



Thèse

2020

Open Access

This version of the publication is provided by the author(s) and made available in accordance with the copyright holder(s).

Dépistage précoce de l'atteinte rénale dans la polykystose rénale autosomique dominante de l'enfant

Tsingos, Marianthi

How to cite

TSINGOS, Marianthi. Dépistage précoce de l'atteinte rénale dans la polykystose rénale autosomique dominante de l'enfant. Doctoral Thesis, 2020. doi: 10.13097/archive-ouverte/unige:142873

This publication URL: <https://archive-ouverte.unige.ch/unige:142873>

Publication DOI: [10.13097/archive-ouverte/unige:142873](https://doi.org/10.13097/archive-ouverte/unige:142873)

Section de médecine clinique
Département de la femme, de l'enfant et de
l'adolescent
Service de néphrologie pédiatrique

Thèse préparée sous la direction de la Professeure Paloma PARVEX

**" Dépistage précoce de l'atteinte rénale dans la polykystose rénale
autosomique dominante de l'enfant."**

Thèse

présentée à la Faculté de Médecine
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de Docteur en médecine
par

Marianthi TSINGOS

Originaire de

Gland (Vaud)

Thèse n° 10995

Genève

2020



**UNIVERSITÉ
DE GENÈVE**

FACULTÉ DE MÉDECINE
Secrétariat des étudiants



DOCTORAT EN MEDECINE

Thèse de :

Marianthi TSINGOS

originaire de Gland (VD), Suisse

Intitulée :

Dépistage précoce de l'atteinte rénale dans la polykystose rénale autosomique dominante de l'enfant

La Faculté de médecine, sur le préavis du Comité directeur des thèses, autorise l'impression de la présente thèse, sans prétendre par-là émettre d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 25 mai 2020

Thèse n° **10995**

Cem Gabay

Doyen

N.B. - La thèse doit porter la déclaration précédente et remplir les conditions énumérées dans les "Informations relatives à la présentation des thèses de doctorat à l'Université de Genève".

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	4
Généralités.....	4
Diagnostic	4
Aspects génétiques	5
Concepts de physiopathologie.....	6
Atteinte rénale et ADPKD en pédiatrie	10
Traitements et marqueurs actuels de la maladie.....	11
Suivi actuel à Genève des enfants ADPKD	12
NGAL	13
Objectifs de l'étude	14
ARTICLE ORIGINAL	15
Abstract.....	16
Introduction.....	17
Materials and methods	20
Results	22
Discussion.....	25
Conclusion	30
References	32
Legends to Tables and Figures	36
DISCUSSION GENERALE	42
BIBLIOGRAPHIE	47

RESUME

La polykystose rénale autosomique dominante (ADPKD) est une maladie génétique monogénique affectant jusqu'à 1/500 individus. L'ADPKD est responsable d'environ 10% des insuffisances rénales terminales (IRT).

Jusqu'à récemment, l'ADPKD était considéré comme une maladie de l'adulte. Cependant, depuis une vingtaine d'années, les progrès des échographies anténatales ainsi qu'une meilleure identification des familles avec ADPKD, ont conduit à une augmentation des diagnostics prénataux et pédiatriques, nécessitant la mise en place d'un suivi médical des enfants avec ADPKD par le pédiatre ou le néphrologue pédiatre. Comment suivre ces enfants chez qui la maladie est peu symptomatique, et qui ont pendant l'enfance une fonction rénale normale ? En effet aucun des marqueurs actuels du suivi n'est spécifique et ne permet un dépistage précoce de la progression de la maladie.

La protéine NGAL, est un marqueur tubulaire présent dans les urines qui a montré son intérêt dans diverses situations cliniques avec une valeur augmentée précocement lors d'insuffisance rénale aiguë ou de polykystose familiale chez l'adulte. Son rôle dans la physiopathologie des kystes est encore peu clair mais son augmentation précoce dans les urines lors d'une atteinte rénale, lui confère un potentiel de marqueur urinaire de l'atteinte rénale.

Le but de notre étude était d'étudier l'intérêt du NGAL urinaire (NGALu) comme marqueur précoce de l'atteinte rénale chez des enfants avec un diagnostic d'ADPKD comparé à un groupe contrôle, et d'évaluer son apport clinique comparé aux autres examens actuellement utilisés pour le suivi que sont la protéinurie, l'albuminurie et la tension artérielle moyenne. Nous l'avons par ailleurs également comparé au volume rénal total calculé à l'échographie rénale (TKV) puisque ce dernier est un marqueur de progression de la maladie chez l'adulte.

Notre étude a permis de démontrer l'absence d'intérêt du NGALu comme marqueur précoce de l'atteinte rénale dans une population pédiatrique atteinte d'ADPKD. Nous avons cependant mis en évidence une corrélation significative entre le TKV et les autres marqueurs de suivi de la maladie tels que la protéinurie, l'albuminurie et la tension artérielle moyenne, lui conférant un potentiel de marqueur de progression de la maladie aussi chez l'enfant.

INTRODUCTION

Généralités

La polykystose rénale autosomique dominante (*Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease*, le plus souvent abrégé par l'acronyme ADPKD qui sera utilisé ici) est une maladie génétique monogénique affectant jusqu'à 1/500 individus dans le monde (Cadnapaphornchai, 2015). Cette maladie représente 5-10% des insuffisances rénales terminales (IRT) (Cadnapaphornchai, 2015; Lespinasse et al., 2006).

L'ADPKD se caractérise principalement par le développement de kystes rénaux bilatéraux qui naissent des tubules et conduisent progressivement à l'altération de la fonction rénale. Cependant, le développement des kystes s'étend également à d'autres organes, comme le foie, le pancréas, le cerveau ou le cœur. La formation de kystes hépatiques et pancréatiques concerne respectivement 73% et 10% des cas d'ADPKD (Lespinasse et al., 2006). Les atteintes cardiovasculaires sont une cause majeure de morbidité et mortalité chez les patients atteints d'ADPKD. L'hypertension artérielle (HTA) notamment est un symptôme fréquent de la maladie. Elle est associée à une hypertrophie ventriculaire gauche chez près de la moitié des patients (Eckert and Schrier, 2009). La prévalence d'anévrismes et valvulopathies est plus fréquente que dans la population générale. Parmi ces dernières, on retrouve 26% de prolapsus de la valve mitrale et 13% d'insuffisance mitrale de grade 2 et 3 chez les patients ADPKD (Cadnapaphornchai, 2015; Lumiaho et al., 2001). Le développement d'anévrismes cérébraux concerne 4-10% des ADPKD (Sessa et al., 1997) et son incidence augmente avec l'âge.

Diagnostic

Le diagnostic d'ADPKD est posé en présence de kystes rénaux bilatéraux chez un sujet à risque (c.à.d. dont l'un des parents est atteint de la maladie). Il repose essentiellement sur l'échographie rénale en raison de son accessibilité, faible coût et efficacité, avec 100% de spécificité et 67-95% de sensibilité, dépendamment de la mutation génétique sous-jacente (Nicolau et al., 1999). Les kystes rénaux unilatéraux étant rares, la présence d'un seul kyste à l'échographie chez un enfant avec une anamnèse familiale positive, est suffisante au diagnostic (Reddy and Chapman, 2017). L'absence de kyste durant l'enfance ne permet pas d'exclure la maladie puisque les kystes apparaissent progressivement avec le temps. Dans leur

étude longitudinale réalisée sur 15 ans, incluant 312 enfants dont 185 atteints d'ADPKD, Fick-Brosnahan et collègues ont montré un âge moyen de 9.2 ± 0.4 ans avec échographie rénale positive à la première visite. Parmi les 19 enfants sans kystes rénaux à la première échographie et dont l'âge moyen était alors de 6.2 ± 1 an, 3 ont gardé une échographie rénale normale durant le suivi mais présentaient un test génétique positif et 16 ont présenté l'apparition de kystes rénaux aux ultrasons de suivi avec un âge moyen de 9.3 ± 1 an (Fick-Brosnahan et al., 2001). Le développement des techniques d'ultrason a par ailleurs conduit à des diagnostics pédiatriques précoces et même prénataux. Dans leur étude parue en 2005, Shamshirsaz et collègues ont suivi 46 enfants ayant bénéficié d'un diagnostic avant l'âge de 18 mois sur un total de 199 enfants ADPKD (soit 23%), dont 6 (soit 0.3%) chez qui le diagnostic était prénatal (Shamshirsaz et al., 2005).

Aspects génétiques

Les deux gènes à avoir été identifiés dans cette maladie sont les gènes PKD1 et PKD2, codant respectivement pour les protéines polycytine-1 (PC1) et polycytine-2 (PC2), et respectivement localisés sur les chromosomes 16 et 4. Les mutations du gène PKD1 concernent 78% des cas d'ADPKD alors que les mutations du gène PKD-2 uniquement 13% des cas (Torres et al., 2007). Bien que l'ADPKD soit la plus fréquente des maladies héréditaires monogéniques du rein, dans de rares cas il s'agit de mutations génétiques dites *de novo* (Audrézet et al., 2012; Reed et al., 2008) qui en sont l'origine. Par ailleurs, aucune mutation génétique n'est retrouvée dans 9% des cas d'ADPKD. Il n'est à ce jour pas clair si cette absence de mutation génétique retrouvée est due à des mutations encore inconnues des deux loci connus ou s'il existe un troisième locus (Harris and Torres, 2014). Concernant les mutations PKD1, approximativement 65% des mutations codent pour une protéine tronquée contre 35% de protéines non tronquées. En ce qui concerne les mutations PKD2, on retrouve 87% de protéines tronquées. Approximativement 3% des mutations ADPKD sont dues à de larges réarrangements impliquant des délétions ou duplications d'au moins un exon (Harris and Torres, 2014).

Les mutations PKD1 sont associées à une atteinte rénale plus précoce et sévère. En effet, l'IRT survient à un âge moyen de 54 ± 3 ans pour les mutations PKD1 versus 74 ans pour les mutations PKD2 (Hateboer et al., 1999; Torres et al., 2007). Par ailleurs, une variabilité significative intra- et inter- familiale dans la sévérité de l'expression des atteintes rénales et extra-rénales a été observée, impliquant certainement des facteurs modificateurs génétiques et

environnementaux (Torres et al., 2007). Bien que chaque cellule rénale des patients ADPKD soit porteuse de la mutation, seul un petit pourcentage du nombre total de cellules de chaque néphron devient kystique. Ajouté à cela et comme précédemment dit, l'expression de la maladie varie entre deux individus d'une même famille. L'une des hypothèses avancée pour expliquer ceci est portée par le modèle du « 2-hit » (Eccles and Stayner, 2014; Harris and Torres, 2014). Dans ce dernier, les kystes se forment uniquement après la perte du deuxième allèle du gène muté. La première mutation est donc germinale alors que la deuxième (« 2nd hit ») est somatique et donc acquise. Par ailleurs, une pénétrance incomplète du gène muté pourrait contribuer à expliquer la variabilité du phénotype inter-individuel. Une autre hypothèse récemment avancée est celle du développement des kystes en dessous d'un certain seuil de production de la protéine. L'atteinte de ce seuil serait donc le résultat de plusieurs phénomènes que sont l'acquisition d'une deuxième mutation (mutation somatique) dans la cellule, l'expressivité variable du gène muté entre les individus, les différences stochastiques dans l'expression du gène entre les cellules ainsi que des facteurs environnementaux (Harris and Torres, 2014). Le développement des kystes est donc un processus dynamique.

Le nombre de kystes étant plus importants et l'âge d'apparition plus précoce, l'ADPKD dû à des mutations du gène PKD-1 concerne la vaste majorité des patients pédiatriques (Reddy and Chapman, 2017).

Concepts de physiopathologie

Dans l'ADPKD, les milliers de kystes sphériques et plus ou moins larges dérivent de chaque segment du néphron, à travers le cortex et la medulla. La paroi des tubules, bordée d'une simple couche de cellules épithéliales, se développe et croît avant de se refermer au point d'origine (Wilson, 2004).

a) Protéines PC1, PC2 et cil primaire

La protéine PC1 est une large protéine (~600kDa) dont la structure est celle d'un récepteur ou d'une molécule d'adhésion (Harris and Torres, 2009). Elle comprend une large région transmembranaire formée de 11 domaines, une courte région intracellulaire (extrémité C-terminale) ainsi qu'une région extracellulaire (extrémité N-terminale), impliquée dans les interactions entre protéines ou entre protéines et carbohydrates. La protéine PC2, plus petite (~110kDa), est une protéine de 6 domaines transmembranaires et de domaines intracellulaires avec deux extrémités C- et N-terminales, jouant le rôle d'un canal cationique transporteur de

calcium (Wilson, 2004). PC1 et PC2 forment ensemble un complexe (PC) qui serait impliqué dans la régulation du calcium intracellulaire (Harris and Torres, 2014). Ces protéines semblent indispensables à la différenciation de l'épithélium tubulaire durant les derniers stades de néphrogenèse (Harris and Torres, 2014). Leur localisation comprendrait plusieurs sites dont les membranes cellulaires apicales et baso-latérales, impliquées dans les interactions entre cellules et cellule-matrice, ou encore le réticulum endoplasmique, principalement pour PC2. Il semble que le complexe PC joue principalement un rôle mécano-senseur, répondant à des signaux provenant de la matrice extra-cellulaire (via les adhésions focales), des cellules adjacentes (via les jonctions cellulaires) et de la lumière du tubule (via le cil primaire), les traduisant ensuite en messages intracellulaires responsables de la prolifération, différenciation, migration, adhésion et maturation de la cellule, étapes essentielles au contrôle du diamètre tubulaire et à la morphogenèse rénale (Wilson, 2004). Cependant le site avancé le plus convaincant, associant le complexe à la maladie kystique, est celle du cil primaire, faisant de l'ADPKD une ciliopathie (Harris and Torres, 2009, 2014). La fonction précise du complexe PC sur le cil primaire reste encore très débattue.

