

Année 2023/2024

N°

Thèse

Pour le
DOCTORAT EN MEDECINE
Diplôme d'État
par

Marion PRONOST

Née le 09/11/1995 à Plœmeur (56)

TITRE

LAMCAK : Rôle de la cathepsine K dans la lymphangioléiomyomatose

Présentée et soutenue publiquement le **23/05/2024** date devant un jury composé de :

Président du Jury : Professeur François MAILLOT, Médecine interne et immunologie clinique, PU, Faculté de Médecine - Tours

Membres du Jury :

Docteur Sylvie LEGUÉ, Pneumologie, PH – Tours

Docteur Thomas FLAMENT, Pneumologie, PH – Tours

Docteur Marion FERREIRA, Pneumologie, CCA, Faculté de Médecine – Tours

Directeur de thèse : Professeur Sylvain MARCHAND-ADAM, Pneumologie, PU, Faculté de Médecine – Tours

Collaborateurs : Professeur Gilles LALMANACH, UMR INSERM 1100 – Tours
Professeur Fabien LECAILLE, UMR INSERM 1100 – Tours

UNIVERSITE DE TOURS
FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

DOYEN

Pr Patrice DIOT

VICE-DOYEN

Pr Henri MARRET

ASSESSEURS

Pr Denis ANGOULVANT, *Pédagogie*

Pr Mathias BUCHLER, *Relations internationales*

Pr Theodora BEJAN-ANGOULVANT, *Moyens – relations avec l'Université*

Pr Clarisse DIBAO-DINA, *Médecine générale*

Pr François MAILLOT, *Formation Médicale Continue*

Pr Patrick VOUREC'H, *Recherche*

RESPONSABLE ADMINISTRATIVE

Mme Carole ACCOLAS

DOYENS HONORAIRES

Pr Emile ARON (†) – 1962-1966

Directeur de l'Ecole de Médecine - 1947-1962

Pr Georges DESBUQUOIS (†) – 1966-1972

Pr André GOUAZE (†) – 1972-1994

Pr Jean-Claude ROLLAND – 1994-2004

Pr Dominique PERROTIN – 2004-2014

PROFESSEURS EMERITES

Pr Daniel ALISON

Pr Gilles BODY

Pr Philippe COLOMBAT

Pr Etienne DANQUECHIN-DORVAL

Pr Luc FAVARD

Pr Bernard FOUQUET

Pr Yves GRUEL

Pr Gérard LORETTE

Pr Loïc VAILLANT

PROFESSEURS HONORAIRES

P. ANTHONIOZ – P. ARBEILLE – A. AUDURIER – A. AUTRET – C. BARTHELEMY – J.L. BAULIEU – C. BERGER – JC. BESNARD – P. BEUTTER – C. BONNARD – P. BONNET – P. BOUGNOUX – P. BURDIN – L. CASTELLANI – J. CHANDENIER – A. CHANTEPIE – B. CHARBONNIER – P. CHOUTET – T. CONSTANS – C. COUET – L. DE LA LANDE DE CALAN – P. DUMONT – J.P. FAUCHIER – F. FETISSOF – J. FUSCIARDI – P. GAILLARD – G. GINIES – D. GOGA – A. GOUDEAU – J.L. GUILMOT – O. HAILLOT – N. HUTEN – M. JAN – J.P. LAMAGNERE – F. LAMISSE – Y. LANSON – O. LE FLOCH – Y. LEBRANCHU – E. LECA – P. LECOMTE – AM. LEHR-DRYLEWICZ – E. LEMARIE – G. LEROY – M. MARCHAND – C. MAURAGE – C. MERCIER – J. MOLINE – C. MORAIN – J.P. MUH – J. MURAT – H. NIVET – D. PERROTIN – L. POURCELOT – R. QUENTIN – P. RAYNAUD – D. RICHARD-LENOBLE – A. ROBIER – J.C. ROLLAND – P. ROSSET – D. ROYERE – A. SAINDELLE – E. SALIBA – J.J. SANTINI – D. SAUVAGE – D. SIRINELLI – J. WEILL

