universitaire Amiens Picardie, 1 Rond-Point du Pr Christian Cabrol, 80054 Amiens Cedex 1 (BRIF number: BB-0033-00017)
- NeuroBioTec, CRB des Hospices Civils de Lyon Groupement Hospitalier Est, Hôpital Neurologique, 59 Boulevard Pinel, 69677 Bron Cedex (BRIF number: BB-0033-00046)
- Centre de ressources biologiques du Centre Hospitalier Universitaire de Nantes Hôtel Dieu, Institut de biologie, 9, quai Moncousu, 44093 Nantes Cedex 1 (BRIF number: BB-0033-00040)

- Centre de ressources biologiques du Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes, Boulevard de la Chantourne, CS 10217, 38700 La Tronche (BRIF number: BB-0033-00069)
- Centre de ressources biologiques du Centre Hospitalier Régional Universitaire de Nancy, Hôpitaux de Brabois, Bâtiment Recherche Rue du Morvan, 54500 Vandoeuvre-les-Nancy (BRIF number: BB-0033-00035)
- Service de Néphrologie, Centre Hospitalier de Perpignan, 20 Avenue du Languedoc, 66046 Perpignan Cedex 9
- Plateforme de Ressources Biologiques, Hôpital Henri Mondor, 51 avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94000 Créteil (BRIF number: BB-0033-00021)
- CIC-1435, Centre d'Investigation Clinique Plurithématique, Centre Hospitalier Universitaire de Limoges, 2 Avenue Martin Luther King, 87042 Limoges Cedex
- Plateforme de Ressources Biologiques de l'Hôpital européen Georges-Pompidou, 20-40 rue Leblanc, 75015 Paris (BRIF number: BB-0033-00063)
- Etablissement Français du sang Hauts de France – Normandie, Site de Bois-Guillaume 609, chemin de la Bretèque, 76235 Bois-Guillaume
- Etablissement Français du sang Nouvelle Aquitaine, site Pellegrin, Place Amélie Raba Léon, CS 21010, 33075 Bordeaux Cedex
- Etablissement Français du sang Hauts de France – Normandie, Site de Loos-Eurasanté, Avenue Pierre Mauroy, Parc Eurasante Epi-de Soil, 59120 Loos
- Etablissement Français du sang Ile de France, Site Avicenne, Hopital Avicenne porte 8, 125 route de Stalingrad, 93009 Bobigny
- Etablissement Français du sang Occitanie, Site de Toulouse, 75 rue de Lisieux, 31300 Toulouse
- Etablissement Français du sang Grand-Est, Site de Colmar, 6 rue du Hohnack, 68025 Colmar Cedex
- Etablissement Français du sang Grand-Est, Site de Metz, 6 rue des Dames de Metz, 57000 Metz
- Etablissement Français du sang PACA-Corse, Site de Marseille, 149, boulevard Baille, 13392 Marseille Cedex 05

Annexe 5 : Différence entre date de prélèvement et date d'inclusion

Différence (en jours) entre la date de prélèvement et la date d'inclusion	Effectif
0	2307
1	13
2	3
3	3
4	1
5	3
6	1
7	11
8	7
9	2
10	2
11	2
12	1
14	8
15	2
16	1
17	1
21	10
22	1
25	3
29	1
30	4

31	1
35	1
37	1
51	1
54	1
56	1
57	1
68	1
69	1
71	1
76	1
77	2
78	1
84	2
87	1
91	2

Annexe 6 : Caractéristiques de la population étudiée selon les tertiles de la kynurénine sérique totale

Caractéristique	Total	Tertiles de kynurénine totale (mg/L)			P-value ²	Données imputées
	N = 2406 ¹	<0,99 (n=799) ¹	[0,99-1,4) (n=804) ¹	>=1,4 (n=803) ¹		
Age à l'inclusion (années)	68 [60-76]	68 [60-75]	68 [59-76]	69 [62-76]	0,09	0%
Homme	66%	65%	66%	66%	0,9	0%
DFGe à l'inclusion (ml/min/1,73m²)	24,7 [18,4-33,1]	29 [22-38]	24 [17-32]	22 [17-28]	<0,0001	0%
Rapport albumine ou protéine/créatinine (mg/g)	104 [21-491]	77 [18-382]	113 [22-546]	135 [28-566]	<0,0001	11,5%
Antécédents d'insuffisance rénale aiguë	23%	22%	23%	25%	0,6	7,2%
Statut de fumeur					0,01	0,6%
Jamais fumeur	40,5%	41%	38%	42%		
Fumeur actuel	12,5%	15%	12%	9,9%		
Ancien fumeur	47%	44%	50%	48%		
Hypertension artérielle	96%	96%	96%	97%	0,7	0,2%
Pression artérielle systolique (mmHg)	140 [128-153]	139 [129-154]	139 [127-151]	140 [130-154]	0,1	0,5%
Diabète	41%	39%	43%	42%	0,2	0,2%

Dyslipidémie	74%	73%	73%	74%	0,8	0,4%
Antécédents de maladies cardiovasculaires	52%	49%	53%	55%	0,06	0,5%
Bicarbonate sérique (mmol/L)	25 [23-27]	25 [23-27]	25 [23-27]	25 [22,6-27]	0,1	8,8%
Albuminémie (g/L)	40,4 [38-43]	40,3 [37,9-43]	40,6 [38-43]	40,4 (37,7-43)	0,6	14,5%
Hémoglobine (g/dL)	13 [11,8-14,2]	13,1[11,95-14,3]	13 [11,8-14,1]	12,9 [11,8-14,1]	0,1	0,9%
CRP (mg/L)	2,4 [1,1-5,1]	2,1 [0,9-4,5]	2,2 [1,1-4,9]	2,7 [1,2-5,8]	<0,0001	5,4%
Indice de masse corporelle (kg/m²)	27,9 [24,7-31,7]	27,1 [24,2-30,9]	28,1 [24,7-32]	28,4 [25,3-32,3]	<0,0001	1,9%
Prescription d'IPP à l'inclusion	32%	32%	32%	34%	0,6	0,2%
Prescription de diurétique à l'inclusion	52%	48%	53%	56%	0,004	0,3%
Prescription de médicaments antihypertenseurs à l'inclusion	94%	92%	94%	96%	0,006	0,3%
Prescription de médicaments hypolipémiants à l'inclusion	63%	61%	63%	66%	0,2	0,3%

Prescription de médicaments antidiabétiques à l'inclusion	34%	32%	37%	34%	0,1	0,3%
Tryptophane libre (mg/L)	0,91 [0,7-1,17]	0,85 [0,66-1,08]	0,94 [0,72-1,23]	0,96 [0,76-1,25]	<0,0001	0%
Tryptophane total (mg/L)	12,3 [10-14,8]	10,7 [8,8-12,9]	12 [10,1-14,1]	14,4 [11,9-17,6]	<0,0001	0%
Kynurénine totale	1,19 [0,91-1,6]	0,8 [0,7-0,9]	1,18[1,08-1,3]	1,8[1,6-2,2]	-	0%
Kynurénine libre	0,13 [0,09-0,18]	0,09 [0,07-0,12]	0,13[0,1-0,19]	0,16[0,1-0,2]	<0,0001	0%

¹ Médiane [Q1-Q3]; %

² Test de Kruskal-Wallis; test de khi-deux

DFGe: débit de filtration glomérulaire estimé; CRP: protéine C-réactive; IPP: inhibiteurs de pompe à protons.

Annexe 7 : Hazard Ratio des évènements cardiovasculaires associé à une double augmentation des concentrations sériques de kynurénine totale (mg/L).

	Kynurénine totale (mg/L)
HR non ajusté [IC95%] – p-value	1,5* [1,3-1,7] -- <0,001
HR ajusté¹ [IC95%] – p-value	1,2* [1,05-1,4] – 0,01
HR ajusté² [IC95%] – p-value	1,2* [1,05-1,4] – 0,01
HR ajusté³ [IC95%] – p-value	1,2* [1,05-1,4] – 0,01

¹Modèle ajusté sur l'âge à l'inclusion, le sexe, le statut tabagique, l'urée, l'indice de masse corporelle, le diabète, la dyslipidémie, la protéine C réactive à haute sensibilité, la pression artérielle systolique, le rapport albumine ou protéine/créatinine, le débit de filtration glomérulaire estimé, la prescription : de diurétique, d'antihypertenseurs, d'hypolipémiants et d'antidiabétiques.

²1+tryptophane sérique libre.

³1+indoxylique sulfate, p-cresyl sulfate, et acide indole 3-acétique libres.