Le cil primaire est une organelle existant dans presque tous les types cellulaires et comprenant plusieurs formes, dont l'une est retrouvée dans les cellules du tubule rénal. Sa fonction principale pourrait être comparée à celle d'une antenne de la cellule, essentielle dans les voies de signalisation intracellulaire et répondant à divers stimuli impliqués dans l'interaction entre cellules et dans la réponse de la cellule à son environnement. Il semble être chémo-, mécano- et photo-senseur. Au niveau rénal, le cil primaire s'étend de la surface apicale de l'épithélium tubulaire jusque dans la lumière. Il a été démontré que la perte du complexe PC altère la réponse ciliaire aux différents stimuli, entravant ainsi sa fonction (Yoder, 2007). Le rôle exact du cil primaire dans la kystogenèse n'est toutefois pas encore complètement compris. Il a été suggéré que le complexe PC sur le cil primaire fonctionne au niveau rénal comme un détecteur de débit, inhibant l'influx de calcium intracellulaire en l'absence de débit ou en cas de perte du complexe PC. Les propriétés nano-mécaniques du domaine extracellulaire de PC1 corroborent cette théorie. Une dysrégulation dans le mouvement de calcium intracellulaire altère différentes voies de signalisation intracellulaires conduisant à une prolifération et sécrétion altérée de la cellule, caractéristiques principales des cellules rénales kystiques (Harris and Torres, 2014). Par ailleurs, de récentes études animales ont mis en évidence chez la souris avec inactivation de PKD1 et PKD2 au niveau rénal, une maladie kystique moins sévère lorsque l'ablation du cil primaire était ajoutée à la perte des protéines

PC1 et PC2 (Ma et al., 2013). Ceci suggère un probable rôle régulateur du complexe PC sur le cil primaire et l'implication, encore inconnue de ce dernier, dans la kystogénèse.

b) Voies de signalisation intracellulaires et cibles thérapeutiques

Les cellules rénales kystiques présentent une homéostasie calcique perturbée avec un calcium intracellulaire diminué, renforçant l'hypothèse du complexe PC comme régulateur du calcium intracellulaire au niveau du cil primaire de la cellule tubulaire. Cette baisse du calcium intracellulaire pourrait être à l'origine de l'augmentation de l'AMP cyclique (cAMP), observée dans les modèles animaux avec maladie rénale polykystique (PKD) (Harris and Torres, 2009). L'augmentation du cAMP entraîne une cascade d'activation de différentes voies de signalisation intracellulaires, avec notamment une activation de la protéine kinase A (PKA), conduisant au développement et à la croissance des kystes. Les progrès dans la compréhension de ces différentes voies a conduit au développement de cibles thérapeutiques dirigées directement contre la croissance des kystes, dont nous énumérerons ici les principales. La vasopressine via son récepteur V₂ est connue pour jouer un rôle dans la régulation du cAMP au niveau du néphron distal et tubule collecteur, sites majeurs de développement des kystes dans l'ADPKD (Harris and Torres, 2009). Basé sur ces constatations, le Tolvaptan, un antagoniste du récepteur V₂ à la vasopressine a été développé et est à ce jour le traitement le plus prometteur de l'ADPKD, déjà administré chez l'adulte dans plusieurs pays (Mustafa and Yu, 2018). Une autre voie de signalisation importante est celle de la somatostatine entraînant via l'activation de sa protéine couplée Gi, une diminution du cAMP. Bien que plusieurs essais cliniques de phase 2 et un plus petit essai clinique de phase 3 (Caroli et al., 2013) aient montré des résultats intéressants de l'utilisation d'analogues de la somatostatine sur la fonction rénale et le volume rénal, leur utilisation semble limitée par leurs effets secondaires (Müller and Benzing, 2018). La voie de signalisation du mTOR (*mammalian target of rapamycin kinase*) est également une voie de signalisation intracellulaire qui semble promouvoir la formation des kystes et la progression de la maladie. Plusieurs essais cliniques ont été conduits sur l'utilisation des inhibiteurs du mTOR. Cependant, ajouté à un profil de toxicité important, les résultats sont à ce jour décevants avec notamment une absence de ralentissement de la perte de la fonction rénale. D'autres essais cliniques ciblant la protéine kinase via des inhibiteurs de celle-ci ou l'utilisation d'inhibiteurs de la glucosylceramide synthase ont récemment été publiés ou sont actuellement en cours de recrutement (Müller and Benzing, 2018).

c) Prolifération et apoptose

La croissance et la différenciation des reins tout comme le maintien d'une structure rénale normale après la naissance, dépendent d'un équilibre très fin entre prolifération et apoptose cellulaire. Cet équilibre est perturbé dans l'ADPKD. L'apoptose est en effet présente de façon incontrôlée, détruisant le parenchyme normal du rein et permettant ainsi la prolifération et le développement des kystes (Harris and Torres, 2014; Wilson, 2004). La prolifération des cellules épithéliales tubulaires cesse normalement avant la naissance, au contraire de l'épithélium kystique qui prolifère de manière incontrôlée tout au long de la vie du patient ADPKD (Wilson, 2004). L'augmentation et/ou l'expression altérée des facteurs de croissance et de leurs récepteurs, responsables du développement du bourgeon urétéral durant les derniers stades de la néphrogenèse, contribuerait beaucoup à la pathogenèse de la maladie. Le facteur de croissance EGF (*Epidermal Growth Factor*), tout comme d'autres facteurs de croissance de la même famille, jouerait en effet un rôle essentiel dans l'expansion des kystes (Harris and Torres, 2014; Wilson, 2004). Les cellules kystiques semblent en effet répondre de manière trop sensible au stimulus prolifératif de l'EGF. De plus, ajouté à la présence augmentée dudit facteur dans la lumière kystique, on retrouve également une expression augmentée des récepteurs à l'EGF par ailleurs anormalement localisés sur la face apicale de l'épithélium kystique, contribuant ainsi à la prolifération des kystes. D'autres facteurs de croissance, cytokines, facteurs lipidiques, adénosine tri-phosphate (ATP) et cAMP ont un effet proliférateur sur les cellules épithéliales kystiques (Wilson, 2004).

d) Sécrétion et polarité cellulaire

La réabsorption nette des fluides du rein normal se fait en suivant un gradient sodique établi par la pompe ionique $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATP}_{\text{ase}}$ au niveau de la membrane épithéliale tubulaire baso-latérale et par de multiples transporteurs ioniques et de fluides, localisés sur les membranes apicales et baso-latérales. Dans les reins ADPKD, la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATP}_{\text{ase}}$ est anormalement localisée sur la membrane apicale (c.-à-d. vers la lumière) des cellules épithéliales kystiques, comme l'est le co-transporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ localisé lui sur la surface basale de l'épithélium. Une autre caractéristique de l'épithélium kystique est celui de la présence des Aquaporines 1 et 2 à sa surface. Le taux élevé d'ATP libéré par la membrane apicale des cellules ADPKD, exacerberait encore cette sécrétion anormale (Wilson, 2004). Le néphron adulte normal est une structure segmentée, bordée d'au moins 15 types d'épithelia hautement polarisés. La distribution polarisée des enzymes, transporteurs et canaux ioniques, pores, facteurs de croissance et leurs récepteurs ainsi que les récepteurs responsables des interactions cellule-

cellule et cellule-matrice, facilite le transport directionnel normal, la division, la prolifération et la maturation normale des cellules. Dans l'ADPKD, cette polarisation est anormale et contribue au développement des kystes. La polarisation de toutes ces protéines a lieu durant la néphrogenèse. L'expression persistante de la forme fœtale de la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATP}_{\text{ase}}$ et des récepteurs EGF, suggère la présence d'un bloc dans le programme de maturation cellulaire (Wilson, 2004). Rappelons ici que le développement des kystes a lieu déjà in utero.

Atteinte rénale et ADPKD en pédiatrie

Jusqu'à récemment, l'ADPKD était considéré comme une maladie d'adultes. Cependant, le développement des techniques d'ultrasons a conduit à une augmentation des diagnostics prénataux et pédiatriques (De Rechter et al., 2017). De plus, excepté pour les anévrismes cérébraux et l'IRT, les manifestations cliniques peuvent survenir déjà tôt dans l'enfance.

Une atteinte de la capacité de concentration des urines touche environ 60% des enfants atteints d'ADPKD, déjà à un stade précoce de la maladie, précédant de plusieurs années le déclin du taux de filtration glomérulaire (*Glomerular Filtration Rate*, dont l'acronyme GFR sera utilisé ici) (De Rechter et al., 2017). Cette atteinte rénale précoce augmente le taux plasmatique de vasopressine qui semble elle-même participer au développement des kystes. De plus, cette incapacité de concentration maximale des urines entraînant une augmentation du taux plasmatique de vasopressine, pourrait contribuer à l'hyperfiltration glomérulaire, déjà observée dans l'enfance (Antignac et al., 2015; Torres et al., 2007). L'hyperfiltration glomérulaire (définie par 24h de clearance urinaire de la créatinine $>140\text{ml/min/1.73m}^2$) est associée à une diminution plus précoce du GFR ainsi qu'à une croissance plus rapide du volume rénal (Helal et al., 2011a).

La prévalence estimée de protéinurie et albuminurie chez les enfants atteints d'ADPKD est respectivement de 20% et 30% (Marlais et al., 2016; Reddy and Chapman, 2017). Tout comme dans la population adulte, il a été démontré que la protéinurie est associée à des changements rénaux structurels chez l'enfant (Fick-Brosnahan et al., 2001) ainsi qu'à une augmentation de la pression artérielle moyenne et du volume rénal, et une diminution du GFR (Chapman et al., 1994). Tant la protéinurie que l'albuminurie semblent associées à une maladie plus sévère (Chapman et al., 1994; Sharp et al., 1998) et de progression plus rapide (De Rechter et al., 2017).

L'HTA est une complication fréquente de l'ADPKD, qui précède souvent le stade d'insuffisance rénale chronique (Ong et al., 2015). La prévalence de l'HTA dans la population pédiatrique ADPKD est de 20% (Marlais et al., 2016). La pathogenèse sous-jacente n'est pas encore complètement comprise mais la progression des kystes et l'augmentation du volume rénal semblent être des facteurs clefs. Dans leur étude portant sur 62 enfants atteints d'ADPKD, Seeman et al. ont montré une corrélation entre l'HTA et le nombre et volume des kystes (Seeman et al., 2003a). L'HTA est par ailleurs associée à une diminution progressive plus rapide du GFR (Cadnapaphornchai, 2015; Cadnapaphornchai et al., 2009a). Dans leur étude portant sur 199 enfants avec ADPKD dont 46 avec diagnostic précoce (c.-à-d. <18mois et in utero), Shamshirsaz et collègues ont montré une moins bonne fonction rénale lorsque ajustée pour l'âge, un plus grand volume rénal, une augmentation de l'index de masse ventriculaire gauche et plus de cas d'hypertension chez les enfants avec diagnostic précoce (Shamshirsaz et al., 2005)

Traitements et marqueurs actuels de la maladie

Le développement des techniques d'ultrason a conduit à une augmentation des diagnostics prénataux et du petit enfant (De Rechter et al., 2017). Le dépistage, diagnostic et suivi précoce des enfants à risque confrontent les pédiatres au manque de marqueurs spécifiques de la maladie, nécessaires à l'élaboration de guidelines dans le suivi de ces enfants. Nous disposons en effet de peu d'outils pour, par exemple, décider de l'introduction précoce d'un traitement néphro-protecteur qui puisse prévenir ou ralentir la progression vers l'IRT et les autres complications extra-rénales. Ce dernier point soulève non seulement la problématique des traitements mais également du développement de marqueurs précoces de la fonction rénale.

Le contrôle de la tension artérielle est essentiel dans la prise en charge de toute néphropathie chronique. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) sont largement utilisés en pédiatrie dans la prévention de l'atteinte de la fonction rénale. Ils sont connus pour augmenter le débit sanguin rénal et avoir des propriétés néphroprotectrices. Ils sont par ailleurs associés à peu d'effets secondaires (Torres et al., 2007). En l'absence de marqueur précoce de la fonction rénale, ils sont principalement utilisés en cas d'HTA. Des études récentes ont mis en évidence un certain intérêt dans l'utilisation des statines dans l'ADPKD, leur conférant la capacité de prévenir l'atteinte rénale structurelle chez les enfants atteints d'ADPKD (Cadnapaphornchai et al., 2014).

Le Tolvaptan, un antagoniste du récepteur V_2 à la vasopressine, a montré chez l'adulte un ralentissement de la croissance annuelle du volume rénal ainsi que du déclin de la fonction rénale (Torres et al., 2011). Il s'agit, comme précédemment dit, du traitement le plus prometteur à ce jour de l'ADPKD, déjà administré chez l'adulte dans plusieurs pays (Mustafa and Yu, 2018). Ce traitement n'a cependant pas encore été testé dans une population pédiatrique. Au jour d'aujourd'hui, il n'existe pas de traitement curatif connu.