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

ANDRES Christian.....	Biochimie et biologie moléculaire
ANGOULVANT Denis	Cardiologie
APETOH Lionel	Immunologie
AUPART Michel.....	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
BABUTY Dominique	Cardiologie
BACLE Guillaume.....	Chirurgie orthopédique et traumatologique
BAKHOS David	Oto-rhino-laryngologie
BALLON Nicolas.....	Psychiatrie ; addictologie
BARBIER François.....	Médecine intensive et réanimation
BARILLOT Isabelle	Cancérologie ; radiothérapie
BARON Christophe	Immunologie
BEJAN-ANGOULVANT Théodora	Pharmacologie clinique
BERHOUE Julien	Chirurgie orthopédique et traumatologique
BERNARD Anne	Cardiologie
BERNARD Louis	Maladies infectieuses et maladies tropicales
BLANCHARD-LAUMONNIER Emmanuelle	Biologie cellulaire
BLASCO Hélène.....	Biochimie et biologie moléculaire
BONNET-BRILHAULT Frédérique	Physiologie
BOURGUIGNON Thierry	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
BRILHAULT Jean.....	Chirurgie orthopédique et traumatologique
BRUNEREAU Laurent	Radiologie et imagerie médicale
BRUYERE Franck.....	Urologie
BUCHLER Matthias.....	Néphrologie
CAILLE Agnès	Biostat., informatique médical et technologies de communication
CALAIS Gilles.....	Cancérologie, radiothérapie
CAMUS Vincent.....	Psychiatrie d'adultes
CORCIA Philippe.....	Neurologie
COTTIER Jean-Philippe	Radiologie et imagerie médicale
DEQUIN Pierre-François.....	Thérapeutique
DESMIDT Thomas	Psychiatrie
DESOUBEUX Guillaume.....	Parasitologie et mycologie
DESTRIEUX Christophe	Anatomie
DI GUISTO Caroline	Gynécologie obstétrique
DIOT Patrice.....	Pneumologie
DU BOUEXIC de PINIEUX Gonzague	Anatomie & cytologie pathologiques
DUCLUZEAU Pierre-Henri.....	Endocrinologie, diabétologie, et nutrition
EHRMANN Stephan	Médecine intensive – réanimation
EL HAGE Wissam.....	Psychiatrie adultes
ELKRIEF Laure.....	Hépatologie – gastroentérologie
ESPITALIER Fabien.....	Anesthésiologie et réanimation, médecine d'urgence
FAUCHIER Laurent	Cardiologie
FOUGERE Bertrand	Gériatrie
FRANCOIS Patrick.....	Neurochirurgie
FROMONT-HANKARD Gaëlle	Anatomie & cytologie pathologiques
GATAULT Philippe.....	Néphrologie
GAUDY-GRAFFIN Catherine.....	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
GOUPILLE Philippe	Rhumatologie
GUERIF Fabrice	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
GUILLON Antoine.....	Médecine intensive – réanimation
GUILLON-GRAMMATICO Leslie.....	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
GUYETANT Serge	Anatomie et cytologie pathologiques
GYAN Emmanuel.....	Hématologie, transfusion
HALIMI Jean-Michel.....	Thérapeutique
HANKARD Régis.....	Pédiatrie
HERAULT Olivier	Hématologie, transfusion
HERBRETEAU Denis	Radiologie et imagerie médicale
HOURIOUX Christophe.....	Biologie cellulaire
IVANES Fabrice	Physiologie
LABARTHE François	Pédiatrie
LAFFON Marc	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale, médecine d'urgence
LARDY Hubert.....	Chirurgie infantile
LARIBI Saïd.....	Médecine d'urgence
LARTIGUE Marie-Frédérique	Bactériologie-virologie
LAURE Boris.....	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
LECOMTE Thierry.....	Gastroentérologie, hépatologie

LEGRAS Antoine.....	Chirurgie thoracique
LESCANNE Emmanuel.....	Oto-rhino-laryngologie
LEVESQUE Éric.....	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale, médecine d'urgence
LINASSIER Claude	Cancérologie, radiothérapie
MACHET Laurent	Dermato-vénéréologie
MAILLOT François	Médecine interne
MARCHAND-ADAM Sylvain	Pneumologie
MARRET Henri	Gynécologie-obstétrique
MARUANI Annabel	Dermatologie-vénéréologie
MEREGHETTI Laurent.....	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
MITANCHEZ Delphine	Pédiatrie
MOREL Baptiste	Radiologie pédiatrique
MORINIERE Sylvain.....	Oto-rhino-laryngologie
MOUSSATA Driffa	Gastro-entérologie
MULLEMAN Denis.....	Rhumatologie
ODENT Thierry.....	Chirurgie infantile
OUAÏSSI Mehdi	Chirurgie digestive
OULDAMER Lobna	Gynécologie-obstétrique
PAINTAUD Gilles	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
PATAT Frédéric	Biophysique et médecine nucléaire
PERROTIN Franck	Gynécologie-obstétrique
PISELLA Pierre-Jean.....	Ophtalmologie
PLANTIER Laurent.....	Physiologie
REMERAND Francis	Anesthésiologie et réanimation, médecine d'urgence
ROINGEARD Philippe.....	Biologie cellulaire
RUSCH Emmanuel.....	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
SAINT-MARTIN Pauline.....	Médecine légale et droit de la santé
SALAME Ephrem.....	Chirurgie digestive
SAMIMI Mahtab	Dermatologie-vénéréologie
SANTIAGO-RIBEIRO Maria	Biophysique et médecine nucléaire
SAUTENET-BIGOT Bénédicte	Thérapeutique
THOMAS-CASTELNAU Pierre	Pédiatrie
TOUTAIN Annick.....	Génétique
VELUT Stéphane.....	Anatomie
VOURC'H Patrick.....	Biochimie et biologie moléculaire
WATIER Hervé	Immunologie
ZEMMOURA Ilyess	Neurochirurgie

PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

DIBAO-DINA Clarisse
LEBEAU Jean-Pierre

PROFESSEURS ASSOCIES

MALLET Donatien

PROFESSEUR CERTIFIE DU 2ND DEGRE

MC CARTHY Catherine.....