*Les HR obtenus des modèles de Cox ont été transformés en échelles non logarithmiques en appliquant la formule exponentielle (bêta du modèle de Cox * log(y)) (avec y=2).

Annexe 8 : Hazard Ratio des évènements cardiovasculaires athéromateux associé à une double augmentation des concentrations sériques de kynurénine totale (mg/L).

	Kynurénine totale (mg/L)
HR non ajusté [IC95%] – p-value	1,5* [1,2-1,8] – 0,0003
HR ajusté¹ [IC95%] – p-value	1,3* [1,04-1,64] – 0,02
HR ajusté² [IC95%] – p-value	1,3* [1,04-1,6] – 0,02
HR ajusté³ [IC95%] – p-value	1,29* [1,03-1,6] – 0,02

¹Modèle ajusté sur l'âge à l'inclusion, le sexe, le statut tabagique, l'urée, l'indice de masse corporelle, le diabète, la dyslipidémie, la protéine C réactive à haute sensibilité, la pression artérielle systolique, le rapport albumine ou protéine/créatinine, le débit de filtration glomérulaire estimé, la prescription : d'antihypertenseurs, d'hypolipémiants et d'antidiabétiques.

²1+tryptophane sérique libre.

³1+indoxylo sulfate, p-cresyl sulfate, et acide indole 3-acétique libres.

*Les HR obtenus des modèles de Cox ont été transformés en échelles non logarithmiques en appliquant la formule exponentielle (bêta du modèle de Cox * log(y)) (avec y=2).

Annexe 9 : Hazard Ratio des évènements cardiovasculaires non-athéromateux associé à une double augmentation des concentrations sériques de kynurénine totale (mg/L).

	Kynurénine totale (mg/L)
HR non ajusté [IC95%] – p-value	1,7* [1,4-1,9] -- <0,0001
HR ajusté¹ [IC95%] – p-value	1,21* [1,006 -1,46] – 0,04
HR ajusté² [IC95%] – p-value	1,21* [1,009 -1,46] – 0,04
HR ajusté³ [IC95%] – p-value	1,2* [1,01-1,46] – 0,03

¹Modèle ajusté sur l'âge à l'inclusion, le sexe, le statut tabagique, l'urée, l'indice de masse corporelle, le diabète, la protéine C réactive à haute sensibilité, la pression artérielle systolique, le rapport albumine ou protéine/créatinine, le débit de filtration glomérulaire estimé, la prescription : d'antihypertenseurs, de diurétiques et d'antidiabétiques.

²1+tryptophane sérique libre.

³1+indoxylo sulfate, p-cresyl sulfate, et acide indole 3-acétique libres.

*Les HR obtenus des modèles de Cox ont été transformés en échelles non logarithmiques en appliquant la formule exponentielle (bêta du modèle de Cox * log(y)) (avec y=2).

Annexe 10 : Analyse de sensibilité évaluant l'IPP comme facteur de confusion: Hazard Ratio de la mortalité toute cause associé à une double augmentation des concentrations sériques de kynurénine libre (mg/L).

	Kynurénine libre (mg/L)
HR non ajusté [IC95%] – p-value	1,7 [1,5-1,9] -- <0,0001
HR ajusté¹ [IC95%] – p-value	1,22 [1,02-1,5] – 0,03
HR ajusté² [IC95%] – p-value	1,219 [1,02-1,49] – 0,02
HR ajusté³ [IC95%] – p-value	1,12 [0,9-1,4] – 0,3
HR ajusté⁴ [IC95%] – p-value	1,18 [0,9-1,4] – 0,07

¹Modèle ajusté sur l'âge à l'inclusion, le sexe, le statut tabagique, l'albumine sérique, l'urée, l'indice de masse corporelle, le diabète, dyslipidémie, la protéine C réactive à haute sensibilité, la pression artérielle systolique, le rapport albumine ou protéine/créatinine, le débit de filtration glomérulaire estimé, la prescription : d'antihypertenseurs, de diurétiques, d'hypolipémiants et d'antidiabétiques.

²Modèle ajusté sur l'âge à l'inclusion, le sexe, le statut tabagique, l'albumine sérique, l'urée, l'indice de masse corporelle, le diabète, dyslipidémie, la protéine C réactive à haute sensibilité, la pression artérielle systolique, le rapport albumine ou protéine/créatinine, le débit de filtration glomérulaire estimé, la prescription : d'antihypertenseurs, de diurétiques, d'hypolipémiants, d'antidiabétiques, et d'IPP.

³1+tryptophane sérique libre.

⁴1+indoxyl sulfate, p-cresyl sulfate libre, et acide indole 3-acétique libres.

Annexe 11 : Hazard Ratio de la mortalité toute cause associé à une double augmentation des concentrations sériques de kynurénine totale (mg/L) et l'analyse de sensibilité évaluant l'IPP comme facteur de confusion.

	Kynurénine totale (mg/L)
HR non ajusté [IC95%] – p-value	1,4* [1,1-1,6] – 0,0009
HR ajusté¹ [IC95%] – p-value	1,04* [0,9-1,3] – 0,7
HR ajusté² [IC95%] – p-value	1,04* [0,9-1,3] – 0,7
HR ajusté³ [IC95%] – p-value	1,04* [0,9-1,3] – 0,7
HR ajusté⁴ [IC95%] – p-value	1,04* [0,9-1,3] – 0,6

¹Modèle ajusté sur l'âge à l'inclusion, le sexe, le statut tabagique, l'urée, l'indice de masse corporelle, le diabète, dyslipidémie, la protéine C réactive à haute sensibilité, la pression artérielle systolique, le rapport albumine ou protéine/créatinine, le débit de filtration glomérulaire estimé, la prescription : d'antihypertenseurs, de diurétiques, d'hypolipémiants et d'antidiabétiques.

²Modèle ajusté sur l'âge à l'inclusion, le sexe, le statut tabagique, l'urée, l'indice de masse corporelle, le diabète, dyslipidémie, la protéine C réactive à haute sensibilité, la pression artérielle systolique, le rapport albumine ou protéine/créatinine, le débit de filtration glomérulaire estimé, la prescription : d'antihypertenseurs, de diurétiques, d'hypolipémiants, d'antidiabétiques, et d'IPP.

³1+tryptophane sérique libre.

⁴1+indoxyl sulfate, p-cresyl sulfate libre, et acide indole 3-acétique libres.

*Les HR obtenus des modèles de Cox ont été transformés en échelles non logarithmiques en appliquant la formule exponentielle (bêta du modèle de Cox * log(y)) (avec y=2).

Annexe 12 : Analyse de sensibilité évaluant l'IPP comme facteur de confusion

Hazard Ratio de la mortalité non cardiovasculaire associé à une double augmentation des concentrations sériques de kynurénine libre (mg/L).

	Kynurénine libre (mg/L)
HR non ajusté [IC95%] – p-value	1,5 [1,3-1,8] – <0,0001
HR ajusté¹ [IC95%] – p-value	1,1 [0,9-1,4] – 0,3
HR ajusté² [IC95%] – p-value	1,1 [0,9-1,4] – 0,3
HR ajusté³ [IC95%] – p-value	1,03 [0,8-1,32] – 0,8
HR ajusté⁴ [IC95%] – p-value	1,1 [0,9-1,4] – 0,3

¹Modèle ajusté sur l'âge à l'inclusion, le sexe, le statut tabagique, l'albumine sérique, l'urée, l'indice de masse corporelle, le diabète, dyslipidémie, la protéine C réactive à haute sensibilité, la pression artérielle systolique, le rapport albumine ou protéine/créatinine, le débit de filtration glomérulaire estimé, la prescription : d'antihypertenseurs, de diurétiques, d'hypolipémiants et d'antidiabétiques.

¹Modèle ajusté sur l'âge à l'inclusion, le sexe, le statut tabagique, l'albumine sérique, l'urée, l'indice de masse corporelle, le diabète, dyslipidémie, la protéine C réactive à haute sensibilité, la pression artérielle systolique, le rapport albumine ou protéine/créatinine, le débit de filtration glomérulaire estimé, la prescription : d'antihypertenseurs, de diurétiques, d'hypolipémiants, d'antidiabétiques et d'IPP.

²1+tryptophane sérique libre.

³1+indoxyl sulfate, p-cresyl sulfate libre, et acide indole 3-acétique libres.

Annexe 13 : Hazard Ratio de la mortalité non cardiovasculaire associé à une double augmentation des concentrations sériques de kynurénine totale (mg/L) et l'analyse de sensibilité évaluant l'IPP comme facteur de confusion.