Les marqueurs urinaires (albuminurie et protéinurie) et sanguins (créatine) actuels utilisés dans l'évaluation de l'atteinte et de la fonction rénale interviennent tardivement dans l'évolution de la maladie. Le taux estimé de filtration glomérulaire (eGFR) basé sur la valeur de créatinine sanguine est, par exemple, d'utilité limitée en pédiatrie puisqu'il diminue essentiellement à l'âge adulte. En effet le GFR est le plus souvent normal chez les enfants atteints d'ADPKD (Fick et al., 1994; Karava et al., 2018). L'albuminurie et la protéinurie, utilisées de façon standardisée dans le suivi des patients pédiatriques, ne sont pas toujours présentes à un stade précoce de la maladie. Il est donc nécessaire de trouver de nouveaux marqueurs spécifiques à l'ADPKD et associés à une atteinte précoce de la fonction rénale chez les malades.

L'utilité du volume rénal total (en anglais : Total Kidney Volume, dont l'acronyme TKV est utilisé ici) comme marqueur non seulement de la progression de la maladie mais également de l'efficacité thérapeutique, a récemment été démontrée (Alam et al., 2015; Chapman et al., 2003; Grantham et al., 2006a, 2006a, 2006b; Perrone et al., 2017). Plusieurs types d'imagerie peuvent être utilisés pour mesurer le TKV, dont l'IRM, le CT-scan ou l'ultrason. Une mesure standardisée simple et non invasive utilise l'ultrason pour estimer le TKV à l'aide de la formule ellipsoïde [volume rénal = hauteur $\times$ diamètre transverse $\times$ épaisseur $\times (\pi/6)$] (Hwang et al., 2011). Il a été démontré que les mesures échographiques du TKV comparées aux mesures par IRM ne sont pas appropriées dans l'évaluation de la progression de la maladie à court terme mais suffisantes pour estimer le volume rénal, reflet de la sévérité de la maladie (O'Neill et al., 2005).

Suivi actuel à Genève des enfants ADPKD

Le suivi habituel à Genève des enfants chez qui un diagnostic d'ADPKD est posé comprend une consultation annuelle avec mesure des paramètres de croissance, prise de la tension artérielle, bilan urinaire incluant albuminurie et protéinurie ainsi qu'un ultrason rénal avec

mesure de la taille rénale et dans la mesure du possible comptabilisation du nombre de kystes et mesure de la taille de ces derniers. La présence de kyste hépatique est exclue par échographie au moins une fois dans l'enfance. En cas d'anamnèse familiale positive, une IRM cérébrale est organisée vers 13-14 ans, à la recherche d'anévrismes cérébraux. Un bilan sanguin est réalisé avec notamment créatininémie seulement en cas de protéinurie ou albuminurie significative. La mise en évidence d'une hypertension artérielle conduit à la réalisation d'un profil tensionnel de 24h. Si l'hypertension se confirme, un traitement anti-hypertenseur par IEC est alors introduit. Il en est de même en cas de protéinurie ou albuminurie persistante.

NGAL

La protéine NGAL (*Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin*) est une petite protéine constituée de 178 acides aminés appartenant à la famille des Lipocalin (Singer et al., 2013). Le NGAL existe sous plusieurs formes : le monomère (25kDa), l'homodimère (45kDa) et la forme hétérodimère conjuguée à la gélatinase (175kDa). Originellement, le NGAL a été identifié sur les neutrophiles. Cependant, cette protéine est également exprimée au niveau du rein, foie, poumons, estomac, colon et différentes cellules épithéliales en réponse à plusieurs états pathologiques comme une inflammation, infection, intoxication, ischémie, insuffisance rénale aiguë (IRA) et transformations néplasiques (Gagneux-Brunon et al., 2012; Singer et al., 2013). Il est en effet produit par des neutrophiles activés et toute une variété de cellules épithéliales, parmi lesquelles les cellules tubulaires rénales, en réponse à un stress cellulaire comme lors d'une infection, inflammation ou ischémie (Bolignano et al., 2007; Mishra et al., 2003). Le NGAL est produit par les cellules épithéliales tubulaires essentiellement sous sa forme monomérique ou hétérodimérique (Singer et al., 2013). Il a été démontré chez le mammifère qu'il est capable de lier les sidérophores bactériens et certains composants endogènes avec une haute affinité. Son rôle exact n'est pas encore complètement compris mais il pourrait avoir un effet anti-inflammatoire, anti-apoptotique et bactéricide. En effet, il inhiberait la croissance bactérienne en liant les sidérophores bactériens et en transportant activement le fer dans l'espace intracellulaire, où ce dernier entraîne en aval l'activation de réponses cellulaires (Singer et al., 2013). De plus, sa production semble associée aux mécanismes de prolifération cellulaire (Gagneux-Brunon et al., 2012).

Chez l'individu sain, le NGAL est retrouvé en faible quantité dans la circulation systémique. Au niveau rénal, il passe par une filtration glomérulaire avant d'être réabsorbé au niveau du

tubule proximal. De ce fait, en situation normale, seule une faible concentration de NGAL est retrouvée dans les urines. En cas d'atteinte rénale aiguë et notamment tubulaire, le NGAL est massivement produit par le néphron distal, reflétant une sécrétion apicale et baso-latérale augmentée et entraînant une augmentation de ses concentrations urinaire et plasmatique. Par ailleurs, une atteinte du néphron proximal, compromettant ainsi sa réabsorption rénale, participerait également à l'augmentation notable de ces concentrations (Singer et al., 2013). Ces observations concordent avec plusieurs études récentes qui ont mis en évidence l'intérêt du NGAL urinaire (NGALu) comme marqueur d'une atteinte rénale aiguë (Mishra et al., 2003, 2005a), tout comme de progression de l'atteinte rénale (Bolignano et al., 2007; Kawano et al., 2015; Meijer et al., 2010). Nishida et collaborateurs ont mesuré les taux de NGAL plasmatique et urinaire chez des enfants présentant des néphropathies communes et ont montrés que le NGALu était augmenté chez ces enfants de façon significative par rapport à un groupe contrôle et ceci que le GFR soit normal ou déjà abaissé. Cette augmentation était d'autant plus significative qu'il s'agissait de tubulopathies (Nishida et al., 2010). A contrario, le NGAL plasmatique était uniquement augmenté chez les patients présentant également un GFR abaissé. Cette étude suggère donc que contrairement au NGAL plasmatique, le NGALu pourrait être un marqueur précoce de l'atteinte rénale, avant que celle-ci se traduise par une baisse du GFR.

Objectifs de l'étude

L'objectif de notre étude était d'évaluer l'intérêt du NGALu comme marqueur tubulaire précoce de l'atteinte rénale chez les enfants atteints d'ADPKD. Nous avons comparé leurs valeurs de NGALu à celles d'un groupe contrôle identique pour l'âge et le sexe. Nous avons par ailleurs recherché une association entre le NGALu et les marqueurs d'atteinte de la fonction rénale et de progression de la maladie utilisés à ce jour en pédiatrie, que sont la tension artérielle, la protéinurie et l'albuminurie. Nous l'avons également comparé au volume rénal total calculé à l'échographie rénale (TKV) puisque ce dernier a montré un certain intérêt comme marqueur de progression de la maladie chez l'adulte. Nous espérions ainsi non seulement démontrer l'utilité du NGALu dans le suivi des patients pédiatriques mais également de son intérêt, associé aux autres marqueurs, dans l'utilité d'introduire un traitement néphro-protecteur, que sont les IEC, chez ces enfants.

ARTICLE ORIGINAL

Référence :

Article original publié dans le journal *Frontiers in Pediatrics*, Volume 7, Mars 2019

Early urinary biomarkers in pediatric Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (ADPKD): no evidence in the interest of Urinary Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (uNGAL)

Marianthi Tsingos¹, Laura Merlini², Marco Solcà³, Alexandra Goischke¹, Alexandra Wilhelm-Bals¹, Paloma Parvex¹

¹ Pediatric Nephrology Unit, Department of Pediatrics, Children's Hospital, Geneva University Hospital, 6 Rue Willy-Donzé, 1211 Geneva 14, Switzerland,

² Pediatric Radiology Unit, Department of Radiology, Children's Hospital, Geneva University Hospital, 6 Rue Willy-Donzé, 1211 Geneva 14, Switzerland,

³ Laboratory of Cognitive Neuroscience, Brain Mind Institute and Center for Neuroprosthetics, School of Life Sciences, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Campus Biotech, Geneva, Switzerland

Running title: Urinary NGAL as an early renal biomarker in pediatric ADPKD

Abstract

Background: Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (ADPKD) is increasingly diagnosed during childhood by the presence of renal cysts in patients with a positive familial history. No curative treatment is available and early detection and diagnosis confronts pediatricians with the lack of early markers to decide whether to introduce renal-protective agents and prevent the progression of renal failure. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) is a tubular protein that has been recently proposed as an early biomarker of renal impairment in the ADPKD adult population.

Methods: Urinary NGAL (uNGAL) levels were measured in 15 ADPKD children and compared with 15 age and gender matched controls using parametric, non-parametric and Bayesian statistics. We also tested the association of uNGAL levels with markers of disease progression, such as proteinuria, albuminuria, blood pressure and Total Kidney Volume (TKV) using correlation analysis. TKV was calculated by ultrasound, using the ellipsoid method.

Results: No difference in mean uNGAL levels was observed between groups (ADPKD: 26.36 ng/ml; Controls: 27.24 ng/ml; $P=.96$). Moreover, no correlation was found between uNGAL and proteinuria ($P=.51$), albuminuria ($P=.69$), TKV ($P=.68$) or mean arterial pressure ($P=.90$). By contrast, TKV was positively correlated with proteinuria ($P=.04$), albuminuria ($P=.001$) and mean arterial pressure ($P=.03$).

Conclusion: uNGAL did not confirm its superiority as a marker of disease progression in a pediatric ADPKD population. In the contrary, TKV appears to be an easy measurable variable and may be promising as a surrogate marker to follow ADPKD progression in children.

Keywords: ADPKD, uNGAL, children, renal impairment, TKV

Introduction

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is the most prevalent inherited monogenic kidney disease and affects 1/500 individual worldwide. It represents up to 5-10% of total end-stage renal disease (Cadnapaphornchai, 2015; Lespinasse et al., 2006). Its diagnosis is mainly based on renal ultrasonography anomalies due to the low cost, safety and demonstrated reliability of this technique with 100% specificity and 67-95% sensitivity depending on the genetic mutation (Nicolau et al., 1999). Two genes are known to be involved in the disease. Mutations in *PKD1* gene concern around 85% of the ADPKD population and are associated with a more severe renal impairment and disease progression. Given the fewer cyst burden and later age at diagnosis among *PKD2*-related ADPKD, *PKD1*-associated ADPKD is over-represented in pediatric patients (Reddy and Chapman, 2017).

Until recently, ADPKD was considered mainly as an adult disease. However, clinical manifestations may already occur during early childhood. Developments in ultrasound technology have led to an increase in the prenatal and infant diagnosis of ADPKD (De Rechter et al., 2017) and, consequently, to the need for pediatric follow-up guidelines as clinical manifestations may already occur during early childhood.

Even in the early stages, 60% of ADPKD children present impaired urine concentration capacity several years before the decline in the glomerular filtration rate (GFR) (De Rechter et al., 2017). The estimated prevalence of proteinuria and albuminuria in ADPKD children is 20% and 30%, respectively (Reddy and Chapman, 2017; Sharp et al., 1998). Similar to the adult population, proteinuria has been shown to be associated with structural kidney changes in ADPKD pediatric patients (Fick-Brosnahan et al., 2001). The prevalence of HTN in ADPKD children is 20% (Marlais et al., 2016) and is also associated with a decreased GFR over time (Cadnapaphornchai, 2015; Cadnapaphornchai et al., 2009a).

Current biomarkers used to evaluate renal function in children at a stage of normal GFR highlight the difficulty for clinicians to determine whenever it is beneficial to introduce renal-protective agents. Albuminuria and proteinuria are routinely used as follow-up biomarkers in pediatric ADPKD patients, but they may not be present during the early stages of the disease. New biomarkers are required to detect the impact of the disease on kidney function. Glomerular hyperfiltration has been shown to be associated with a significantly faster decline in renal function and higher rate of kidney enlargement over time (Helal et al., 2011b). In adults, Total Kidney Volume (TKV) has been recently studied as a surrogate marker of the disease progression and therapeutic efficacy (Alam et al., 2015; Chapman et al., 2003, 2012; Grantham et al., 2006a, 2006b; Perrone et al., 2017). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is a small protein that consists of 178 amino acids produced by activated neutrophils and various epithelial cells with a rapid upregulated expression in response to any cellular stress, such as infection, inflammation or ischemia (Bolignano et al., 2007; Mishra et al., 2003). Recent studies in adults have highlighted the interest of urinary NGAL (uNGAL) as a marker of acute kidney impairment (Mishra et al., 2003, 2005b), as well as a possible biomarker of disease progression (Bolignano et al., 2007; Kawano et al., 2014; Meijer et al., 2010). Nishida and collaborators measured serum and uNGAL levels in patients with common pediatric renal diseases and demonstrated that uNGAL level was significantly increased compared to a control group, whether the GFR was normal or decreased. The increase was even more remarkable in tubular dysfunction disease (Nishida et al., 2010).

Here we assessed the predictive value of uNGAL as an early tubular biomarker of renal function and impairment in ADPKD pediatric patients and compared values with a gender- and age-matched control group. We also investigated whether there was an association

between uNGAL and well recognized clinical markers of the disease, such as proteinuria, albuminuria, blood pressure and TKV.