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

AUDEMARD-VERGER Alexandra	Médecine interne
BISSON Arnaud	Cardiologie (CHRO)
BRUNAUT Paul	Psychiatrie d'adultes, addictologie
CARVAJAL-ALLEGRIA Guillermo	Rhumatologie (au 01/10/2021)
CLEMENTY Nicolas	Cardiologie
DOMELIER Anne-Sophie	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
DUFOUR Diane	Biophysique et médecine nucléaire
FOUQUET-BERGEMER Anne-Marie.....	Anatomie et cytologie pathologiques
GARGOT Thomas	Pédopsychiatrie
GOUILLEUX Valérie.....	Immunologie
HOARAU Cyrille	Immunologie
KERVAREC Thibault	Anatomie et cytologie pathologiques
LE GUELLEC Chantal.....	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
LEDUCQ Sophie	Dermatologie
LEFORT Bruno	Pédiatrie
LEJEUNE Julien	Hématologie, transfusion
LEMAIGNEN Adrien	Maladies infectieuses
MACHET Marie-Christine	Anatomie et cytologie pathologiques
MOUMNEH Thomas	Médecine d'urgence
PARE Arnaud.....	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
PIVER Éric.....	Biochimie et biologie moléculaire
ROUMY Jérôme	Biophysique et médecine nucléaire
STANDLEY-MIQUELESTORENA Elodie	Anatomie et cytologie pathologiques
STEFIC Karl	Bactériologie
TERNANT David.....	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
VAYNE Caroline	Hématologie, transfusion
VUILLAUME-WINTER Marie-Laure.....	Génétique

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

AGUILLON-HERNANDEZ Nadia.....	Neurosciences
NICOGLU Antonine	Philosophie – histoire des sciences et des techniques
PATIENT Romuald.....	Biologie cellulaire
RENOUX-JACQUET Cécile	Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES

AUMARECHAL Alain	Médecine Générale
BARBEAU Ludivine.....	Médecine Générale
CHAMANT Christelle	Médecine Générale
ETTORI Isabelle.....	Médecine Générale
MOLINA Valérie	Médecine Générale
PAUTRAT Maxime	Médecine Générale
PHILIPPE Laurence.....	Médecine Générale
RUIZ Christophe.....	Médecine Générale
SAMKO Boris.....	Médecine Générale

CHERCHEURS INSERM - CNRS - INRAE

BECKER Jérôme.....	Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253
BOUAKAZ Ayache	Directeur de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253
BOUTIN Hervé.....	Directeur de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253
BRIARD Benoit.....	Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1100
CHALON Sylvie	Directrice de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253
DE ROCQUIGNY Hugues	Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1259
ESCOFFRE Jean-Michel.....	Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253
GILOT Philippe.....	Chargé de Recherche Inrae – UMR Inrae 1282
GOMOT Marie.....	Chargée de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253
GOUILLEUX Fabrice	Directeur de Recherche CNRS – EA 7501 - ERL CNRS 7001
GUEGUINOU Maxime.....	Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1069
HEUZE-VOURCH Nathalie.....	Directrice de Recherche Inserm – UMR Inserm 1100
KORKMAZ Brice.....	Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1100
LATINUS Marianne.....	Chargée de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253
LAUMONNIER Frédéric	Directeur de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253
LE MERRER Julie	Directrice de Recherche CNRS – UMR Inserm 1253
MAMMANO Fabrizio.....	Directeur de Recherche Inserm – UMR Inserm 1259
MEUNIER Jean-Christophe	Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1259
PAGET Christophe	Directeur de Recherche Inserm – UMR Inserm 1100
RAOUL William	Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1069
SECHER Thomas.....	Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1100
SI TAHAR Mustapha	Directeur de Recherche Inserm – UMR Inserm 1100
SUREAU Camille	Directrice de Recherche émérite CNRS – UMR Inserm 1259
TANTI Arnaud	Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253
WARDAK Claire.....	Chargée de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

Pour l'éthique médicale

BIRMELE Béatrice.....Praticien Hospitalier

Pour la médecine manuelle et l'ostéopathie médicale

LAMANDE Marc.....Praticien Hospitalier

Pour l'orthophonie

BATAILLE Magalie.....Orthophoniste
CLOUTOUR Nathalie.....Orthophoniste
CORBINEAU Mathilde.....Orthophoniste
EL AKIKI Carole.....Orthophoniste
HARIVEL OUALLI Ingrid.....Orthophoniste
IMBERT Mélanie.....Orthophoniste
SIZARET Eva.....Orthophoniste

Pour l'orthoptie

BOULNOIS Sandrine.....Orthoptiste

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des enseignants et enseignantes
de cette Faculté,
de mes chers condisciples
et selon la tradition d'Hippocrate,
je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur
et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits aux indigents,
et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis(e) dans l'intérieur des maisons, mes yeux
ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira
les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas
à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Respectueux(euse) et reconnaissant(e) envers mes Maîtres,
je rendrai à leurs enfants
l'instruction que j'ai reçue de leurs parents.

Que les hommes et les femmes m'accordent leur estime
si je suis fidèle à mes promesses.
Que je sois couvert(e) d'opprobre
et méprisé(e) de mes confrères et consœurs
si j'y manque.

Remerciements

Aux membres du jury :

Monsieur le Professeur François Maillot, je tiens à vous remercier de me faire l'honneur de présider ce jury.

À monsieur le Professeur Sylvain Marchand-Adam pour votre accueil dans la région Centre, merci pour votre encadrement et votre disponibilité tout au long de ce projet de thèse et de mon internat.

Au Docteur Sylvie Legué, merci pour ton soutien depuis ce premier jour d'internat. Cela a toujours été un vrai plaisir de travailler avec toi. Après avoir été co-interne, je t'ai vu devenir CCA puis PH en toute simplicité. Tu as été un vrai repère et modèle depuis mon premier semestre. Je te souhaite le meilleur pour la suite.