	Kynurénine totale (mg/L)
HR non ajusté [IC95%] – p-value	1,3* [1,07-1,7] – 0,008
HR ajusté¹ [IC95%] – p-value	1,01* [0,8-1,3] – 0,9
HR ajusté² [IC95%] – p-value	1,01* [0,8-1,3] – 0,9
HR ajusté³ [IC95%] – p-value	1,01* [0,8-1,3] – 0,9
HR ajusté⁴ [IC95%] – p-value	1,009* [0,8-1,3] – 0,9

¹Modèle ajusté sur l'âge à l'inclusion, le sexe, le statut tabagique, l'urée, l'indice de masse corporelle, le diabète, dyslipidémie, la protéine C réactive à haute sensibilité, la pression artérielle systolique, le rapport albumine ou protéine/créatinine, le débit de filtration glomérulaire estimé, la prescription : d'antihypertenseurs, de diurétiques, d'hypolipémiants et d'antidiabétiques.

¹Modèle ajusté sur l'âge à l'inclusion, le sexe, le statut tabagique, l'urée, l'indice de masse corporelle, le diabète, dyslipidémie, la protéine C réactive à haute sensibilité, la pression artérielle systolique, le rapport albumine ou protéine/créatinine, le débit de filtration glomérulaire estimé, la prescription : d'antihypertenseurs, de diurétiques, d'hypolipémiants, d'antidiabétiques et d'IPP.

²1+tryptophane sérique libre.

³1+indoxylo sulfate, p-cresyl sulfate libre, et acide indole 3-acétique libres.

*Les HR obtenus des modèles de Cox ont été transformés en échelles non logarithmiques en appliquant la formule exponentielle (β éta du modèle de Cox * log(y)) (avec y=2).

Annexe 14 : Analyse de sensibilité évaluant l'IPP comme facteur de confusion

Hazard Ratio de la mortalité cardiovasculaire associé à une double augmentation des concentrations sériques de kynurénine libre (mg/L).

	Kynurénine libre (mg/L)
HR non ajusté [IC95%] – p-value	2,3 [1,7-3,03] – <0,0001
HR ajusté¹ [IC95%] – p-value	1,8 [1,3-2,5] – 0,0001
HR ajusté² [IC95%] – p-value	1,79 [1,29-2,5] – 0,0001
HR ajusté³ [IC95%] – p-value	1,66 [1,1-2,5] – 0,01
HR ajusté⁴ [IC95%] – p-value	1,64 [1,1-2,4] – 0,007

¹Modèle ajusté sur l'âge à l'inclusion, le sexe, le statut tabagique, l'albumine sérique, l'urée, l'indice de masse corporelle, le diabète, dyslipidémie, la protéine C réactive à haute sensibilité, la pression artérielle systolique, le rapport albumine ou protéine/créatinine, le débit de filtration glomérulaire estimé, la prescription : d'antihypertenseurs, de diurétiques, d'hypolipémiants et d'antidiabétiques.

²Modèle ajusté sur l'âge à l'inclusion, le sexe, le statut tabagique, l'albumine sérique, l'urée, l'indice de masse corporelle, le diabète, dyslipidémie, la protéine C réactive à haute sensibilité, la pression artérielle systolique, le rapport albumine ou protéine/créatinine, le débit de filtration glomérulaire estimé, la prescription : d'antihypertenseurs, de diurétiques, d'hypolipémiants, d'antidiabétiques et d'IPP.

³1+tryptophane sérique libre.

⁴1+indoxylo sulfate, p-cresyl sulfate libre, et acide indole 3-acétique libres.

Annexe 15 : Hazard Ratio de la mortalité cardiovasculaire associé à une double augmentation des concentrations sériques de kynurénine totale (mg/L) et l'analyse de sensibilité évaluant l'IPP comme facteur de confusion.

	Kynurénine totale (mg/L)
HR non ajusté [IC95%] – p-value	1,5* [1,05-2,04] – 0,02
HR ajusté¹ [IC95%] – p-value	1,16* [0,8-1,7] – 0,4
HR ajusté² [IC95%] – p-value	1,16* [0,8-1,7] – 0,4

HR ajusté³ [IC95%] – p-value	1,16* [0,8-1,7] – 0,4
HR ajusté⁴ [IC95%] – p-value	1,17* [0,8-1,7] – 0,4

¹Modèle ajusté sur l'âge à l'inclusion, le sexe, le statut tabagique, l'urée, l'indice de masse corporelle, le diabète, dyslipidémie, la protéine C réactive à haute sensibilité, la pression artérielle systolique, le rapport albumine ou protéine/créatinine, le débit de filtration glomérulaire estimé, la prescription : d'antihypertenseurs, de diurétiques, d'hypolipémiants et d'antidiabétiques.

²Modèle ajusté sur l'âge à l'inclusion, le sexe, le statut tabagique, l'urée, l'indice de masse corporelle, le diabète, dyslipidémie, la protéine C réactive à haute sensibilité, la pression artérielle systolique, le rapport albumine ou protéine/créatinine, le débit de filtration glomérulaire estimé, la prescription : d'antihypertenseurs, de diurétiques, d'hypolipémiants, d'antidiabétiques et d'IPP.

³1+tryptophane sérique libre.

⁴1+indoxylo sulfate, p-cresyl sulfate libre, et acide indole 3-acétique libres.

*Les HR obtenus des modèles de Cox ont été transformés en échelles non logarithmiques en appliquant la formule exponentielle (bêta du modèle de Cox * log(y)) (avec y=2).

Annexe 16 : Comparaison des caractéristiques entre les patients inclus et non inclus dans l'échantillon tiré au sort de la cohorte entière.

Caractéristique	Total (N = 3033)¹	Inclus (n=680)¹	Non inclus (n=2353)¹	P-valeur²
Age à l'inclusion (années)	69 [60-76]	68 [61-77]	69 [60-76]	0,77
Homme	65,4%	69%	64,3%	0,02
DFGe à l'inclusion (ml/min/1,73m²)	32 [23-41]	32 [23-41]	32 [23-41]	0,89
Rapport albumine ou protéine/créatinine				0,39
A1 (Normale à légèrement augmentée)	27,8%	30%	27,2%	
A2 (Modérément augmentée)	31,2%	30%	31,6%	

A3 (Sévèrement augmentée) NA	40,9% 275	40% 58	41,1% 217	
Antécédents d'insuffisance rénale aiguë NA	23,6% 244	21% 51	24,4% 193	0,08
Statut de fumeur Jamais fumeur Fumeur actuel Ancien fumeur NA	41,3% 11,9% 46,8% 23	38% 13% 49% 5	42% 12% 46% 18	0,17
Hypertension artérielle NA	96,3% 7	96,6% 2	96,2% 5	0,64
Diabète NA	43,2% 7	40% 2	44% 5	0,08
Dyslipidémie	73,6% 14	73% 3	73,9% 11	0,46