Materials and methods

Population

Based on the data reported by Bolignano and colleagues (Bolignano et al., 2007) (estimated effect size: $\text{Cohen's } d = 3.73$), we estimated that a sample size of 15 ADPKD patients and 15 controls would be sufficient to show uNGAL differences between groups.

The study was performed between December 2015 and July 2017 at Geneva University Hospitals (Geneva, Switzerland) among 15 ambulatory ADPKD patients aged <18 years old. The diagnosis of ADPKD was made using the typical ultrasound findings of renal cysts (i.e. presence of bilateral cysts) associated with a positive familial history. Two patients had been genetically tested before the study. Both of them had a *PKDI*-related mutation. None of the patients had acute kidney injury and any other congenital disease was an exclusion criterion. Data were collected for all patients during the regular annual follow-up consultation. A control group comprised of 15 ambulatory patients aged <18 years old recruited at a specialized consultation for pediatric voiding disorders was age and gender matched with the ADPKD patient group. The patients suffered diurnal and/or nocturnal enuresia due to behavioral issues. A normal kidney ultrasound was required as well as a normal urinary test (no presence of proteinuria or hematuria), and normal blood pressure. Any congenital disease was an exclusion criterion.

The protocol was approved by the local ethical committee of human research in Geneva (CER-15-230). The study was conducted in accordance with the principles of good clinical practice, the Declaration of Helsinki, and all local regulations. Written informed consent was obtained from parents and children >12 years old before participating in the study.

Variables analyses

Urinary biomarkers

NGAL measurement: 10 mL urine were collected on the day each participant came for an outpatient visit. The urine sample was therefore taken at a random time during day and was rapidly transferred to the laboratory where it was immediately centrifuged and stored at -80°C until assayed. NGAL was measured using an ELISA method on a commercial kit (KIT 036C; Bioporto®, Bioporto Diagnostics, Hellerup, Denmark) according to the manufacturer's instruction. All measurements were made in duplicate and in a blinded manner. NGAL levels were expressed as pg/mL and converted to ng/ml to make the comparison easier with the values found in the medical literature.

Proteinuria and albuminuria: In the ADPKD patient group, urine samples were also tested for albuminuria and proteinuria as standard care follow-up, calculated on the ratio of urinary albumin or total urinary proteins and urinary creatinine, respectively. Significant albuminuria was defined as >2.5mg/mmol and significant proteinuria as >20g/mol.

TKV assessment

All participants had a kidney ultrasound. In both groups, TKV (sum of right and left KV) was calculated upon the ultrasound image by the same pediatric radiologist using the ellipsoid method based on the length, width and depth (kidney volume = length × width × thickness × $[\pi/6]$) (Hwang et al., 2011). The TKV unit is given as cm³. Two controls had their last normal ultrasound prior to the study and TKV was therefore not included in our analysis. The values in both groups were compared to standard kidney volume in children (Christophe et al., 1986). The TKV was adjusted for height (in cm) in all subjects (Ht-TKV).

Blood pressure

Systolic and diastolic blood pressure were measured in both groups during the consultation and adjusted to age and height percentiles to determine the individual blood pressure percentile (Flynn et al., 2017). A mean arterial pressure (systolic pressure + 2x diastolic pressure/3) was calculated in both groups.

Statistical analyses

Analyses were performed with the R software (R Development Core Team, 2013) including the BayesFactor package (Morey and Rouder, 2011). We first checked normality using Shapiro-Wilk Test (Shapiro and Wilk, 1965). We compared the concentration of uNGAL, which was not normally distributed using two-sample Wilcoxon tests. Categorical variable (i.e. Weight percentile, Height percentile, Systolic pressure percentile and Diastolic pressure percentile) were compared between groups using chi-squared test. Unpaired t-tests (Student t-test or Welch t-test for equal or unequal variance respectively) were used to compare continuous variables between groups. When relevant, we confirmed null effects using JZS Bayes factor tests to estimate the ratio of the likelihood probability of the null and alternative hypothesis (i.e. Bayes factor (Bf) <1 implies evidence for the null hypothesis). We also checked for linear associations between uNGAL concentrations and clinical parameters of renal impairment, such as proteinuria, albuminuria, blood pressure and TKV, using Pearson's correlation. We used a significance level of $\alpha=0.05$.

Results

Fifteen ADPKD patients (8 females; mean age: 10.2 years [standard deviation (SD): ± 4.3 ; range: 4–17]) and 15 age- and gender-matched controls (8 females; mean age: 10.4 years [SD: ± 3.4 ; range: 6–17]) participated in the study. No differences in age ($t(26)=.05$; $P=.96$; Bf=0.34), weight percentiles ($\chi^2(6, N = 30) = 2.82$, $p = 0.83$) or height percentiles ($\chi^2(7, N =$

30) = 9.96, $p = 0.19$) were observed between the two groups (Table 1). Patients' clinical characteristics are shown in Table 2.

Variables analyses

Urinary biomarkers

uNGAL: uNGAL was not normally distributed ($p < 0.001$) unlike all other tested variables (all p values > 0.2). Ten of 30 children (5 patients per group) had NGAL below the limits of detection defined as $< 5 \text{ ng/L}$ (considered as zero for the calculation). No statistical difference in uNGAL was observed between patients (mean = 26.36 [ng/ml]; SD: ± 43.48 ; median = 11.68 [ng/ml]; IQR 0-27) and controls (mean = 27.24 [ng/ml]; SD: ± 52.78); ($W = 109$, $P = .89$; $B_f = .34$; (Figure 1a).

Proteinuria and albuminuria: In the ADPKD group, 4 patients had a significant proteinuria and 5 had a significant albuminuria ($> 20 \text{ [g/mol]}$ and $> 2.5 \text{ [mg/mmol]}$, respectively; Table 2).

TKV

TKV was calculated in the ADPKD group (mean: 184.73 [cm^3]; SD; 88) and the control group (mean 123.83 [cm^3]; SD: 31) (Table 3). As predicted, TKV in the ADPKD group was significantly larger than in controls ($t(16) = 2.53$; $P = .02$) (Table 3). When corrected for height, we detected a stronger difference between groups (ht-TKV ADPKD group: mean 1.24 [cm^2]; SD; 0.44. Ht-TKV control group: mean 0.87 [cm^2]; SD; 0.15) ($t(17) = 3.18$; $P = .005$) (Figure 1b).

Blood pressure

Among the ADPKD group, 3 patients had systolic blood pressure, diastolic blood pressure or both $> 90^{\text{th}}$ percentile when corrected for age and height percentiles at consultation (Table 2). None were taking any antihypertensive medication. All control group patients had blood

pressure values <95th percentile. No differences between systolic blood pressure percentiles (χ^2 (2, N = 30) = 2.40, p= 0.30) or diastolic blood pressure percentiles (χ^2 (2, N = 30) = 1.08, p= 0.58) were observed between the two groups.

Correlation analyses

Correlation analyses in the patient group revealed that the uNGAL concentration was not correlated with the TKV (t(13)= .41; r= .11; P=.68), ht-TKV (t(13)= .36; r= .10; P=.71), mean arterial pressure (t(13)=.12; r=.03; P=.90), proteinuria (t(12)= -.67; r= -.19; P=.51) or albuminuria (t(12)=-.41; r=-.12; P=.69) (Figure 2). TKV and ht-TKV were associated with parameters of disease progression (Figure 3). They were significantly correlated with proteinuria (t(12)= 2.25; r= .054; P=.04 and t(12)= 2.47; r= .58; P=.02, respectively). A similar relation was observed between albuminuria and TKV or ht-TKV (t(12)= 2.82; r= .63; P=.001 and t(12)=2.91; r= .64; P=.001, respectively), as well as mean arterial pressure (t(13)=2.31; r=.54; P=.03 and t(13)=1.91; r=.47; P=.07, respectively) (Figure 3).

Discussion

Urinary Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (uNGAL) is frequently proposed as an early marker for renal progression in ADPKD adult patients. Similar to a previous study conducted in the adult ADPKD population by Vareesangthip and colleagues (Vareesangthip et al., 2017), we found no significant difference in uNGAL values between the two groups. This finding is in contrast to our hypothesis and other observations in adults (Bolignano et al., 2007; Kawano et al., 2014), reporting higher uNGAL values when compared to controls. An explanation that may account for this discrepancy is the possibility that uNGAL concentration is significantly higher only when GFR has already declined. Bolignano and collaborators found a significant difference between uNGAL in ADPKD patients compared to controls, but the mean creatinine clearance in the ADPKD group was 59 ± 38 ml/min, which is already a consistent decrease in renal function (Bolignano et al., 2007). It implies that uNGAL may be useful as a biomarker during advanced stages of ADPKD. Moreover, the importance of the cystic disease on uNGAL excretion may not be as important as reported. Parikh and colleagues (Parikh et al., 2012) demonstrated that even though uNGAL was present and highly expressed in the epithelial cells of kidney cysts and its excretion increased in ADPKD patients, it did not correlate with a worsening of kidney function or an increase in TKV. However, as hypothesized by the authors, these results may be due to the lack of communication between the cystic space and the urinary collection system (Parikh et al., 2012). On the other hand, several studies showed a positive correlation between uNGAL values and a worsening of renal function or creatininemia (Bolignano et al., 2007; Meijer et al., 2010; Vareesangthip et al., 2017).

Kawano and collaborators (Kawano et al., 2014) have explored potential urinary biomarkers and showed that NGAL could be a possible common biomarker for human and murine ADPKD as it was significantly higher than in the control group. Among 26 ADPKD adult

patients, Bolignano and colleagues (Bolignano et al., 2007) demonstrated a significant increase in serum and uNGAL levels compared to a control group. Moreover, in the ADPKD group, patients with higher cystic growth presented higher serum and uNGAL levels. Plasma and uNGAL levels were shown to correlate with both a residual GFR and creatininemia, suggesting that the levels of this protein may in some way be influenced by the degree of the underlying altered renal function. A study by Meijer and colleagues among 102 ADPKD adult patients demonstrated that uNGAL was not only increased in the patient group compared to the control group, but that it was also associated with GFR, renal blood flow and TKV. Interestingly, these associations were independent of albuminuria (Meijer et al., 2010). Nishida and collaborators reported a significant increase in uNGAL levels than in serum NGAL in patients with several common pediatric renal diseases compared to a control group of healthy children (Nishida et al., 2010).

In our ADPKD group, uNGAL concentrations were compared to other clinical markers used to assess disease progression in children, such as proteinuria, albuminuria, mean arterial pressure and TKV. No correlation was found between albuminuria, proteinuria and uNGAL. However, significant proteinuria and albuminuria concerned only a few of our patients. Previous studies in children and adults demonstrated that proteinuria and albuminuria were associated with a more rapid progression toward more severe renal disease (De Rechter et al., 2017). HTN is a common complication of the disease that may already occur during childhood. In our study, systolic, diastolic and mean arterial pressure, were compared between groups. No differences between systolic blood pressure percentiles or diastolic blood pressure percentiles were observed between the two groups.

Interestingly, we found a significant correlation between proteinuria and TKV/Ht-TKV and between albuminuria and TKV/Ht-TKV. These findings are consistent with a previous study in 100 young patients (mean age: 31 years) with ADPKD and preserved renal function where

the degree of albuminuria correlated with TKV and kidney volume growth rate, measured by magnetic resonance imaging sequences (Kistler et al., 2009). Similarly, in their study among 103 ADPKD children, Sharp and colleagues showed that those with severe renal cystic disease (>10 cysts; $n = 54$) had greater protein excretion than patients with moderate disease (≤ 10 cysts; $n = 49$) (Sharp et al., 1998). When comparing mean arterial pressure and TKV, a significant correlation was found. This is consistent with Seeman and collaborators who demonstrated a correlation between HTN and the number and volume of cysts in a study of 62 children suffering from ADPKD (Seeman et al., 2003b).

TKV has been recently demonstrated as a marker of disease progression and therapeutic efficacy (Alam et al., 2015; Chapman et al., 2003, 2012; Grantham et al., 2006a, 2006b; Perrone et al., 2017) in the adult ADPKD population. Among 85 patients with ADPKD aged 4 to 21 years and followed for 5 years, Cadnapaphornchai and colleagues were able to demonstrate a strong association between TKV increase and hypertension (Cadnapaphornchai et al., 2009b). Various imaging modalities such as magnetic resonance imaging, computed tomography or ultrasonography can quantify TKV. One simple, practical and noninvasive standardized method to estimate TKV is based on ultrasound with the use of the ellipsoid formula (Breysem et al., 2018; Hwang et al., 2011). Sonographic measurement of kidney volume in adults with ADPKD was compared to magnetic resonance imaging measurements. Although it was demonstrated to be inappropriate for the evaluation of short-term disease progression, it was sufficient to estimate kidney volume, which reflects disease severity (O'Neill et al., 2005). Among 30 ADPKD children, Breysem and collaborators demonstrated a significant correlation between magnetic resonance imaging and ultrasound TKV measurements. However, there was a strongest correlation using a 3D versus 2D ultrasound measurement (Breysem et al., 2018). Data from the Consortium for Radiologic

Imaging Studies of Polycystic Kidney Disease (CRISP) study have shown that increases in Ht-TKV are associated with more frequent and severe complications of ADPKD, such as hypertension, gross hematuria, and proteinuria, and also loss of kidney function (Chapman et al., 2012; Grantham et al., 2006b, 2006a; Perrone et al., 2017). Moreover, Yu and collaborators recently reported that not only basal kidney volume, but also the rate of kidney growth, are strongly associated with the development of advanced stages of kidney disease in ADPKD patients (Yu et al., 2017). These findings are consistent with the possible use of TKV as a predictive and potentially monitoring biomarker in ADPKD.