Au Docteur Marion Ferreira, je pourrais te faire un roman entier de remerciement. J'ai eu la chance de réaliser cette année recherche à tes côtés. Depuis, ton soutien absolument sans faille et ta motivation inébranlable sont une vraie richesse pour moi. Merci pour tout ce que tu as pu me transmettre.

Au Docteur Thomas Flament, pour ton enthousiasme naturel, merci de nous transmettre au quotidien ta détermination et ta rigueur dans la prise en charge des patients. Je te remercie aussi pour ta disponibilité sur la ligne directe « SOS pneumologie ».

Aux membres du laboratoire du CEPR :

Je tiens à remercier les membres du CEPR, notamment le Pr Fabien Lecaille et le Pr Gilles Lalmanach pour leur aide dans la création et la mise en place de ce projet. Merci à Roxane, Thibault, Christelle, Lilou, Alexis et tous ceux qui m'ont aidé à découvrir les mystères de la recherche. Vous avez pu partager mes déchéances et mes joies à l'issue de toutes ces expériences réalisées sur la fin de mon master 2 et durant les semestres d'internat qui ont suivis.

Table des matières

Contexte et implication dans l'étude	12
Résumé	14
Abbreviations	15
Abstract	16
Introduction	17
Materials and methods	19
LAMCAK.....	19
Study population.....	19
Samples collection.....	19
Sample analysis	20
Data collection.....	22
Statistical analysis.....	22
Ethics	23
Results	24
Study population.....	24
Urine samples analysis	25
Discussion	27
Bibliography.....	34
Table.....	37
Figures	38
Appendix	42

Contexte et implication dans l'étude

L'envie de travailler sur les pathologies pulmonaires de la femme est née au décours d'un congrès à Brest sur le sujet. J'ai ainsi contacté le Pr Marchand-Adam qui m'a proposé ce projet sur l'étude de la cathepsine K dans la physiopathologie de la lymphangioléiomyomatose.

L'étude a pu être mise en place au sein de l'équipe 2 du centre d'étude des pathologies respiratoires (CEPR) avec la collaboration des Pr Lalmanach Gilles et Pr Lecaille Fabien. Nous avons ainsi construit ensemble le protocole pour le comité de protection des personnes et obtenu l'avis favorable le 15/04/2022. L'étude a été enregistrée en accès libre sur ClinicalTrials.gov (identifiant NCT05323370) le 12/04/2022 et la première inclusion, à Tours, a eu lieu le 31/05/2022.

Le promoteur de l'étude est Monsieur Julien Le Bonniec, direction des affaires médicales du CHU de Tours. L'investigateur principal est le Pr Sylvain Marchand-Adam, service de Pneumologie et d'explorations fonctionnelles respiratoires du CHU de Tours. L'étude a été dotée d'un financement par les associations Nouveau Souffle et France LymphAngioleioMyomatose. Il s'agit d'une étude non interventionnelle.

Durant mon année recherche, réalisée sur un autre sujet au CEPR, au sein de l'équipe 3, nous avons pu inclure les patientes atteintes d'une lymphangioléiomyomatose, dans la plus part des cas au décours des consultations de suivi au CHRU de Tours. Une patiente a été incluse lors de son hospitalisation pour un pneumothorax. Après explication du protocole de l'étude et acceptation de participation, je remplissais le cahier d'observation avec les patientes. J'ai pu également avoir accès aux données des patientes incluses sur Tours afin de compléter le recueil. Les volontaires saines ont été incluses avec l'aide du centre d'investigation clinique. Je récupérais le jour même les échantillons d'urine. Pour ce qui est des prélèvements des urines des 24h, les patientes rapportaient leur prélèvement dans la semaine suivant la consultation.

Nous avons ainsi pu inclure 12 patientes avec une lymphangioléiomyomatose et 9 femmes volontaires saines.

Après le recueil des échantillons, je les amenais au laboratoire pour les préparer avant stockage à -80°C. J'ai réalisé moi-même les différentes expériences au CEPR, notamment les différents ELISA ou encore les westerns blot.

La quantification du volume des kystes pulmonaires a été possible grâce au logiciel 3D slicer© découvert par le Dr Arthur Pearson, PH en radiologie au CHU de Tours. J'ai ainsi pu analyser avec cet outil les deux derniers scanners thoraciques pour chaque patiente atteinte d'une lymphangioléiomyomatose, seule une patiente n'avait réalisé qu'un scanner.

Après obtention des résultats des différents ELISA et western blot, des quantifications du volume kystique pulmonaire, nous les avons revus avec le Pr Marchand-Adam afin de les interpréter au mieux. Nous avons ainsi réalisé les statistiques grâce au logiciel GraphPad©.

Des résultats préliminaires ont été présentés en congrès au CPLF (Congrès de Pneumologie de Langue Française) à Lille en janvier 2024. Nous avons également publié avec le Pr Marchand-Adam, Pr Lalmanach, Pr Lecaille et Mme Alhame Saidi un article sur la place de la cathepsine K dans la lymphangioléiomyomatose. J'ai pour ceci participé à la rédaction de la partie clinique.

La rédaction de cette thèse en anglais et sous format d'article scientifique a été motivée par le projet d'une soumission dans une revue anglophone à l'issue de la soutenance. Le manuscrit a été relu avec l'aide du Pr Sylvain Marchand-Adam, puis avec l'aide du Dr Betsega Bayeh, docteur junior dans le service de pneumologie du CHRU de Tours, pour orthographe et syntaxe.