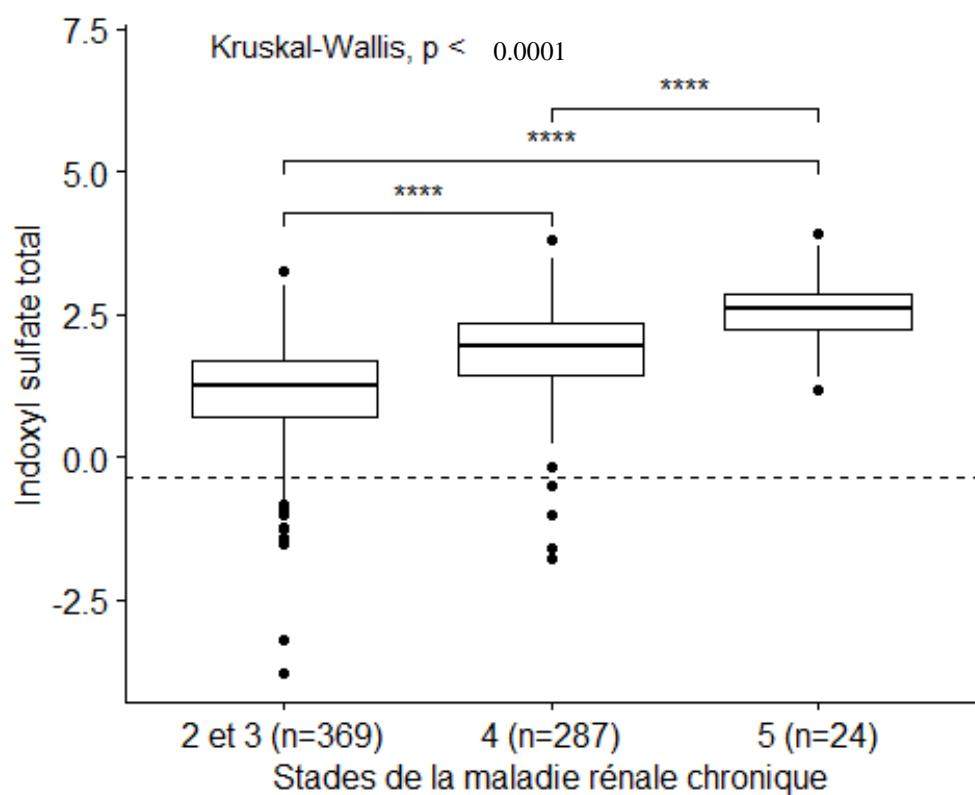
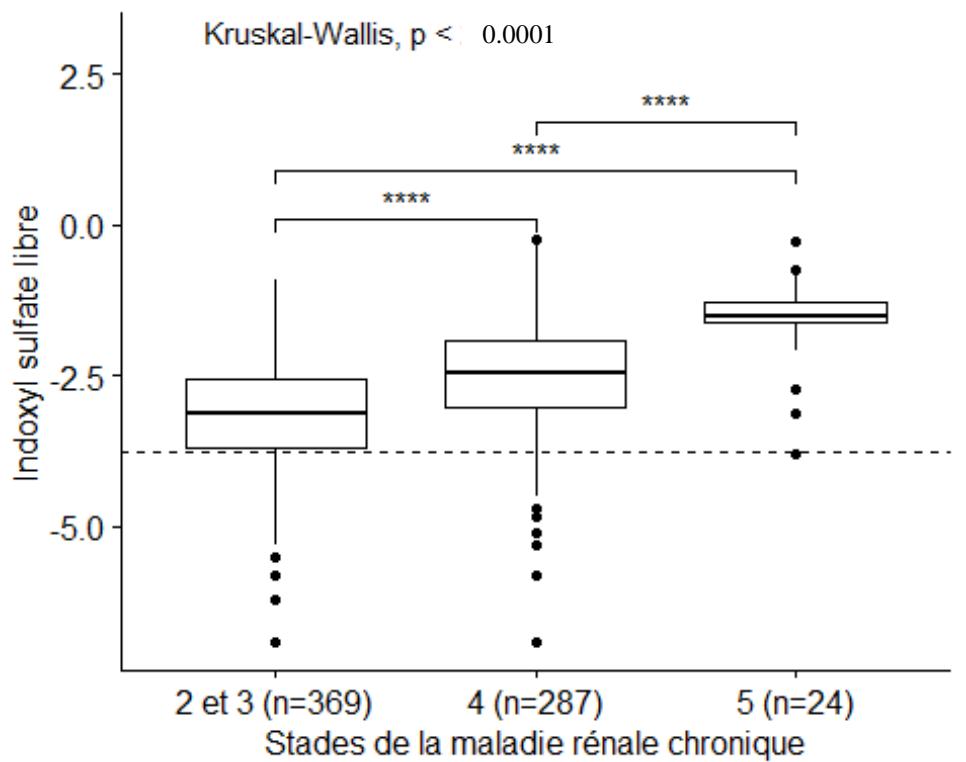
Antécédents de maladies cardiovasculaires	53,3%	52%	53,6%	0,52
NA	42	4	38	
Albuminémie (g/L)	40,3 [38,0-43,0]	40,5 [37,8-43]	40,2 [38,0-43,0]	0,91
NA	489	94	395	
Hémoglobine (g/dL)	13 (1,65)	13,1 (1,64)	12,9 (1,65)	0,07
NA	23	4	19	
CRP (mg/L)	2 [1-6]	2 [1-6]	3 [1-6]	0,92
NA	356	0	356	
Indice de masse corporelle (kg/m²)	27,8 [24,6- 31,8]	28 [25,2-31,4]	27,8 [24,5- 31,9]	0,56
NA	65	8	57	
Prescription d'IPP à l'inclusion	32,8%	31%	33,3%	0,25
NA	7	0	7	
Nombre total de médicaments	8 [5-10]	8 [5-10]	8 [5-10]	0,36
NA	9	2	7	

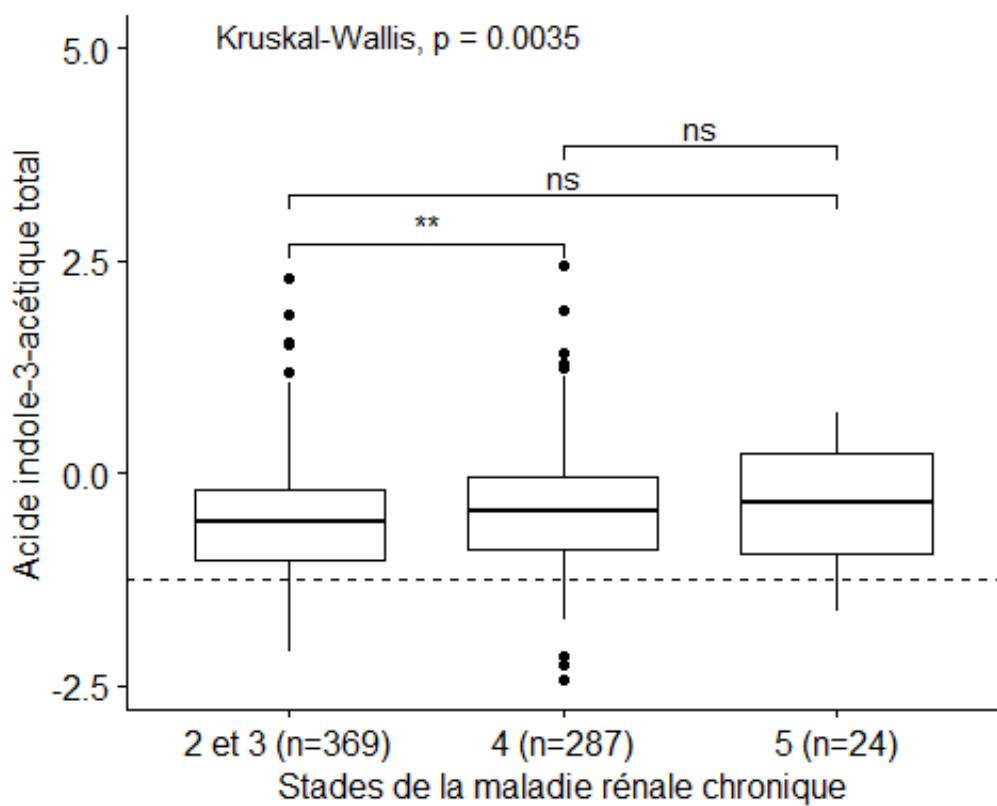
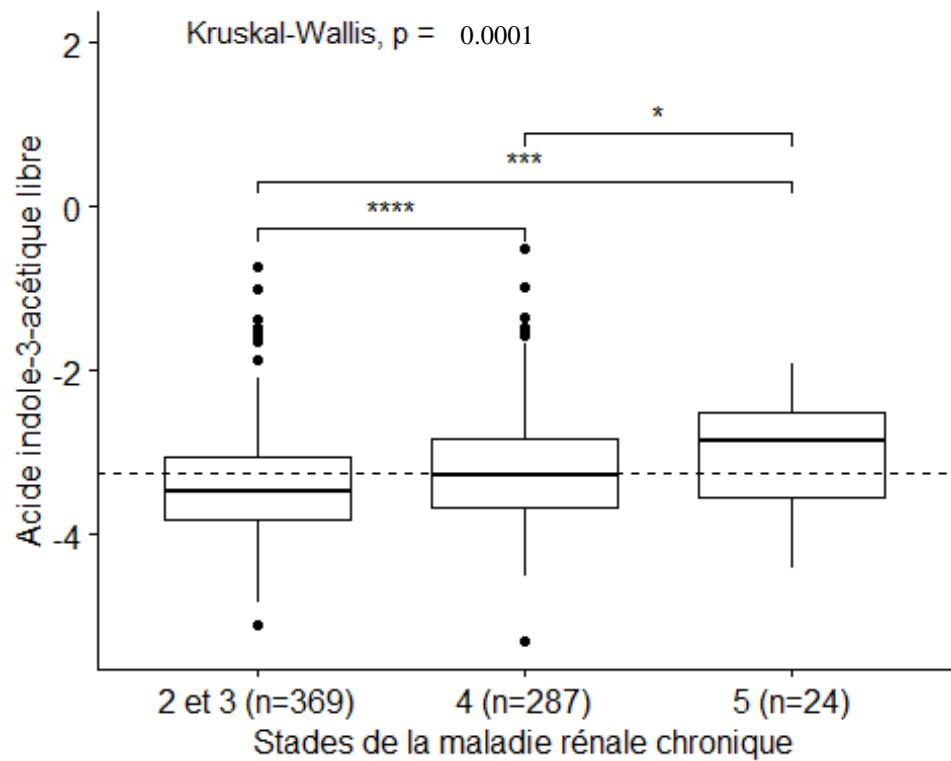
¹ Médiane [Q1-Q3] ou moyenne (écart type) ; %.