In our study, we could not demonstrate a correlation between TKV/Ht-TKV and uNGAL concentration. This result is consistent with a previous study conducted by Petzold and colleagues on 139 ADPKD patients considered at an early stage of the disease (mean estimated GFR: $93 \pm 19 \text{ ml/min/1.73m}^2$). Different urinary biomarkers were dosed and tested for an association with the estimated GFR and Ht-TKV. No association was found between uNGAL and the estimated GFR or Ht-TKV (Petzold et al., 2015). The fact that no association was found at an early stage of the disease in this adult population may explain our results. Moreover, this result may support the hypothesis of a lack of communication between the cystic space and the urinary collection system as previously mentioned. However, our results are in contrast with Meijer and collaborators who demonstrated a positive correlation between uNGAL and TKV (Meijer et al., 2010) in adult ADPKD patients. Bolignano and colleagues found that ADPKD patients with higher cyst growth had higher serum and uNGAL (Bolignano et al., 2007).

To our knowledge, this is the first study investigating the clinical relevance of uNGAL in an ADPKD pediatric population. Our study has some limitations though. Firstly, is the relative small sample size that could theoretically have hidden a difference in uNGAL between groups. However, our power analysis suggests that our study was not underpowered.

Moreover, to maximize the sensitivity of our test, the uNGAL values in the ADPKD children were compared with a carefully selected age and gender matched control group. Finally, bayesian analysis confirmed the absence of effect and provided compelling evidence for the null hypothesis compared to the alternative hypothesis ($B_f = 0.39$). Bring together, these observations strongly support the idea that more subjects would not have led to a significant result. Another limitation is the variability in uNGAL values observed between participants. We argue that this cannot explain the absence of a significant difference between groups for the following reasons. First, the absence of a significant difference persisted following outlier removal, using a well-described method for data exclusion (1.5-fold IQR). Second, the uNGAL values in our population were within the normal range values proposed by Bennett and colleagues (Bennett et al., 2015). Thus, the variability of uNGAL among individuals seems to compromise its use as biomarker of renal impairment in the early stages of the disease. Some other limitations have to be addressed. Firstly, uNGAL was measured at a single time point and not longitudinally. We cannot therefore comment on changes in uNGAL concentration over time, limiting the evaluation of its potential use as marker of the disease progression. In addition, urine samples were collected during the day and not at first morning void, not considering the variability of proteinuria during the day.

GFR is usually normal in children with ADPKD (Fick et al., 1994; Karava et al., 2018). In our study GFR was not measured. Consequently, correlation between GFR and uNGAL or any other marker of renal impairment was not studied. Even if these correlation analyses could have led to a better comprehension of the markers modified by the disease progression, considering the absence of difference in uNGAL between groups, it would not have modified our conclusion.

Finally, our ADPKD population was not genetically tested to identify *PKD1* or *PKD2* mutation. We can assume that *PKD1* was predominant in our patients as patients with *PKD2*

mutation express cysts later and *PKDI* is over-represented in pediatric ADPKD population (Reddy and Chapman, 2017).

Conclusion

Our results demonstrate the absence of interest of uNGAL as an early biomarker of renal function in the pediatric population. Interestingly, we showed a significant correlation between TKV and markers of disease progression, such as proteinuria, albuminuria and mean arterial pressure. TKV is easy, measurable and low cost and may be a surrogate marker to follow ADPKD progression disease in children. More studies on early markers of renal impairment and disease progression in children are needed.

Acknowledgements

The authors thank the participants and their families.

Author contributions

MT & PP designed the study. MT, AWB & AG developed the methodology and collected the data. MT, MS, LM & PP performed the analysis, and interpreted the results. MT & PP wrote the initial draft of the paper and all authors provided critical review, edits, and approval for the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

- Alam, A., Dahl, N. K., Lipschutz, J. H., Rossetti, S., Smith, P., Sapir, D., et al. (2015). Total Kidney Volume in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: A Biomarker of Disease Progression and Therapeutic Efficacy. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* doi:10.1053/j.ajkd.2015.01.030.
- Bennett, M. R., Nehus, E., Haffner, C., Ma, Q., and Devarajan, P. (2015). Pediatric reference ranges for acute kidney injury biomarkers. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* 30, 677–685. doi:10.1007/s00467-014-2989-y.
- Bolignano, D., Coppolino, G., Campo, S., Aloisi, C., Nicocia, G., Frisina, N., et al. (2007). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in patients with autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Am. J. Nephrol.* 27, 373–378. doi:10.1159/000103912.
- Breysem, L., De Rechter, S., De Keyzer, F., Smet, M. H., Bammens, B., Van Dyck, M., et al. (2018). 3DUS as an alternative to MRI for measuring renal volume in children with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* doi:10.1007/s00467-017-3862-6.
- Cadnapaphornchai, M. A. (2015). Autosomal dominant polycystic kidney disease in children. *Curr. Opin. Pediatr.* 27, 193–200. doi:10.1097/MOP.0000000000000195.
- Cadnapaphornchai, M. A., McFann, K., Strain, J. D., Masoumi, A., and Schrier, R. W. (2009a). Prospective change in renal volume and function in children with ADPKD. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* 4, 820–829. doi:10.2215/CJN.02810608.
- Cadnapaphornchai, M. A., McFann, K., Strain, J. D., Masoumi, A., and Schrier, R. W. (2009b). Prospective change in renal volume and function in children with ADPKD. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* 4, 820–829. doi:10.2215/CJN.02810608.
- Chapman, A. B., Bost, J. E., Torres, V. E., Guay-Woodford, L., Bae, K. T., Landsittel, D., et al. (2012). Kidney volume and functional outcomes in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* 7, 479–486. doi:10.2215/CJN.09500911.
- Chapman, A. B., Guay-Woodford, L. M., Grantham, J. J., Torres, V. E., Bae, K. T., Baumgarten, D. A., et al. (2003). Renal structure in early autosomal-dominant polycystic kidney disease (ADPKD): The Consortium for Radiologic Imaging Studies of Polycystic Kidney Disease (CRISP) cohort. *Kidney Int.* 64, 1035–1045. doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00185.x.
- Christophe, C., Cantraine, F., Bogaert, C., Coussement, C., Hanquinet, S., Spehl, M., et al. (1986). Ultrasound: a method for kidney size monitoring in children. *Eur. J. Pediatr.* 145, 532–538.
- De Rechter, S., Breysem, L., and Mekahli, D. (2017). Is Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease Becoming a Pediatric Disorder? *Front. Pediatr.* 5, 272. doi:10.3389/fped.2017.00272.

- Fick, G. M., Duley, I. T., Johnson, A. M., Strain, J. D., Manco-Johnson, M. L., and Gabow, P. A. (1994). The spectrum of autosomal dominant polycystic kidney disease in children. *J. Am. Soc. Nephrol.* 4, 1654–1660.
- Fick-Brosnahan, G. M., Tran, Z. V., Johnson, A. M., Strain, J. D., and Gabow, P. A. (2001). Progression of autosomal-dominant polycystic kidney disease in children. *Kidney Int.* 59, 1654–1662. doi:10.1046/j.1523-1755.2001.0590051654.x.
- Flynn, J. T., Kaelber, D. C., Baker-Smith, C. M., Blowey, D., Carroll, A. E., Daniels, S. R., et al. (2017). Clinical Practice Guideline for Screening and Management of High Blood Pressure in Children and Adolescents. *Pediatrics* 140. doi:10.1542/peds.2017-1904.
- Grantham, J. J., Chapman, A. B., and Torres, V. E. (2006a). Volume progression in autosomal dominant polycystic kidney disease: the major factor determining clinical outcomes. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* 1, 148–157. doi:10.2215/CJN.00330705.
- Grantham, J. J., Torres, V. E., Chapman, A. B., Guay-Woodford, L. M., Bae, K. T., King, B. F. J., et al. (2006b). Volume Progression in Polycystic Kidney Disease. *N. Engl. J. Med.* 354, 2122–2130. doi:10.1056/NEJMoa054341.
- Helal, I., Reed, B., McFann, K., Yan, X.-D., Fick-Brosnahan, G. M., Cadnapaphornchai, M., et al. (2011). Glomerular hyperfiltration and renal progression in children with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* 6, 2439–2443. doi:10.2215/CJN.01010211.
- Hwang, H. S., Yoon, H. E., Park, J. H., Chun, H. J., Park, C. W., Yang, C. W., et al. (2011). Noninvasive and direct measures of kidney size in kidney donors. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* 58, 266–271. doi:10.1053/j.ajkd.2011.02.392.
- Karava, V., Benzouid, C., Hogan, J., Dossier, C., Denjean, A. P., and Deschênes, G. (2018). Early cardiovascular manifestations in children and adolescents with autosomal dominant polycystic kidney disease: a single center study. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* 33, 1513–1521. doi:10.1007/s00467-018-3964-9.
- Kawano, H., Muto, S., Ohmoto, Y., Iwata, F., Fujiki, H., Mori, T., et al. (2014). Exploring urinary biomarkers in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Clin. Exp. Nephrol.* doi:10.1007/s10157-014-1078-7.
- Kistler, A. D., Poster, D., Krauer, F., Weishaupt, D., Raina, S., Senn, O., et al. (2009). Increases in kidney volume in autosomal dominant polycystic kidney disease can be detected within 6 months. *Kidney Int.* 75, 235–241. doi:10.1038/ki.2008.558.
- Lespinasse, J., Fourcade, J., and Schir, F. (2006). [Polycystic kidney diseases: molecular genetics and counselling]. *Néphrologie Thérapeutique* 2, 120–126. doi:10.1016/j.nephro.2006.03.001.
- Marlais, M., Cuthell, O., Langan, D., Dudley, J., Sinha, M. D., and Winyard, P. J. D. (2016). Hypertension in autosomal dominant polycystic kidney disease: a meta-analysis. *Arch. Dis. Child.* 101, 1142–1147. doi:10.1136/archdischild-2015-310221.
- Meijer, E., Boertien, W. E., Nauta, F. L., Bakker, S. J. L., van Oeveren, W., Rook, M., et al. (2010). Association of Urinary Biomarkers With Disease Severity in Patients With

- Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: A Cross-sectional Analysis. *Am. J. Kidney Dis.* 56, 883–895. doi:10.1053/j.ajkd.2010.06.023.
- Mishra, J., Dent, C., Tarabishi, R., Mitsneces, M. M., Ma, Q., Kelly, C., et al. (2005). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet Lond. Engl.* 365, 1231–1238. doi:10.1016/S0140-6736(05)74811-X.
- Mishra, J., Ma, Q., Prada, A., Mitsneces, M., Zahedi, K., Yang, J., et al. (2003). Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 14, 2534–2543.
- Morey, R. D., and Rouder, J. N. (2011). Bayes factor approaches for testing interval null hypotheses. *Psychol. Methods* 16, 406–419. doi:10.1037/a0024377.
- Nicolau, C., Torra, R., Badenas, C., Vilana, R., Bianchi, L., Gilabert, R., et al. (1999). Autosomal dominant polycystic kidney disease types 1 and 2: assessment of US sensitivity for diagnosis. *Radiology* 213, 273–276. doi:10.1148/radiology.213.1.r99oc05273.
- Nishida, M., Kawakatsu, H., Okumura, Y., and Hamaoka, K. (2010). Serum and urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels in children with chronic renal diseases. *Pediatr. Int. Off. J. Jpn. Pediatr. Soc.* 52, 563–568. doi:10.1111/j.1442-200X.2010.03067.x.
- O'Neill, W. C., Robbin, M. L., Bae, K. T., Grantham, J. J., Chapman, A. B., Guay-Woodford, L. M., et al. (2005). Sonographic assessment of the severity and progression of autosomal dominant polycystic kidney disease: the Consortium of Renal Imaging Studies in Polycystic Kidney Disease (CRISP). *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* 46, 1058–1064. doi:10.1053/j.ajkd.2005.08.026.
- Parikh, C. R., Dahl, N. K., Chapman, A., Bost, J. E., Edelstein, C. L., Comer, D. M., et al. (2012). Evaluation of urine biomarkers of kidney injury in Polycystic Kidney Disease. *Kidney Int.* 81, 784–790. doi:10.1038/ki.2011.465.
- Perrone, R. D., Mouksassi, M.-S., Romero, K., Czerwiec, F. S., Chapman, A. B., Gitomer, B. Y., et al. (2017). Total Kidney Volume Is a Prognostic Biomarker of Renal Function Decline and Progression to End-Stage Renal Disease in Patients With Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Kidney Int. Rep.* 2, 442–450. doi:10.1016/j.ekir.2017.01.003.
- Petzold, K., Poster, D., Krauer, F., Spanaus, K., Andreisek, G., Nguyen-Kim, T. D. L., et al. (2015). Urinary biomarkers at early ADPKD disease stage. *PloS One* 10, e0123555. doi:10.1371/journal.pone.0123555.
- Reddy, B. V., and Chapman, A. B. (2017). The spectrum of autosomal dominant polycystic kidney disease in children and adolescents. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* 32, 31–42. doi:10.1007/s00467-016-3364-y.
- Seeman, T., Dusek, J., Vondrichová, H., Kyncl, M., John, U., Misselwitz, J., et al. (2003). Ambulatory blood pressure correlates with renal volume and number of renal cysts in children with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Blood Press. Monit.* 8, 107–110. doi:10.1097/01.mbp.0000085762.28312.4a.