Résumé

Contexte : La lymphangioléiomyomatose (LAM) est une maladie systémique rare de la femme jeune, responsable d'une destruction kystique pulmonaire, d'angiomyolipomes rénaux et possiblement d'ostéoporose. Une surexpression pulmonaire de cathepsine K (catK) a été démontrée en regard de nodules de LAM. Notre hypothèse est que cette protéase aurait un rôle central dans la physiopathologie de la LAM en favorisant la destruction kystique pulmonaire, la prolifération des angiomyolipomes et la dégradation osseuse.

Méthodes : L'objectif principal est de mesurer au niveau urinaire la catK, ainsi que son inhibiteur, la cystatine C, et les N-télopeptides de collagène (NTX) chez des patientes atteintes de LAM (n = 12) en comparant leurs dosages à ceux de patientes volontaires saines (n = 9) dans une étude prospective, monocentrique, translationnelle réalisée au CHU de Tours.

Résultats : La quantité de catK est significativement plus importante dans le groupe LAM ($p = 0,04$), sans être corrélée à la sévérité de l'atteinte pulmonaire, traduite par l'abondance des kystes ($p = 0,49$; $Rho = -0,22$) ou la valeur du VEMS ($p = 0,85$; $Rho = -0,06$). Il existe une tendance à une augmentation du taux de NTX chez les patientes LAM ($p = 0,08$) ainsi qu'une corrélation significative avec la quantité de catK ($p = 0,01$; $Rho = 0,61$). Nous constatons une corrélation significative entre le taux de catK et le T-score fémoral de déminéralisation osseuse ($p = 0,046$; $Rho = 0,74$) mais pas avec le T-score rachidien ($p = 0,24$; $Rho = 0,47$). Il n'existe pas de différence significative de quantité de cystatine C entre les deux groupes.

Conclusion : Dans cette étude exploratoire, nous avons montré que la catK est présente en plus grande quantité chez les patientes atteintes de LAM, avec une tendance à une suractivité traduite par une augmentation des NTX. La principale limite de notre étude est son faible effectif, un essai de plus grande ampleur pourrait permettre de mieux comprendre le rôle de cette protéase dans la physiopathologie de la LAM et d'ouvrir sur de nouvelles possibilités thérapeutiques.

Mots clés : lymphangioléiomyomatose, cathepsine K, N-télopeptides de collagène, cystatine C

Abbreviations

CatK	:	Cathepsin K
CEPR	:	Centre d'Etudes des Pathologies Respiratoires
CIC	:	Centre Investigation Clinique
DLCO	:	Diffusing capacity of the Lungs for Carbon monoxide
FEV1	:	Forced Expiratory Volume in 1 second
IQR	:	Interquartile range
LAFs	:	LAM associated fibroblasts
LAM	:	Lymphangioleiomyomatosis
NTX	:	N-terminal telopeptides
TSC	:	Tuberous sclerosis complex
VEGF-D	:	Vascular endothelial growth factor-D

Abstract

Background: Lymphangioleiomyomatosis (LAM) is a rare systemic disease affecting young women, responsible for pulmonary cystic destruction, renal angiomyolipomas and possibly osteoporosis. Histologically, there is an overexpression of cathepsin K (catK) along abnormal smooth muscle cells, LAM cells. Our hypothesis is that this protease plays a key role in the pathogenesis of LAM by promoting pulmonary cystic destruction, angiomyolipoma proliferation and bone degradation.

Methods: The main objective was to measure catK, its inhibitor cystatin C and collagen N-telopeptides (NTX) in urines samples of LAM patients (N=12), and compare them with those of healthy volunteer patients (n=9) in a prospective, monocentric, translational study carried out at Tours University Hospital.

Results: The amount of catK, detected by immunoblotting, was significantly higher in the LAM group ($p = 0.04$). Its level does not correlate with the severity of lung involvement, as measured by cyst abundance ($p = 0.49$; $Rho = -0.22$) or FEV1 value ($p=0.85$; $Rho = -0.06$). NTX levels tended to be higher in LAM patients ($p = 0.08$) and correlated significantly with the amount of catK ($p = 0.01$; $Rho = 0.61$). Regarding bone demineralization, catK level was significantly correlated to femoral T-score ($p = 0.046$; $Rho = 0.74$) but not spinal T-score ($p = 0.24$; $Rho = 0.47$). Cystatin C levels were similar in both groups.

Conclusion: In this exploratory study, we showed that catK is present in greater quantities in patients with LAM, with a tendency towards overactivity through increased NTX. The main limitation of our study is its small population. A larger-scale study of catK and LAM will provide new pathophysiological answers to open the doors to new therapeutic possibilities.

Keywords: lymphangioleiomyomatosis ; cathepsin K ; N-terminal telopeptides ; cystatin C

LAMCAK: Role of cathepsin K in lymphangioleiomyomatosis

Marion Pronost¹⁻², Fabien Lecaille², Lise Vanderlynden², Gilles Lalmanach², Sylvain Marchand-Adam¹⁻².