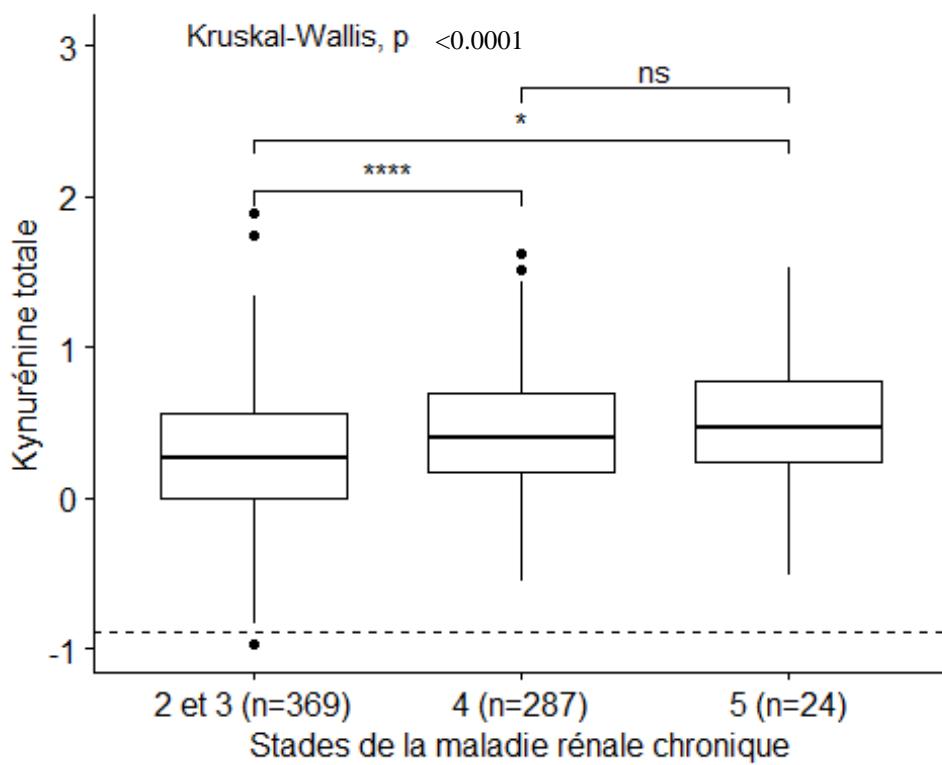
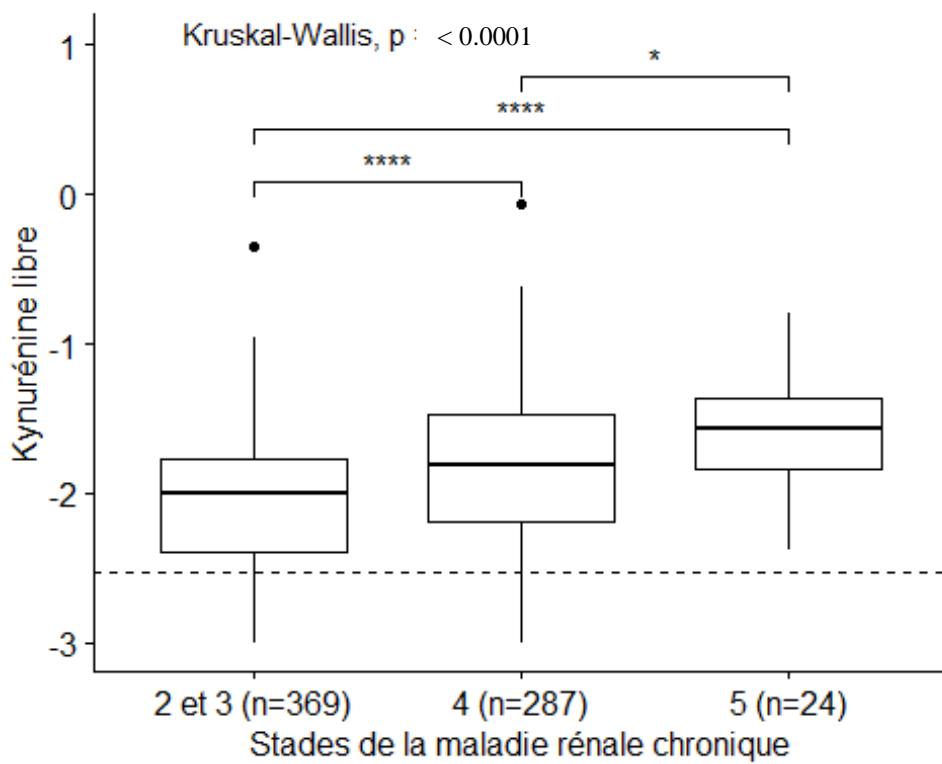
² Test de somme de rangs de Wilcoxon ; test de khi-deux.

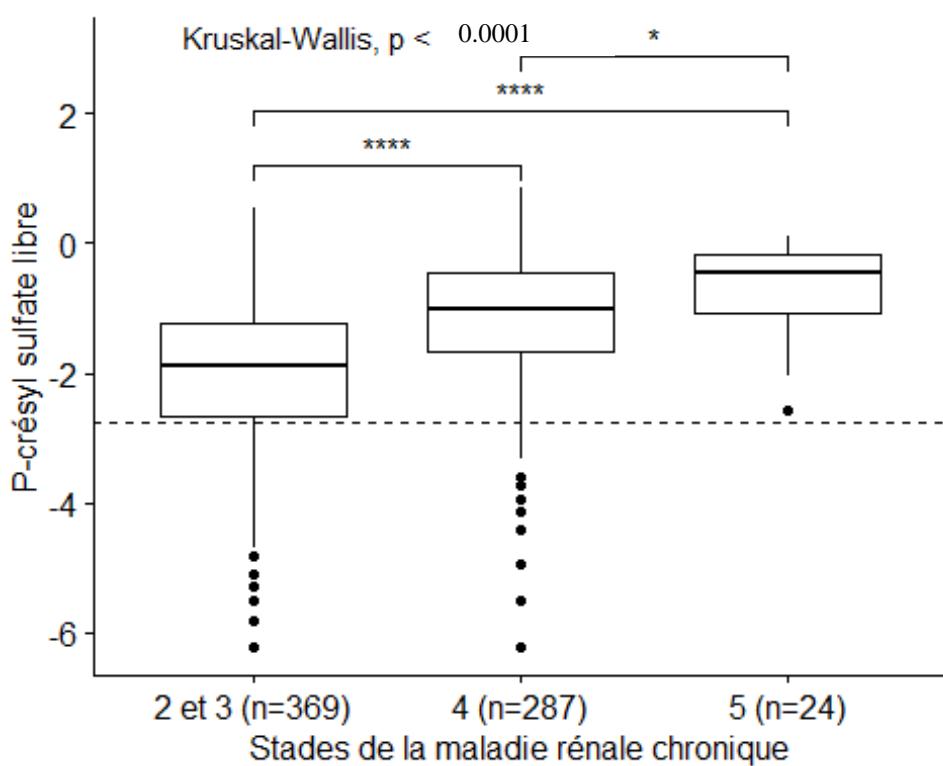
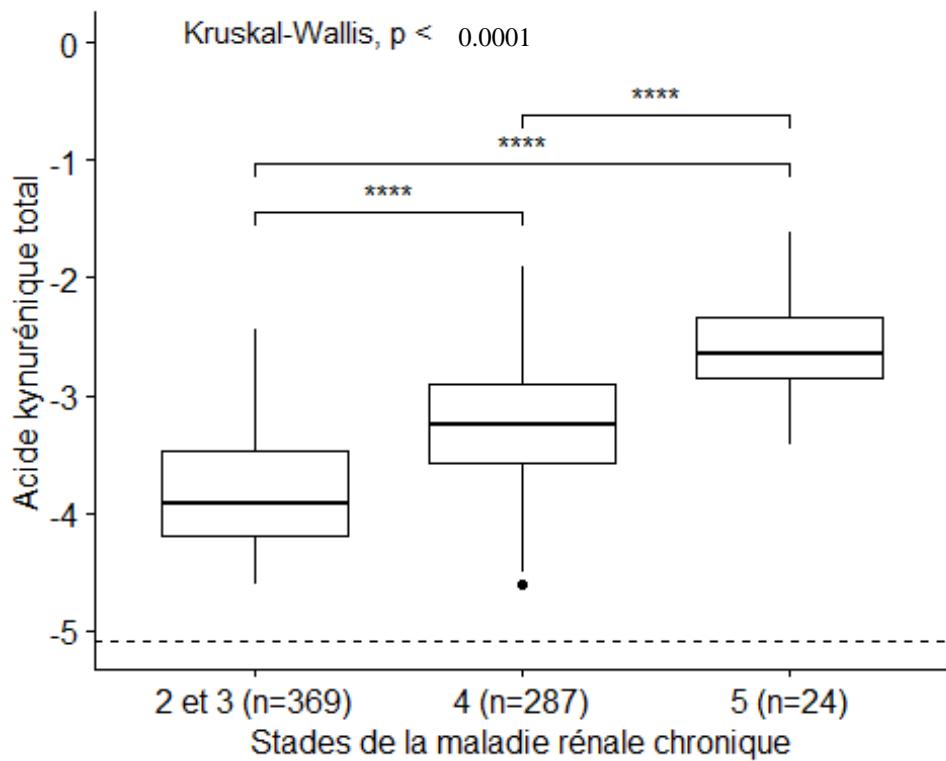
DFGe: débit de filtration glomérulaire estimé; CRP: protéine C-réactive; IPP: inhibiteurs de pompe à protons; NA: données manquantes.