- Shapiro, S. S., and Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52, 591–611. doi:10.1093/biomet/52.3-4.591.
- Sharp, C., Johnson, A., and Gabow, P. (1998). Factors relating to urinary protein excretion in children with autosomal dominant polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 9, 1908–1914.
- Vareesangthip, K., Vareesangthip, K., Limwongse, C., and Reesukumal, K. (2017). Role of Urinary Neutrophil Gelatinase–Associated Lipocalin for Predicting the Severity of Renal Functions in Patients With Autosomal-Dominant Polycystic Kidney Disease. *Transplant. Proc.* 49, 950–954. doi:10.1016/j.transproceed.2017.03.061.
- Yu, A. S. L., Shen, C., Landsittel, D. P., Harris, P. C., Torres, V. E., Mrug, M., et al. (2017). Baseline total kidney volume and the rate of kidney growth are associated with chronic kidney disease progression in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Kidney Int.* doi:10.1016/j.kint.2017.09.027.

Legends to Tables and Figures

Table 1: Patient and control group characteristics

	ADPKD	Controls	P value
N	15	15	
Age (y)	10.2± 4.3	10.4± 3.4	0.85
Gender (M/F)	7/8	7/8	1
Height (Percentile)			0.19
P3-P10	2	1	
P10-P25	3	4	
P25-P50	2	3	
P50-P75	5	3	
P75-P90	0	3	
P90-P97	3	0	
>P97	0	1	
Weight (Percentile)			0.83
P3-P10	1	2	
P10-P25	4	3	
P25-P50	2	2	
P50-P75	4	3	
P75-P90	3	2	
P90-P97	1	1	
>P97	0	2	

Table 2: Clinical characteristics of ADPKD patients

uNGAL, urinary NGAL; TKV, Total Kidney Volume; Ht-TKV, TKV corrected for height; Psyst, systolic pressure percentile adjusted for height and age; Pdias, diastolic pressure percentile adjusted for height and age.

Subject	Age at diagnostic (yr)	Familial History	Genetic mutation	Proteinuria >20g/mol	Albuminuria >2.5mg/mmol	uNGAL (ng/ml)	TKV (cm ³)	Ht-TKV (cm ²)	Psyst Percentile	Pdias Percentile
1	12	no	PKD1	yes	yes	25.038	426.9	2.55	P50-P90	P50-P90
2	5	yes	Not tested	no	no	< 5	217.8	1.19	<P50	<P50
3	<1	yes	Not tested	unknown	unknown	< 5	87.65	0.86	>P95<P95+12mmHg	P50-P90
4	9	yes	Not tested	no	yes	150.43	177.89	1.17	P50-P90	P50-P90
5	5	yes	Not tested	no	no	104.38	177.51	1.27	P50-P90	<P50
6	7	yes	Not tested	no	yes	28.83	216.43	1.18	P50-P90	P50-P90
7	<1	yes	Not tested	no	no	11.68	85.95	0.67	>P95<P95+12mmHg	<P50
8	<1	yes	Not tested	no	no	34.96	194.46	1.25	P50-P90	P50-P90
9	in utero	yes	Not tested	yes	yes	11.47	244.07	1.48	<P50	<P50
10	1	yes	Not tested	yes	no	< 5	188.62	1.31	P50-P90	<P50
11	<1	yes	Not tested	no	no	16.32	255.04	1.57	<P50	<P50
12	<1	yes	PKD1	no	no	< 5	75.9	0.78	P50-P90	P50-P90
13	6	yes	Not tested	no	no	12.29	185.89	1.34	P50-P90	<P50
14	9	yes	Not tested	yes	yes	< 5	126.56	0.89	<P50	<P50
15	<1	yes	Not tested	no	no	< 5	110.23	1.05	P50-P90	P90-P95

Table 3: Urinary NGAL, Total Kidney Volume and arterial pressure in percentile between groups

uNGAL, urinary NGAL; TKV, Total Kidney Volume, Psys, systolic pressure; Pdias, diastolic pressure (arterial pressure percentiles adjusted for age and height percentile)

	ADPKD	Controls	P value
N	15	15	
uNGAL [ng/ml]	26.36	27.34	0.96
TKV [cm ³]	184.73	123.83	0.02
Psys (Percentile)			0.30
<P50	4	6	
P50-P90	9	9	
P90-P95	0	0	
>P95	2	0	
Pdias (Percentile)			0.58
<P50	8	8	
P50-P90	6	7	
P90-P95	2	3	
>P95	0	0	

Figure 1. Difference in urinary NGAL and Total Kidney Volume between groups

A) No differences in urinary NGAL (uNGAL) were observed between ADPKD patients and the gender and age matched control group. B) Total kidney volume (TKV) was significantly higher in patients. Error bars show standard error of the mean.

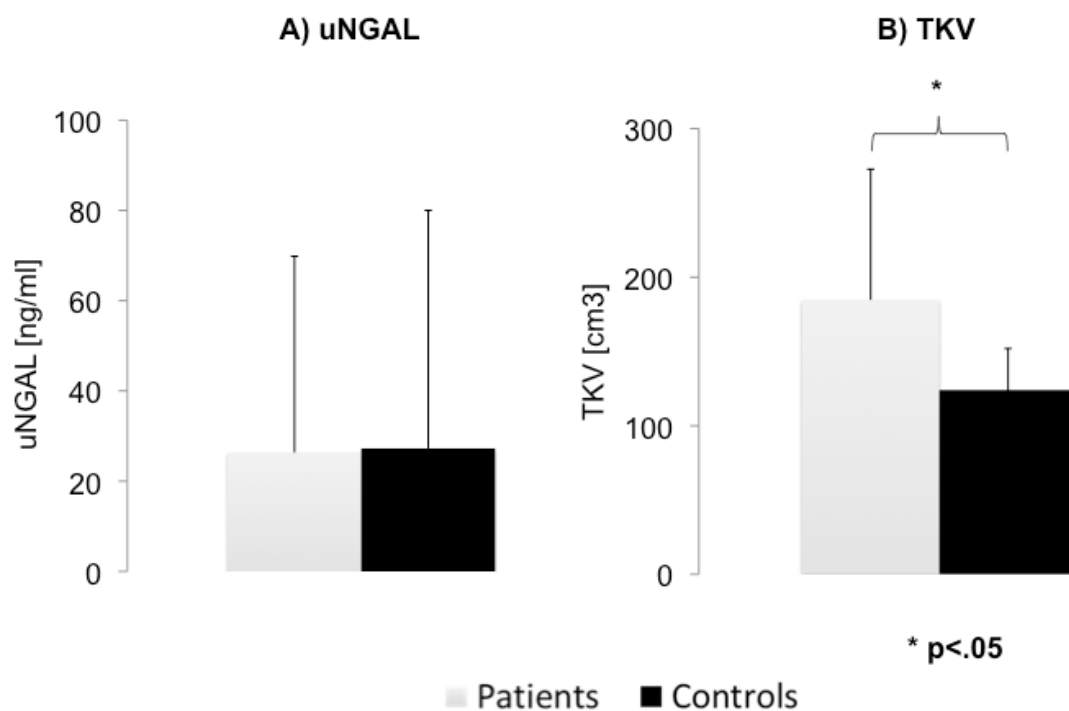


Figure 2. Association between uNGAL and parameters of renal impairment

No association shown between urinary NGAL (uNGAL) and Total Kidney Volume (TKV), mean arterial pressure (MAP), proteinuria [g/mol] or albuminuria [mg/mmol].

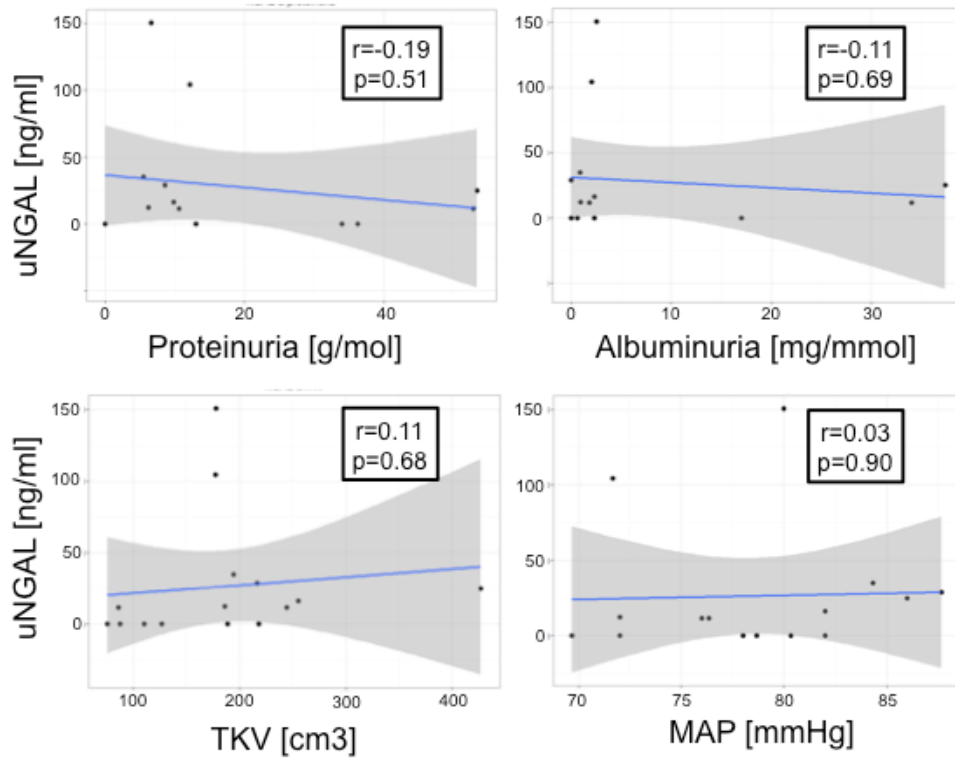
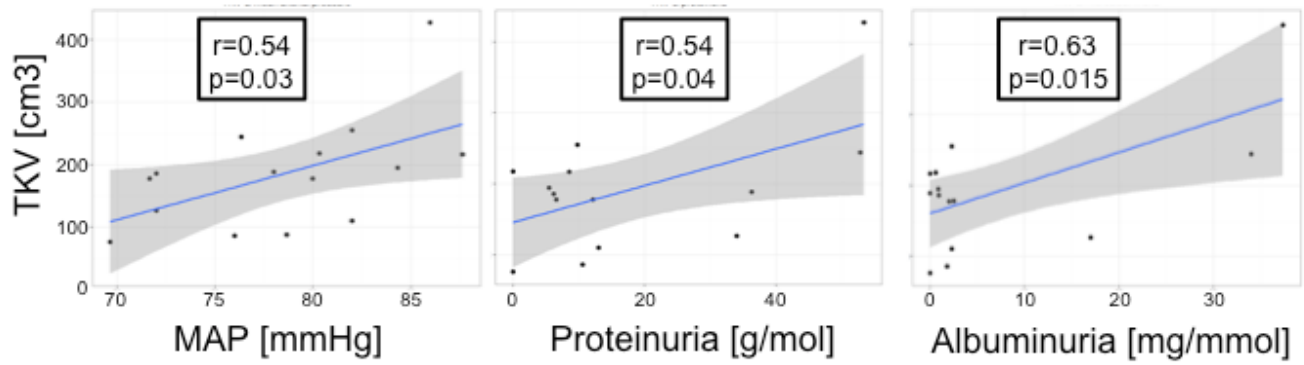


Figure 3. Association between TKV and parameters of renal impairment

Correlation analysis revealed a significant association between Total Kidney Volume (TKV), mean arterial pressure (MAP), proteinuria [g/mol], and albuminuria [mg/mmol].



DISCUSSION GENERALE

Dans cette étude portant sur l'intérêt du NGALu comme marqueur précoce de l'atteinte rénale chez les enfants atteints d'ADPKD, nous espérons améliorer la pratique clinique pédiatrique en y ajoutant un outil para-clinique supplémentaire, permettant non seulement de suivre l'évolution de la maladie mais également d'aider à la décision d'introduire ou non un traitement néphro-protecteur.

Contrairement à notre hypothèse et à plusieurs observations dans la population adulte montrant des valeurs de NGALu supérieures chez les patients ADPKD lorsque comparées à un groupe contrôle (Bolignano et al., 2007; Kawano et al., 2015; Meijer et al., 2010), nous n'avons pas observé de différence significative entre nos deux groupes. Ce résultat concorde cependant avec celui d'une récente étude menée par Vareesangthip et collègues (Vareesangthip et al., 2017).

Parmi les différentes raisons pouvant expliquer cette absence de différence entre les deux groupes, nous évoquons en premier lieu la possibilité que le NGALu ne soit significativement augmenté chez les patients souffrant d'ADPKD qu'à des stades avancés de la maladie avec atteinte déjà importante de la fonction rénale. En effet, dans leur étude parue en 2007 et portant sur des sujets adultes, Bolignano et collègues, rapportent une différence significative entre le NGALu des patients ADPKD par rapport au groupe contrôle, mais le GFR moyen du groupe ADPKD était déjà abaissé (59 ± 38 ml/min/1.73m²) (Bolignano et al., 2007). Ceci révèle un possible intérêt du NGALu comme marqueur de la progression de la maladie à un stade déjà avancé de celle-ci, mais limite son utilisation comme marqueur précoce de la maladie. Toutefois, nous remarquons que dans une étude effectuée chez 102 enfants présentant des néphropathies communes (avec et sans atteintes de la fonction rénale) Nishida et collègues ont démontré que les concentrations de NGALu étaient augmentées chez les patients comparés aux contrôles, y compris chez les patient avec un GFR normal. A contrario, le NGAL plasmatique était uniquement augmenté chez les patients présentant également une atteinte rénale. Aussi les auteurs proposent que contrairement au NGAL plasmatique, le NGALu pourrait être un marqueur précoce de l'atteinte rénale, avant que celle-ci ne se traduise par une baisse du GFR. Toutefois, Nishida et collègues incluent dans leur étude des enfants avec des pathologies très différentes (glomérulonéphrite proliférative, syndrome néphrotique sensible au stéroïdes, tubulopathie) rendant difficile une comparaison directe avec la population spécifique étudiée dans notre étude.