¹. Pulmonology and Respiratory Functional Investigation Department, University Hospital of Tours

². Center for the study of respiratory pathologies, team 2, “Proteolytic Mechanisms in Inflammation”

Introduction

Lymphangioleiomyomatosis (LAM) is a rare low-grade neoplasia responsible for cystic lung destruction, renal angiomyolipomas and probably osteoporosis. It occurs almost exclusively in young women, around 35 years old. It can be associated with a genetic disease, tuberous sclerosis complex (TSC) in 30 to 40% of affected women (2). Sporadic forms also exist, diagnosed in 3.4-7.8 per million women (3). Clinical damage is mainly pulmonary, due to the presence of cysts and the potential complications of their rupture. Patients suffer from recurrent pneumothorax, chylothorax and progressively worsening dyspnea. The lung destruction is responsible for obstructive ventilatory disorders and can lead to chronic respiratory failure (4). Extra-thoracic involvement can include angiomyolipomas, abdominal or pelvic lymphangioleiomyomas and lymphadenopathy. Renal angiomyolipoma can be complicated by bleedings or even massive hemorrhages. Furthermore, LAM is associated to an increased risk of bone fractures compared to the general population, linked to osteoporosis (1). Currently, diagnosis is based on thoracic CT scan to quantify cysts or other abnormalities and on the histologic findings of lung biopsy including detection of HMB 45, a marker of LAM cells (5). The origin of these cells is still uncertain, probably deriving from uterine cells. In fact, LAM are a part of « PEComas », perivascular epithelioid cell tumors, characterized by the expression of both melanocyte and smooth muscle markers (6). LAM cells are derived from abnormal smooth muscle cells and express α -actine, antibody HMB 45, hormonal receptors of oestrogens and progesterone. Migration and proliferation of LAM cells happen through lymphatic vessels. Currently, the only biomarker for LAM is the vascular endothelial growth factor-D (VEGF-D), a lymphatic growth factor (7,8). Diagnosis can be made without surgery if its level is superior

to 800ng/mL with a compatible thoracic CT scan. **Figure 1** shows the diagnostic algorithm proposed by European guidelines. Pathophysiology is also explained by mutation of the TSC 1 and 2 genes coding respectively for hamartin and tuberine. The TSC1/TSC2 complex is an autosomal dominant tumor suppressor gene with high penetrance and was first discovered in TSC (9). These mutations are responsible for the constitutive activation of mTor pathway, leading to the lifting of inhibition of cell proliferation (10). Currently the only available treatment is an mTor inhibitor, which only stops disease progression while for its duration (11). Abnormal activation of LAM cells leads to an overexpression of proteases, such as cathepsin K (catK) (3,12,13). This ubiquitous lysosomal cysteine protease is essential to the homeostasis of the human body (13–18). CatK is mostly known to participate in osteogenesis through its production by osteoclasts and the promotion of bone resorption using the RANK pathway (15,19). It is responsible for the degradation of type I collagen into N-terminal telopeptides (NTX) (20), a biomarker of osteoporosis (21). On lung biopsies of LAM patients, catK has been found to be over-expressed and superior than HMB 45 (12). It has also been shown that catK gene was overexpressed 40-fold in lung biopsies from LAM patients (22). Furthermore, the action of catK is regulated by circulating molecules known as cystatins. Cystatin C, its main inhibitor, is ubiquitous in body fluids and can be detect in urine (23). In some countries, it is a biomarker used to assess renal function.

Based on this knowledge, we hypothesise that catK could be a major player in the pathogenesis of LAM by promoting pulmonary cystic destruction, renal angiomyolipoma proliferation and bone degradation. LAMCAK study was carried out in Tours University Hospital and aims to detect this protease as well as cystatin C in the urine, and quantify collagen destruction using urinary NTX.

Materials and methods

LAMCAK

LAMCAK is a translational, physiopathological, monocentric, non-interventional case-control study designed to evaluate the role of catK in the pathogenesis of LAM. Our study population is divided into two groups: LAM patients and healthy volunteers. The primary endpoint is the comparison of urinary catK protein levels between the two groups. We also compared the levels of cystatin C and NTX. The results were correlated to participants' clinical, functional, biological and radiological data.

Study population

We included adult LAM patients and healthy participants (age > 18) respectively through normal follow-up at the Tours University Hospital and through the clinical investigation center (CIC). Inclusions took place from May 31st 2022 to October 18th 2022. LAM diagnosis was in line with European and international recommendations. Healthy participants had no pulmonary or renal pathology. Participants were excluded if they were pregnant, and were not eligible if under legal protection. Following a previously planned consultation, a urine sample was collected for LAM patients. One LAM patient was included while hospitalized for a pneumothorax. For healthy participants, urine sample was collected after a consultation at CIC for inclusion. For both groups, participants had to return the 24-hour urine sample in the week following the inclusion consultation.

With the patient's consent, medical files of all included participants were reviewed to collect their clinical, biological, functional and radiological data.

Samples collection

After collecting the urine samples, a "urine dipstick" was performed to eliminate a urinary tract infection which would interfere with our analyses. Then, samples of each participants' urine

were transferred to the Tours center for the study of respiratory pathologies (CEPR). We collected 10mL of each sample and a buffer mix of cathepsin inhibitor was added to keep the pH at 5.5. The rest of the urine sample was centrifuged ($1000 \times g$ for 5 min at 4°C), the resulting supernatant was aliquoted and frozen at -80°C until use. As recommended, NTX levels were tested on 24-hour urine. Supernatants of 24-hour urine sample centrifuged was aliquoted and frozen at -80°C . Protein concentration was determined by a bicinchoninic acid assay (BCA protein assay kit, Interchim, Montluçon, France). The creatininuria of each sample was determined in the biochemistry laboratory of the Tours University Hospital.