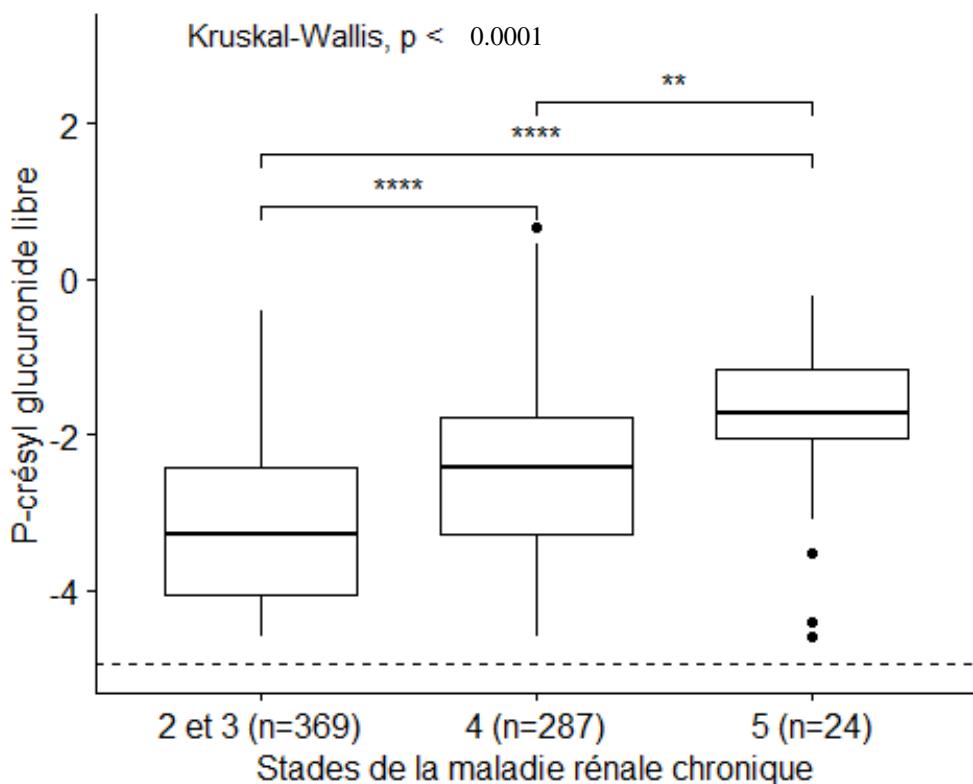
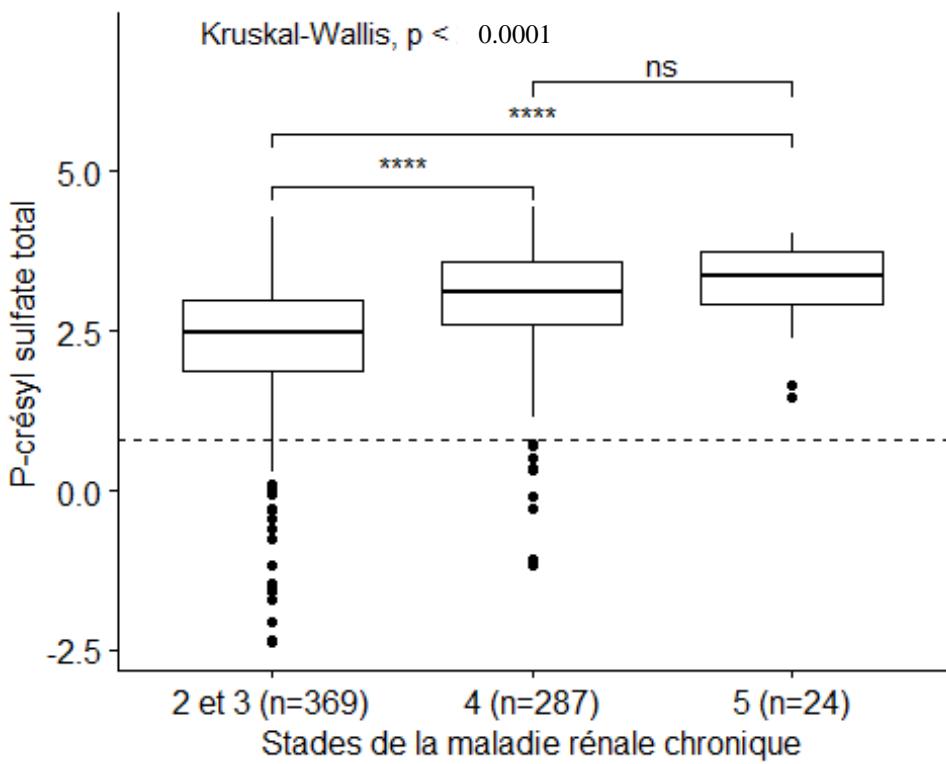
Annexe 17 : Distribution des toxines urémiques log normalisées en fonction des stades de la maladie rénale chronique