De plus, si le total des enfants inclus est important (N=102), il n'y a pas de groupe spécifiquement atteint d'ADPKD et le nombre de patient avec tubulopathie est faible (N=5). Ce dernier point pourrait donc expliquer la différence avec nos résultats. Finalement, il est important de relever que même si la concentration de NGALu était élevée chez les patients sans atteinte du GFR, Nishida et collègues rapportent tout de même une corrélation inverse entre le GFR et le NGALu, confirmant l'idée que le NGALu augmente au fur et à mesure que la filtration rénale diminue et que, par conséquence, la probabilité de mesurer des valeurs augmentées accroît avec la progression de la maladie. Cette association a par ailleurs été confirmée par plusieurs études qui ont montré une corrélation positive entre les valeurs de NGALu et une péjoration de la fonction rénale (Bolignano et al., 2007; Meijer et al., 2010; Vareesangthip et al., 2017). De plus, dans leur groupe malade, Bolignano et collègues ont montré que les patients présentant une croissance kystiques plus rapide présentaient des concentrations sanguines et urinaires de NGAL significativement augmentées (Bolignano et al., 2007). En conclusion, nous pensons que les jeunes patients inclus dans notre étude étaient à un stade trop précoce de leur maladie pour pouvoir mesurer une augmentation du NGALu, mais que celle-ci pourrait être observée avec l'évolution de la maladie. Il est possible que cette augmentation potentielle intervienne avant une diminution du GFR et puisse alors être le sujet d'investigations ultérieures, en mesurant par exemple de manière longitudinale les valeurs de NGALu et GFR chez des patients ADPKD pendant plusieurs années.

Une explication complémentaire à nos résultats se trouve potentiellement dans la spécificité de l'effet de la maladie kystique sur l'excrétion de NGALu. Effectivement, dans une étude combinant des données animales et cliniques, Parikh et collègues ont démontré une expression élevée de NGAL dans les cellules épithéliales des reins kystiques, mais n'ont pas retrouvé de corrélation entre la concentration de NGALu et la péjoration de la fonction rénale ou l'augmentation du TKV chez des patients ADPKD. Aussi, il semblerait que si la maladie polykystique augmente la sécrétion de NGAL à l'intérieur des kystes, les concentrations urinaires ne sont pas nécessairement augmentées. Pour expliquer ces résultats, les auteurs ont proposé un manque de communication entre les kystes et le système urinaire collecteur (Parikh et al., 2012). Dans cette hypothèse, la maladie polykystique entraînerait une augmentation de la taille du rein, une diminution de sa fonction et une sécrétion de NGAL à l'intérieur des kystes, sans que celle-ci ne puisse être mesurée de manière proportionnelle au niveau urinaire. Ainsi, comme notre étude le suggère, les valeurs de NGALu ne refléteraient pas directement la progression de la maladie

kystique des patients ADPKD et une combinaison avec d'autres paramètres cliniques (e.g. taille du rein) pourraient être plus appropriés.

Pour cette raison, nous avons également cherché à corréler les concentrations de NGALu de nos patients malades avec les marqueurs de progression de la maladie habituellement utilisés en pédiatrie. Nous n'avons pas montré de corrélation entre le NGALu et la protéinurie, l'albuminurie, la tension artérielle moyenne ou le TKV, même lorsque ce dernier était ajusté à la taille. Dans notre échantillon, le NGALu n'était associé à aucun paramètre clinique, confirmant son inutilité à ce stade de la maladie et renforçant l'hypothèse d'une sécrétion de NGAL intrakystique. Cette absence de relation entre la taille des reins et le NGALu est d'ailleurs en adéquation avec la littérature disponible. Effectivement, dans une étude incluant 139 patients ADPKD adultes à un stade précoce de la maladie, aucune association n'a été observée entre la taille des reins et le NGALu (Petzold et al. 2015). Il est cependant important de relever que, dans notre étude, seuls quelques patients présentaient une protéinurie et albuminurie significative (i.e respectivement $>20\text{g/mol}$ et $>2.5\text{mg/mmol}$) ce qui témoigne d'un stade particulièrement précoce de la maladie. Par ailleurs, bien que la prévalence de l'hypertension artérielle soit d'environ 20% dans la population pédiatrique ADPKD (Marlais et al., 2016), nous n'avons pas pu démontrer de différence significative entre les groupes concernant la pression artérielle systolique ou diastolique. Une fois encore, il semblerait que l'état précoce de la maladie dans notre population pédiatrique ait limité une augmentation des valeurs de NGALu. Aussi, nous pouvons conclure que le NGALu ne peut pas être utilisé comme marqueur précoce de la maladie chez les enfants ADPKD.

Si le NGALu n'a pas pu démontrer d'intérêt particulier comme marqueur précoce de l'atteinte rénale, nous avons cependant observé des associations entre le TKV et les autres paramètres cliniques utilisés pour apprécier l'atteinte de la fonction rénale en pédiatrie. Premièrement, comme décrit précédemment par Kistler et collègues (Kistler et al., 2009), l'albuminurie était positivement corrélée au volume rénal. Deuxièmement, la protéinurie était également augmentée en fonction de l'augmentation du TKV, comme précédemment rapporté (Sharp et al., 1998). Finalement, la tension artérielle moyenne, était positivement associée au volume rénal, comme l'ont rapporté Seeman et collègues dans leur étude portant sur 62 enfants atteints d'ADPKD (Seeman et al., 2003b). La mesure du TKV par ultrason à l'aide de la formule ellipsoïdale est une manière efficace, non invasive et peu coûteuse (Breysem et al., 2018; Hwang et al., 2011) d'estimer le volume rénal, la rendant d'autant plus intéressante lorsqu'appliquée à une population

pédiatrique. Par ailleurs, Yu et collègues ont montré que non seulement la mesure basale du TKV, mais également la vitesse de croissance de ce dernier est fortement associée au développement de stades avancés d'atteinte rénale chez les patients atteints d'ADPKD (Yu et al., 2017), lui conférant également un potentiel de marqueur de suivi de la maladie. En d'autres termes, si le NGALu n'a pas démontré son efficacité comme marqueur précoce de la maladie, le TKV semble au contraire un marqueur intéressant pour apprécier de façon précoce la progression de la maladie et notamment l'atteinte de la fonction rénale chez les enfants souffrant d'ADPKD.

Cette étude est la première à investiguer l'utilisation du NGALu comme marqueur précoce de la fonction rénale dans une population ADPKD pédiatrique. Elle présente cependant plusieurs limitations. D'abord, la taille de l'échantillon pourrait théoriquement avoir masqué une différence dans les valeurs de NGALu entre les deux groupes. Cependant, notre calcul de puissance suggère le contraire. De plus, afin de maximiser la sensibilité de notre test, nous avons comparé les valeurs de NGALu du groupe malade à un groupe contrôle apparié pour le sexe et l'âge. Finalement, les analyses bayésiennes ont confirmé l'absence d'effet, prouvant l'hypothèse nulle ($BF=0.39$). Une autre limitation importante concerne la grande variabilité des valeurs de NGALu parmi les participants. Néanmoins, malgré l'exclusion des valeurs extrêmes en utilisant une méthode statistique bien décrite (1.5-fold IQR), la différence entre les groupes restait non significative. Par ailleurs, les valeurs de NGALu de nos groupes se trouvaient dans les valeurs normales décrites par Benett et collègues (Bennett et al., 2015). Ainsi la variabilité interindividuelle du NGALu explique probablement également son manque d'intérêt comme marqueur précoce. Il aurait été intéressant de le doser de façon longitudinale chez les sujets avec plusieurs dosages dans la journée et sur plusieurs jours, afin de non seulement mieux estimer une valeur moyenne individuelle mais également pouvoir évaluer son potentiel comme marqueur de suivi. Le fait que nous n'ayons pas prélevé les sujets au même moment de la journée est également un biais possible. Il semble en effet probable que la mesure sur les premières urines du matin soit plus pertinente, puisque certainement plus concentrée. Partant du postulat que le GFR des patients pédiatriques est habituellement normal (Fick et al., 1994; Karava et al., 2018), nous ne l'avons pas mesuré ici. Si nous l'avions fait, nous aurions pu rechercher des corrélations entre le GFR et le NAGLu ou les marqueurs urinaires usuels de suivi de l'atteinte rénale. Ceci aurait certainement permis de mieux comprendre l'intérêt de ces différents marqueurs, sans changer toutefois notre conclusion puisque nous n'avons pas montré de différences des valeurs de NGALu entre les deux groupes.

En conclusion, notre étude a permis de démontrer l'absence d'intérêt du NGALu comme marqueur précoce de l'atteinte rénale dans une population pédiatrique atteinte d'ADPKD. Nous avons cependant mis en évidence une corrélation significative entre le TKV et les autres marqueurs de suivi de la maladie tels que la protéinurie, l'albuminurie et la tension artérielle moyenne, lui conférant un potentiel de marqueur de progression de la maladie. Ceci a permis de modifier nos guidelines de suivi à Genève puisque nous l'avons ajouté aux autres marqueurs de progression de la maladie déjà utilisés. Il est cependant nécessaire de poursuivre les investigations concernant les marqueurs d'atteinte rénale chez les enfants afin d'offrir à cette population des traitements néphro-protecteurs adaptés et prévenir ainsi peut-être les stades plus avancés d'atteinte rénale. Un suivi longitudinal du TKV associé aux autres paramètres de suivi avec mesure du GFR pourrait permettre de développer un score d'atteinte de la fonction rénale, utile au suivi des enfants présentant un ADPKD et à leur prise en charge. Le NGALu n'a pas montré d'intérêt comme valeur unique mais pourrait présenter un intérêt, combiné aux marqueurs susmentionnés, si mesuré de façon longitudinale.

Bibliographie

- Alam, A., Dahl, N. K., Lipschutz, J. H., Rossetti, S., Smith, P., Sapir, D., et al. (2015). Total Kidney Volume in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: A Biomarker of Disease Progression and Therapeutic Efficacy. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* doi:10.1053/j.ajkd.2015.01.030.
- Antignac, C., Calvet, J. P., Germino, G. G., Grantham, J. J., Guay-Woodford, L. M., Harris, P. C., et al. (2015). The Future of Polycystic Kidney Disease Research-As Seen By the 12 Kaplan Awardees. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 26, 2081–2095. doi:10.1681/ASN.2014121192.
- Audrézet, M.-P., Cornec-Le Gall, E., Chen, J.-M., Redon, S., Quéré, I., Creff, J., et al. (2012). Autosomal dominant polycystic kidney disease: comprehensive mutation analysis of PKD1 and PKD2 in 700 unrelated patients. *Hum. Mutat.* 33, 1239–1250. doi:10.1002/humu.22103.
- Bennett, M. R., Nehus, E., Haffner, C., Ma, Q., and Devarajan, P. (2015). Pediatric reference ranges for acute kidney injury biomarkers. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* 30, 677–685. doi:10.1007/s00467-014-2989-y.
- Bolignano, D., Coppolino, G., Campo, S., Aloisi, C., Nicocia, G., Frisina, N., et al. (2007). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in patients with autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Am. J. Nephrol.* 27, 373–378. doi:10.1159/000103912.
- Breysem, L., De Rechter, S., De Keyzer, F., Smet, M. H., Bammens, B., Van Dyck, M., et al. (2018). 3DUS as an alternative to MRI for measuring renal volume in children with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* doi:10.1007/s00467-017-3862-6.
- Cadnapaphornchai, M. A. (2015). Autosomal dominant polycystic kidney disease in children. *Curr. Opin. Pediatr.* 27, 193–200. doi:10.1097/MOP.0000000000000195.
- Cadnapaphornchai, M. A., George, D. M., McFann, K., Wang, W., Gitomer, B., Strain, J. D., et al. (2014). Effect of pravastatin on total kidney volume, left ventricular mass index, and microalbuminuria in pediatric autosomal dominant polycystic kidney disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* 9, 889–896. doi:10.2215/CJN.08350813.
- Cadnapaphornchai, M. A., McFann, K., Strain, J. D., Masoumi, A., and Schrier, R. W. (2009). Prospective change in renal volume and function in children with ADPKD. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* 4, 820–829. doi:10.2215/CJN.02810608.
- Caroli, A., Perico, N., Perna, A., Antiga, L., Brambilla, P., Pisani, A., et al. (2013). Effect of longacting somatostatin analogue on kidney and cyst growth in autosomal dominant polycystic kidney disease (ALADIN): a randomised, placebo-controlled, multicentre trial. *The Lancet* 382, 1485–1495. doi:10.1016/S0140-6736(13)61407-5.
- Chapman, A. B., Bost, J. E., Torres, V. E., Guay-Woodford, L., Bae, K. T., Landsittel, D., et al. (2012). Kidney volume and functional outcomes in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* 7, 479–486. doi:10.2215/CJN.09500911.
- Chapman, A. B., Guay-Woodford, L. M., Grantham, J. J., Torres, V. E., Bae, K. T., Baumgarten, D. A.,