Sample analysis

Reagents

Acetate buffer, Benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (Pefabloc), pepstatin A, EDTA, S-methyl thiomethanesulfonate (MMTS) and BSA (bovine serum albumin) were purchased from Sigma–Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

Immunoblotting

Monoclonal rabbit anti-human anti-Cat K (1:1000) antibodies were obtained from Abcam. The goat antirabbit IgG-peroxidase conjugate was from Sigma-Aldrich. Prestained molecular masses (Precision Plus Protein Standards) came from Bio-Rad (Marnes-La-Coquette, France). In order to correctly identify this protein, urine had to be concentrated 20-fold and 100µg of protein were deposited per sample and per well. Samples (100 µg protein/well) were diluted in Laemmli buffer under reducing conditions and boiled for 5 min at 95°C . Proteins were separated on 12% SDS-PAGE and blotted onto nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Membranes were blocked with 5% nonfat dry milk in PBS, 0.1% Tween-20 (PBS-T) at room temperature (RT) for 1 h and incubated with the specific primary antibodies at 4°C overnight. After washing, peroxidase-conjugate secondary antibodies (1:5000) were added and incubated 1 h at RT. Revelation was performed using an ECL kit

(Amersham). Band densities were quantified by densitometric analysis using the ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA). Estimated amounts were normalized according to a control test that was common to each blot.

Cathepsin K immunoassay

The concentration of human catK was analysed using the sandwich ELISA kit from Novus Biological. Standard concentrations of catK used for the calibration curve, diluted in blocking solution and concentrated biological samples (triplicates), were then applied and incubated an hour and a half at 37°C. After washing step, biotinylated detection catK antibody was added for 1 h at 37°C followed by HRP conjugate for 30 min at 37°C. After washing, samples were incubated in given substrate buffer in the dark. The reaction was stopped by adding the given stop solution (H₂SO₄). Absorbance was measured at 492 nm using a microplate reader (VersaMax, Molecular Devices, St Grégoire, France).

Cystatin C immunoassay

The concentration of human cystatin C was determined using the sandwich ELISA DuoSet kit from R&D Systems. Microtiter plates (Nunc A/S, Roskilde, Denmark) were coated with a murine monoclonal anticystatin C antibody and incubated overnight at RT. The plates were washed three times with PBS-T before blocking with 1% BSA in PBS for 1 h at RT. Standard concentrations of cystatin C used for the calibration curve and biological samples (triplicates), diluted in blocking solution, were then applied and incubated for 2 h at RT. After washing step, biotinylated mouse antihuman cystatin C antibody was added for 2 h followed by streptavidin HRP conjugate for 20 min. After washing, samples were incubated with 0.04% v/v H₂O₂ and orthophenylene diamine (0.4 mg/mL) in substrate buffer (50 mM phosphate, 20 mM citric acid, pH 5.5) in the dark. The reaction was stopped by adding 3M H₂SO₄. Absorbance was measured at 492 nm using a microplate reader (VersaMax, Molecular Devices, St Grégoire, France).

N-telopeptide of collagen immunoassay

The concentration of human NTX was determined using the sandwich ELISA kit from Novus Biological. Standard concentrations of NTX used for the calibration curve, diluted in blocking solution, and biological samples (duplicates), undiluted non-concentrated, were then applied and incubated for 1 hour and a half at 37°C. After washing step, biotinylated detection NTX antibody was added for 1 h at 37°C followed by HRP conjugate for 30 min at 37°C. After washing, samples were incubated in given substrate buffer in the dark. The reaction was stopped by adding the given stop solution (H₂SO₄). Absorbance was measured at 492 nm using a microplate reader (VersaMax, Molecular Devices, St Grégoire, France).

Cyst quantification

The total volume of lung cysts within the parenchyma was determined using 3D slicer©. The last two chest CT scans were analysed for each patient. One of them had only one available scan. Volume is reported in milliliters.

Data collection

Medical files of all included patients were reviewed to collect information regarding their LAM (year of diagnosis, diagnosis criteria, usual oxygen dependency, prescription of mTOR inhibitors, most recent pulmonary function test, comorbidities, concomitant treatments) as well as current clinical, radiological and blood sample results.

Statistical analysis

We first described the characteristics of the included patients. Results were expressed as median and interquartile range (IQR) for quantitative variables, and n (%) for qualitative variables. Mann-Whitney test was used for continuous variables with non-normal distribution to compare the characteristics among all patients. To search for a link between our data we used Spearman's correlation coefficient. P-values <0.05 were considered significant.

Ethics

Participants were informed and asked to sign a non-opposition document (***appendix 1***). Follow-up of LAM patients was unchanged. The study was in accordance with the Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés guidelines and was registered by the local ethics committee of the University Hospital of Tours (n°2022-A00152-41).

Results

Study population

We included 21 patients, 12 with LAM during their follow-up in the pneumology or neurology departments of Tours University Hospital and 9 healthy volunteers, between May 31st 2022 and October 18th 2022. Baseline characteristics are summarized in **Table 1**. All patients were women with a median age of 49 years (IQR [21; 81]). Of these 21 patients, 48% were menopausal, one had severe kidney failure and two also had TSC. Five patients, all in the volunteer group, had comorbidities. They were predominantly cardiovascular pathologies, and one patient had been treated for breast cancer which was considered to be in remission.