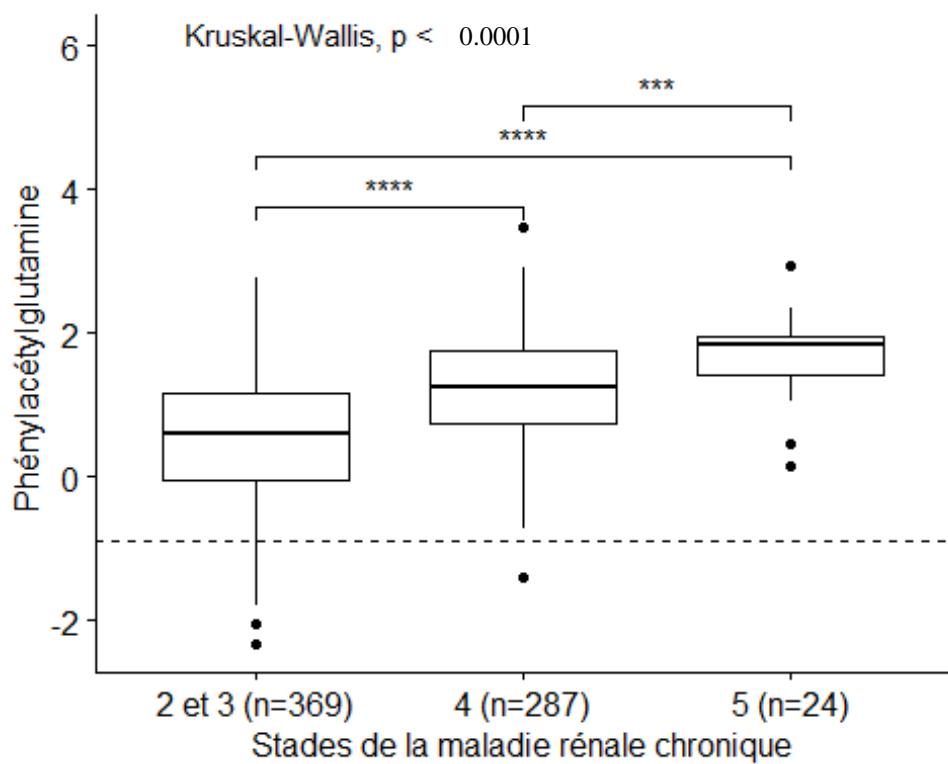
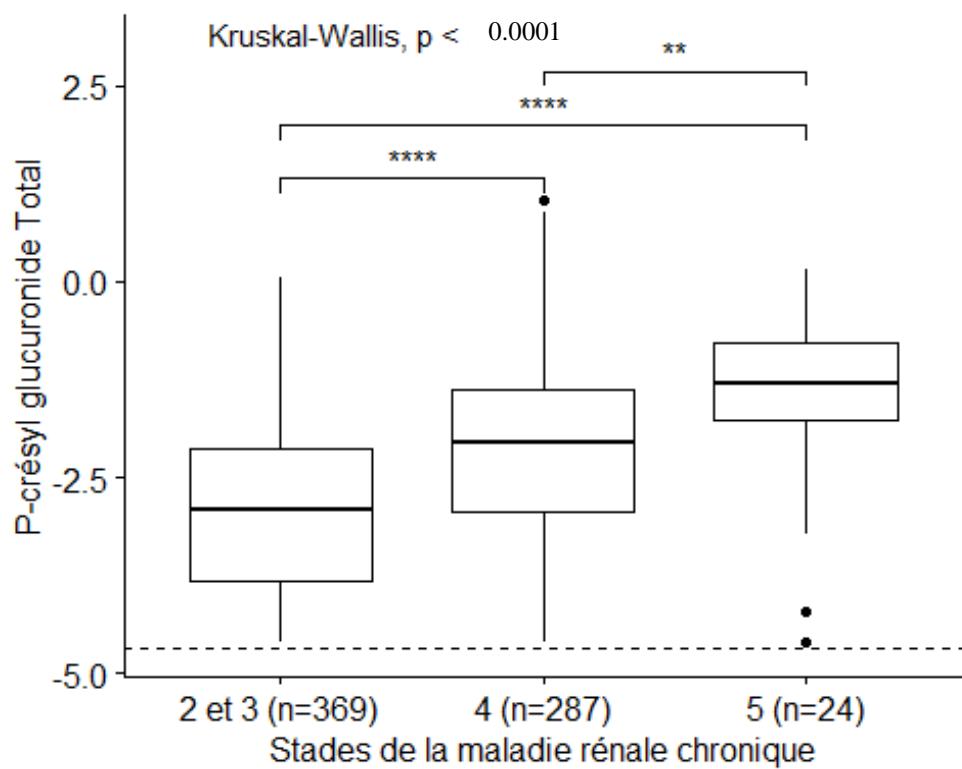


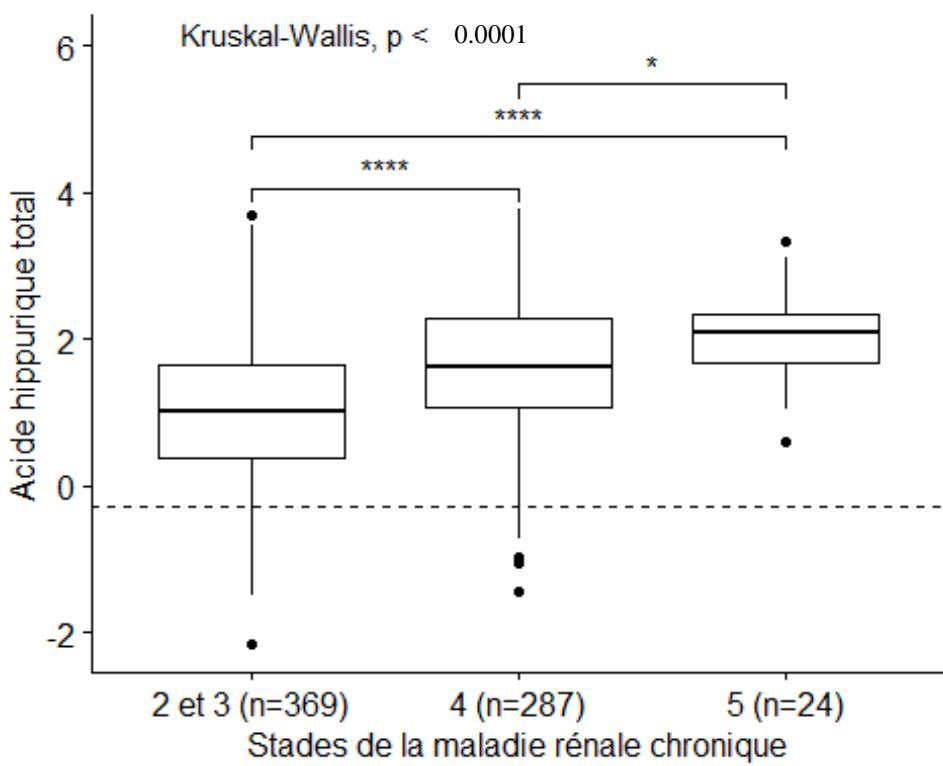
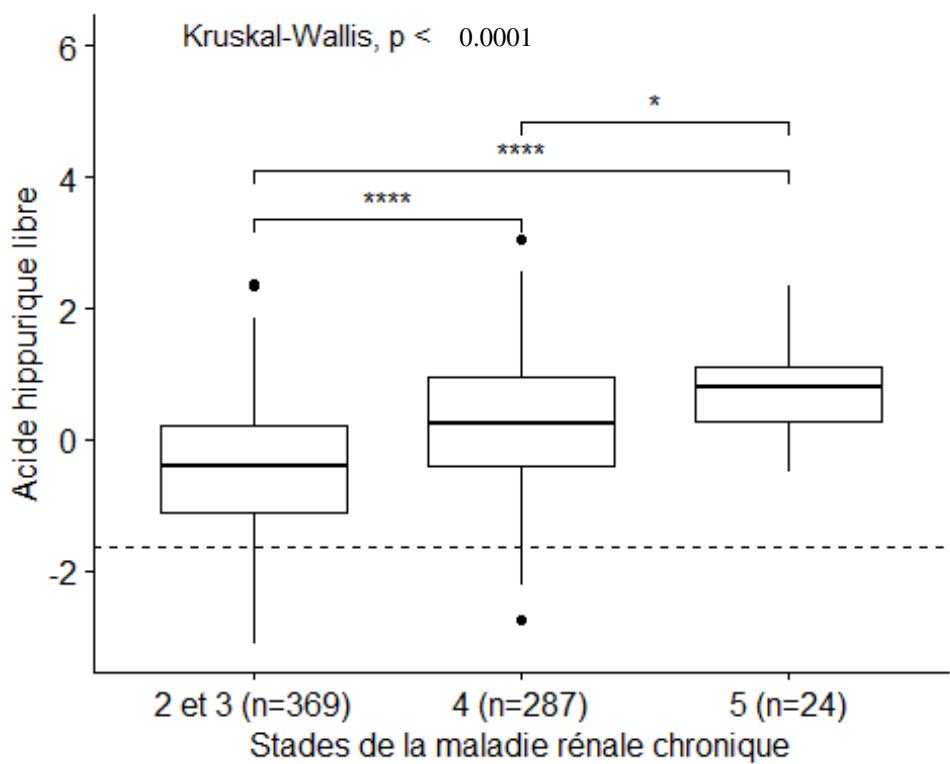