- et al. (2003). Renal structure in early autosomal-dominant polycystic kidney disease (ADPKD): The Consortium for Radiologic Imaging Studies of Polycystic Kidney Disease (CRISP) cohort. *Kidney Int.* 64, 1035–1045. doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00185.x.
- Chapman, A. B., Johnson, A. M., Gabow, P. A., and Schrier, R. W. (1994). Overt proteinuria and microalbuminuria in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 5, 1349–1354.
- Christophe, C., Cantraine, F., Bogaert, C., Coussement, C., Hanquinet, S., Spehl, M., et al. (1986). Ultrasound: a method for kidney size monitoring in children. *Eur. J. Pediatr.* 145, 532–538.
- De Rechter, S., Breysse, L., and Mekahli, D. (2017). Is Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease Becoming a Pediatric Disorder? *Front. Pediatr.* 5, 272. doi:10.3389/fped.2017.00272.
- Eccles, M. R., and Stayner, C. A. (2014). Polycystic kidney disease – where gene dosage counts. *F1000Prime Rep.* 6. doi:10.12703/P6-24.
- Eceder, T., and Schrier, R. W. (2009). Cardiovascular abnormalities in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol.* 5, 221–228. doi:10.1038/nrneph.2009.13.
- Fick, G. M., Duley, I. T., Johnson, A. M., Strain, J. D., Manco-Johnson, M. L., and Gabow, P. A. (1994). The spectrum of autosomal dominant polycystic kidney disease in children. *J. Am. Soc. Nephrol.* 4, 1654–1660.
- Fick-Brosnahan, G. M., Tran, Z. V., Johnson, A. M., Strain, J. D., and Gabow, P. A. (2001). Progression of autosomal-dominant polycystic kidney disease in children. *Kidney Int.* 59, 1654–1662. doi:10.1046/j.1523-1755.2001.0590051654.x.
- Flynn, J. T., Kaelber, D. C., Baker-Smith, C. M., Blowey, D., Carroll, A. E., Daniels, S. R., et al. (2017). Clinical Practice Guideline for Screening and Management of High Blood Pressure in Children and Adolescents. *Pediatrics* 140. doi:10.1542/peds.2017-1904.
- Gagneux-Brunon, A., Delanaye, P., Legrand, D., Cavalier, E., and Mariat, C. (2012). NGAL, biomarqueur de lésion rénale : point d'étape en 2012. *Néphrologie Thérapeutique* 8, 508–515. doi:10.1016/j.nephro.2012.03.006.
- Grantham, J. J., Chapman, A. B., and Torres, V. E. (2006a). Volume progression in autosomal dominant polycystic kidney disease: the major factor determining clinical outcomes. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* 1, 148–157. doi:10.2215/CJN.00330705.
- Grantham, J. J., Torres, V. E., Chapman, A. B., Guay-Woodford, L. M., Bae, K. T., King, B. F. Jr., et al. (2006b). Volume Progression in Polycystic Kidney Disease. *N. Engl. J. Med.* 354, 2122–2130. doi:10.1056/NEJMoa054341.
- Harris, P. C., and Torres, V. E. (2009). Polycystic kidney disease. *Annu. Rev. Med.* 60, 321–337. doi:10.1146/annurev.med.60.101707.125712.
- Harris, P. C., and Torres, V. E. (2014). Genetic mechanisms and signaling pathways in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J. Clin. Invest.* 124, 2315–2324. doi:10.1172/JCI72272.

- Hateboer, N., v Dijk, M. A., Bogdanova, N., Coto, E., Saggar-Malik, A. K., San Millan, J. L., et al. (1999). Comparison of phenotypes of polycystic kidney disease types 1 and 2. European PKD1-PKD2 Study Group. *Lancet Lond. Engl.* 353, 103–107.
- Helal, I., Reed, B., McFann, K., Yan, X.-D., Fick-Brosnahan, G. M., Cadnapaphornchai, M., et al. (2011a). Glomerular hyperfiltration and renal progression in children with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* 6, 2439–2443. doi:10.2215/CJN.01010211.
- Hwang, H. S., Yoon, H. E., Park, J. H., Chun, H. J., Park, C. W., Yang, C. W., et al. (2011). Noninvasive and direct measures of kidney size in kidney donors. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* 58, 266–271. doi:10.1053/j.ajkd.2011.02.392.
- Karava, V., Benzouid, C., Hogan, J., Dossier, C., Denjean, A. P., and Deschênes, G. (2018). Early cardiovascular manifestations in children and adolescents with autosomal dominant polycystic kidney disease: a single center study. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* 33, 1513–1521. doi:10.1007/s00467-018-3964-9.
- Kawano, H., Muto, S., Ohmoto, Y., Iwata, F., Fujiki, H., Mori, T., et al. (2015). Exploring urinary biomarkers in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Clin. Exp. Nephrol.* 19, 968–973. doi:10.1007/s10157-014-1078-7.
- Kistler, A. D., Poster, D., Krauer, F., Weishaupt, D., Raina, S., Senn, O., et al. (2009). Increases in kidney volume in autosomal dominant polycystic kidney disease can be detected within 6 months. *Kidney Int.* 75, 235–241. doi:10.1038/ki.2008.558.
- Lespinasse, J., Fourcade, J., and Schir, F. (2006). [Polycystic kidney diseases: molecular genetics and counselling]. *Néphrologie Thérapeutique* 2, 120–126. doi:10.1016/j.nephro.2006.03.001.
- Lumiaho, A., Ikäheimo, R., Miettinen, R., Niemitukia, L., Laitinen, T., Rantala, A., et al. (2001). Mitral valve prolapse and mitral regurgitation are common in patients with polycystic kidney disease type 1. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* 38, 1208–1216. doi:10.1053/ajkd.2001.29216.
- Ma, M., Tian, X., Igarashi, P., Pazour, G. J., and Somlo, S. (2013). Loss of cilia suppresses cyst growth in genetic models of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat. Genet.* 45, 1004–1012. doi:10.1038/ng.2715.
- Marlais, M., Cuthell, O., Langan, D., Dudley, J., Sinha, M. D., and Winyard, P. J. D. (2016). Hypertension in autosomal dominant polycystic kidney disease: a meta-analysis. *Arch. Dis. Child.* 101, 1142–1147. doi:10.1136/archdischild-2015-310221.
- Meijer, E., Boertien, W. E., Nauta, F. L., Bakker, S. J. L., van Oeveren, W., Rook, M., et al. (2010). Association of Urinary Biomarkers With Disease Severity in Patients With Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: A Cross-sectional Analysis. *Am. J. Kidney Dis.* 56, 883–895. doi:10.1053/j.ajkd.2010.06.023.
- Mishra, J., Dent, C., Tarabishi, R., Mitsnefes, M. M., Ma, Q., Kelly, C., et al. (2005). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet Lond. Engl.* 365, 1231–1238. doi:10.1016/S0140-6736(05)74811-X.

- Mishra, J., Ma, Q., Prada, A., Mitsniefes, M., Zahedi, K., Yang, J., et al. (2003). Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 14, 2534–2543.
- Morey, R. D., and Rouder, J. N. (2011). Bayes factor approaches for testing interval null hypotheses. *Psychol. Methods* 16, 406–419. doi:10.1037/a0024377.
- Müller, R.-U., and Benzing, T. (2018). Management of autosomal-dominant polycystic kidney disease—state-of-the-art. *Clin. Kidney J.* 11, i2–i13. doi:10.1093/ckj/sfy103.
- Mustafa, R. A., and Yu, A. S. L. (2018). Burden of Proof for Tolvaptan in ADPKD: Did REPRISÉ Provide the Answer? *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 1107–1109. doi:10.2215/CJN.00190118.
- Nicolau, C., Torra, R., Badenas, C., Vilana, R., Bianchi, L., Gilabert, R., et al. (1999). Autosomal dominant polycystic kidney disease types 1 and 2: assessment of US sensitivity for diagnosis. *Radiology* 213, 273–276. doi:10.1148/radiology.213.1.r99oc05273.
- Nishida, M., Kawakatsu, H., Okumura, Y., and Hamaoka, K. (2010). Serum and urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels in children with chronic renal diseases. *Pediatr. Int. Off. J. Jpn. Pediatr. Soc.* 52, 563–568. doi:10.1111/j.1442-200X.2010.03067.x.
- O'Neill, W. C., Robbin, M. L., Bae, K. T., Grantham, J. J., Chapman, A. B., Guay-Woodford, L. M., et al. (2005). Sonographic assessment of the severity and progression of autosomal dominant polycystic kidney disease: the Consortium of Renal Imaging Studies in Polycystic Kidney Disease (CRISP). *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* 46, 1058–1064. doi:10.1053/j.ajkd.2005.08.026.
- Ong, A. C. M., Devuyst, O., Knebelmann, B., Walz, G., and ERA-EDTA Working Group for Inherited Kidney Diseases (2015). Autosomal dominant polycystic kidney disease: the changing face of clinical management. *Lancet Lond. Engl.* 385, 1993–2002. doi:10.1016/S0140-6736(15)60907-2.
- Parikh, C. R., Dahl, N. K., Chapman, A., Bost, J. E., Edelstein, C. L., Comer, D. M., et al. (2012). Evaluation of urine biomarkers of kidney injury in Polycystic Kidney Disease. *Kidney Int.* 81, 784–790. doi:10.1038/ki.2011.465.
- Perrone, R. D., Mouksassi, M.-S., Romero, K., Czerwiec, F. S., Chapman, A. B., Gitomer, B. Y., et al. (2017). Total Kidney Volume Is a Prognostic Biomarker of Renal Function Decline and Progression to End-Stage Renal Disease in Patients With Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Kidney Int. Rep.* 2, 442–450. doi:10.1016/j.ekir.2017.01.003.
- Petzold, K., Poster, D., Krauer, F., Spanaus, K., Andreisek, G., Nguyen-Kim, T. D. L., et al. (2015). Urinary biomarkers at early ADPKD disease stage. *PloS One* 10, e0123555. doi:10.1371/journal.pone.0123555.
- Reddy, B. V., and Chapman, A. B. (2017). The spectrum of autosomal dominant polycystic kidney disease in children and adolescents. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* 32, 31–42. doi:10.1007/s00467-016-3364-y.
- Reed, B., McFann, K., Kimberling, W. J., Pei, Y., Gabow, P. A., Christopher, K., et al. (2008). Presence

- of de novo mutations in autosomal dominant polycystic kidney disease patients without family history. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* 52, 1042–1050. doi:10.1053/j.ajkd.2008.05.015.
- Seeman, T., Dusek, J., Vondrichová, H., Kyncl, M., John, U., Misselwitz, J., et al. (2003). Ambulatory blood pressure correlates with renal volume and number of renal cysts in children with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Blood Press. Monit.* 8, 107–110. doi:10.1097/01.mbp.0000085762.28312.4a.
- Sessa, A., Ghiggeri, G. M., and Turco, A. E. (1997). Autosomal dominant polycystic kidney disease: clinical and genetic aspects. *J. Nephrol.* 10, 295–310.
- Shamshirsaz, A. A., Shamshirsaz, A., Reza Bekheirnia, M., Bekheirnia, R. M., Kamgar, M., Johnson, A. M., et al. (2005). Autosomal-dominant polycystic kidney disease in infancy and childhood: progression and outcome. *Kidney Int.* 68, 2218–2224. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00678.x.
- Shapiro, S. S., and Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52, 591–611. doi:10.1093/biomet/52.3-4.591.
- Sharp, C., Johnson, A., and Gabow, P. (1998). Factors relating to urinary protein excretion in children with autosomal dominant polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 9, 1908–1914.
- Singer, E., Markó, L., Paragas, N., Barasch, J., Dragun, D., Müller, D. N., et al. (2013). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: pathophysiology and clinical applications. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* 207, 663–672. doi:10.1111/apha.12054.
- Torres, V. E., Harris, P. C., and Pirson, Y. (2007). Autosomal dominant polycystic kidney disease. *Lancet Lond. Engl.* 369, 1287–1301. doi:10.1016/S0140-6736(07)60601-1.
- Torres, V. E., Meijer, E., Bae, K. T., Chapman, A. B., Devuyst, O., Gansevoort, R. T., et al. (2011). Rationale and design of the TEMPO (Tolvaptan Efficacy and Safety in Management of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease and its Outcomes) 3-4 Study. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* 57, 692–699. doi:10.1053/j.ajkd.2010.11.029.
- Vareesangthip, K., Vareesangthip, K., Limwongse, C., and Reesukumal, K. (2017). Role of Urinary Neutrophil Gelatinase–Associated Lipocalin for Predicting the Severity of Renal Functions in Patients With Autosomal-Dominant Polycystic Kidney Disease. *Transplant. Proc.* 49, 950–954. doi:10.1016/j.transproceed.2017.03.061.
- Wilson, P. D. (2004). Polycystic kidney disease. *N. Engl. J. Med.* 350, 151–164. doi:10.1056/NEJMra022161.
- Yoder, B. K. (2007). Role of primary cilia in the pathogenesis of polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 18, 1381–1388. doi:10.1681/ASN.2006111215.
- Yu, A. S. L., Shen, C., Landsittel, D. P., Harris, P. C., Torres, V. E., Mrug, M., et al. (2017). Baseline total kidney volume and the rate of kidney growth are associated with chronic kidney disease progression in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Kidney Int.* doi:10.1016/j.kint.2017.09.027.