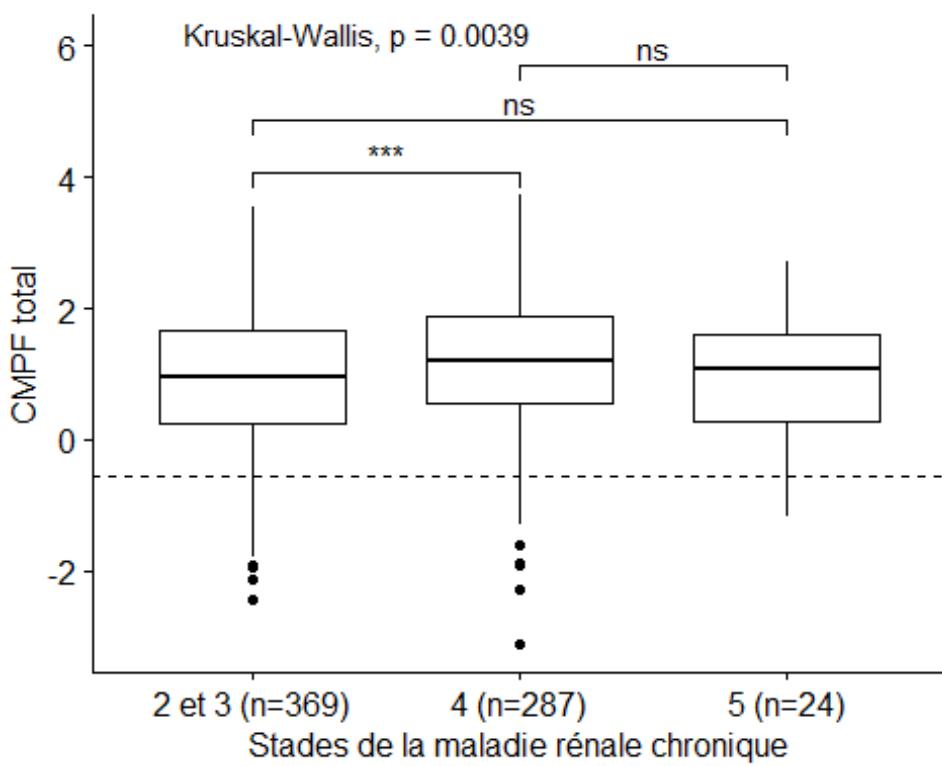
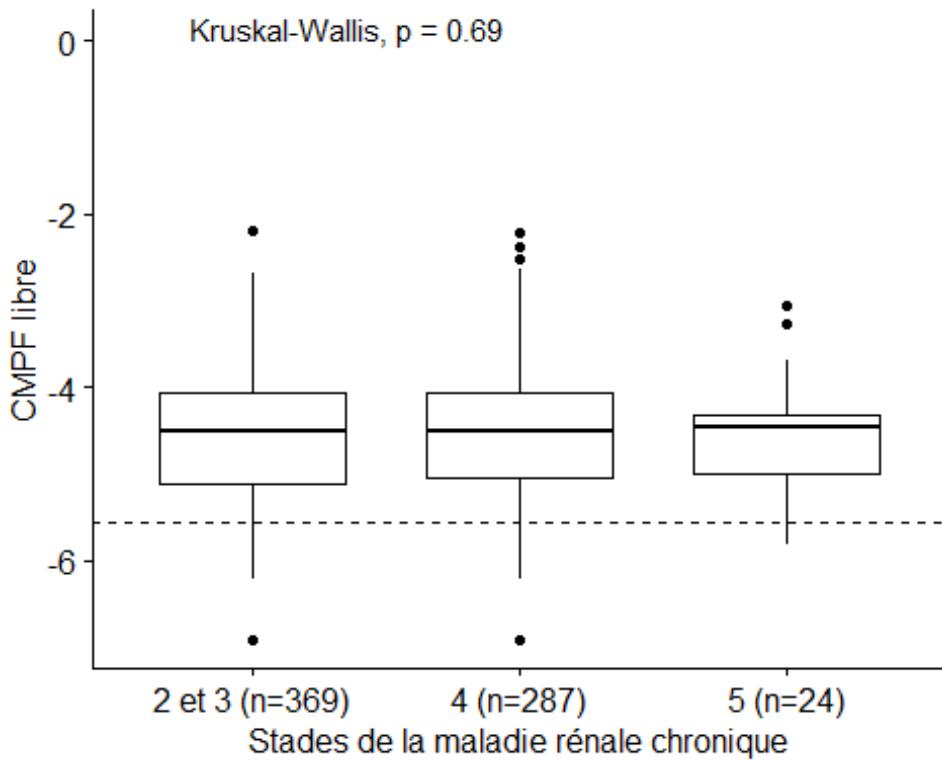


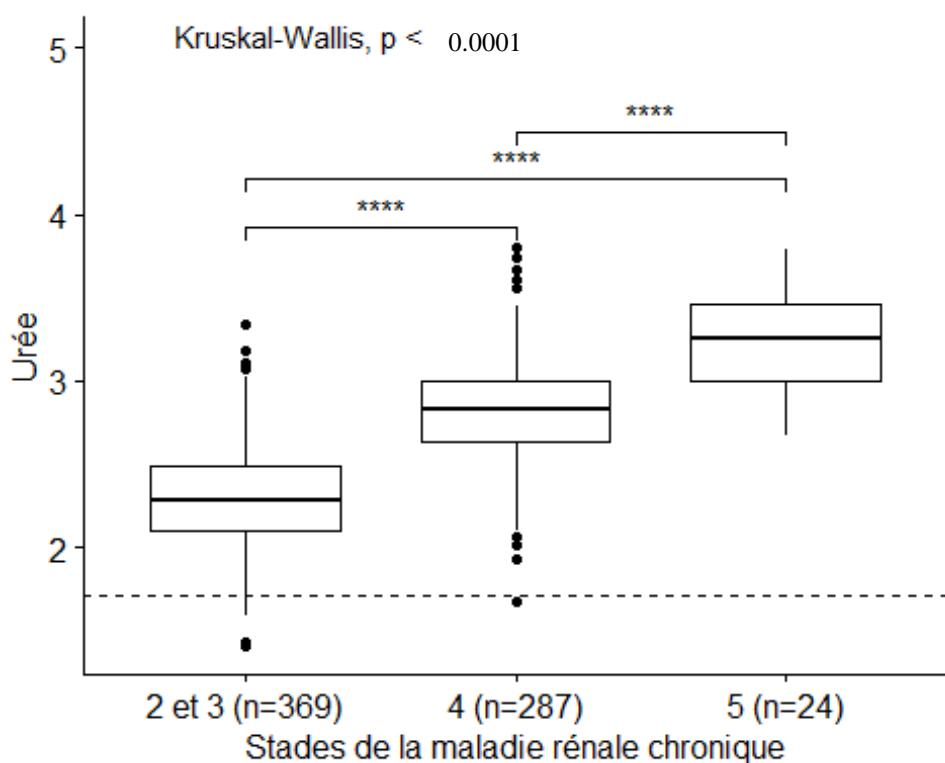
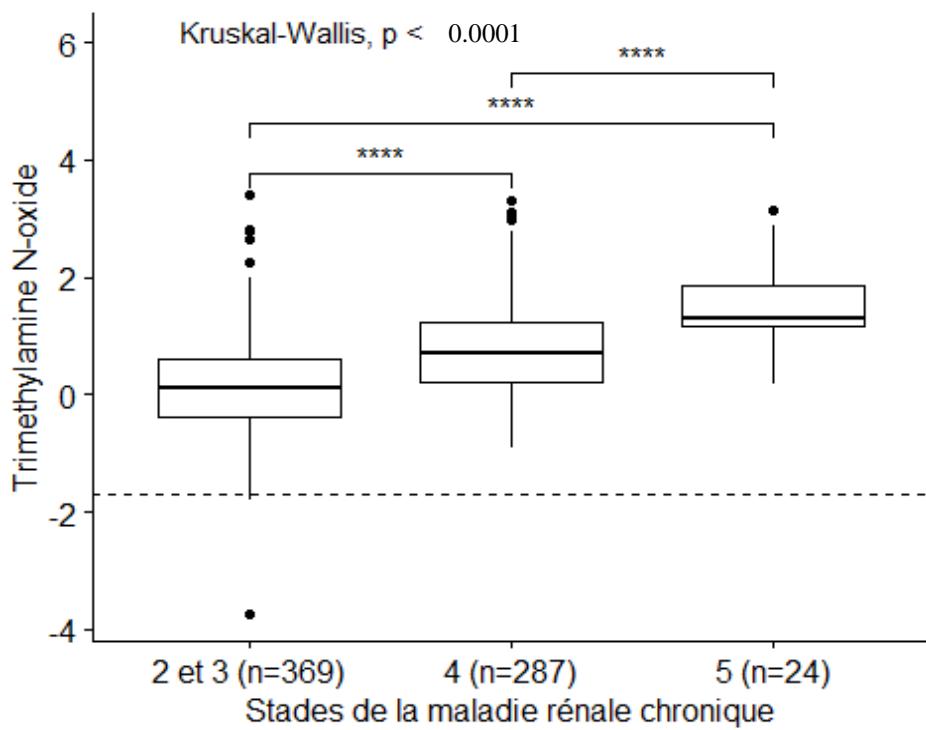












La ligne pointillée indique la valeur de référence pour les sujets sains.

P Valeurs : ns : non significatif ; * : $<0,05$; ** : $<0,01$; *** : $<0,001$; **** : $<0,0001$.

Annexe 18 : Distribution des toxines urémiques log-normalisées en fonction de l'utilisation d'inhibiteurs de pompe à protons