If we focus on LAM patients, all of them met the current diagnostic criteria for this disease. Clinically, more than half of them reported a habitual dyspnea. Five patients had a grade 1 dyspnea on the modified Medical Research Council (mMRC) scale, two had a grade 2 dyspnea and one patient had grade 4 dyspnea. One patient was hospitalised for a pneumothorax at time of sampling, all other patients were at stable state. Four of the LAM patients were treated by mTor inhibitor. Two patients required oxygen supplementation on a daily basis. Median forced expiratory volume in 1 second (FEV1) was 91% of predicted value (IQR [41; 116]) and diffusion capacity of the lungs for carbon monoxide (DLCO) was 77% of predicted value (IQR [29; 117]). The median time between the last two respiratory functions tests was 15.5 months (IQR [6; 27]) and the monthly evolution in FEV1 was -0.01% (IQR [-0.12; 0.28]). One patient had performed a single measurement due to a recent diagnosis, and one patient had never had a pulmonary function test. They all had pulmonary cysts and the abundance of cysts was determined on their last two thoracic CT scans with the exception of one patient who only had one CT. Median cyst volume was 112.48mL (IQR [4.16; 1280.15]). Median time between the last two CT scans was 24 months (IQR [9; 71]) and the average change in cyst volume was +0.3 mL per months (IQR [-5.79; 8.4]). Five patients also had renal angiomyolipomas. The

median value of the VEGF-D is 535.5pg/mL (IQR [166; 1913]). Of the eight patients who underwent bone densitometry, six had a pathological result (five patients had osteopenia and one patient suffered from osteoporosis).

Urine samples analysis

We were able to collect all samples at a follow-up consultation at the university hospital of Tours for LAM patients, and at the CIC for healthy volunteers. Collection of 24-hour urine samples was not a limitation. Median urine protein concentration of samples was not significantly different between healthy volunteers (23046.40µg/mL) and LAM patients (21670.40µg/mL) ($p = 0.92$). Median urine protein concentration of 24-hour urine samples were not significantly different with respectively 9596.955 µg/mL and 7846.887 µg/mL ($p = 0.96$). No patients had urinary infection according to the "urine dipstick".

Cathepsin K

We first sought to detect catK by immunoassay but we were unable to assay it with the ELISA kit. Using immunoblotting, catK was detected at ~37kDa, supporting that the enzyme is mostly found in its pro-form (**figure 2**). For LAM patients, the median amount of catK was 0.14 (IQR [0.02; 0.68]) compared to 0.04 (IQR [0.01; 0.11]) for healthy volunteers. There is a significant difference between catK levels in LAM patients versus healthy volunteers ($p = 0.04$) (**figure 3**). There appears to be no significant correlation with renal function ($p = 0.24$; $Rho = -0.29$). The amount of catK was not affected by the presence of renal angiomyolipomas ($p = 0.97$). Looking at respiratory functions, we observe no correlation between catK and the severity of respiratory impairment. Indeed, there was no significant correlation according to the Spearman coefficient with FEV1 ($p = 0.85$; $Rho = -0.06$), or DLCO ($p = 0.92$; $Rho = -0.04$). We found no correlation between catK levels and monthly decline in FEV1 ($p = 0.83$; $Rho = 0.079$). There does not appear to be any correlation between catK levels and the extent of pulmonary cystic destruction ($p = 0.49$; $Rho = -0.22$). There is a non-significant trend between the monthly

decline in cystic volume with the quantity of this protease ($p = 0.17$; $Rho = 0.44$). Furthermore, the upregulation of catK is mainly studied in osteoporosis. We focused on the correlation between catK and T-score values of LAM patients. Using Spearman's coefficient, there is a significant correlation between catK levels and femoral T-score ($p = 0.046$; $Rho = 0.74$) but not with spinal T-score ($p = 0.24$; $Rho = 0.47$).

Collagen N-terminal telopeptides (NTX)

NTX correspond to collagen residues degraded by catK. They can be immunodetected in urine samples, for LAM patients, the median NTX level related to creatininuria was $0.34 \mu\text{g}/\text{mmol}$ (IQR [0.016; 1.7]) compared to a level of 0.09 (IQR [0.03; 0.18]) in healthy volunteers. These values indicate a non-significant trend towards overexpression of urinary NTX levels in LAM patients ($p = 0.08$) (**figure 4**). We found no significant correlation between the level of urinary NTX and the value of the femoral ($p = 0.56$; $Rho = 0.29$) or spinal ($p = 0.50$; $Rho = 0.32$) T-score. According to Spearman coefficient, we found a significant correlation between NTX and catK ($p = 0.01$; $Rho = 0.61$) (**figure 5**). Besides, it does not correlate significantly with the abundance of pulmonary cysts ($p = 0.95$; $Rho = 0.03$) or with FEV1 ($p = 0.43$; $Rho = -0.28$).

Cystatin C

CatK inhibition is mainly dependent on cystatin C. The norm for urinary cystatin C in the general population is $0.03\text{mg}/\text{L}$ to $0.3\text{mg}/\text{L}$. We were able to detect it in diluted urine samples. In LAM patients the median cystatin C level was 0.05 (IQR [0.03; 2.77]) compared with 0.06 (IQR [0.01; 0.26]) in healthy volunteers. There is no significant difference between the two groups ($p = 0.93$). Using Spearman coefficient, we obtained a perfect correlation between cystatin C levels and creatininuria in the same sample ($p < 0.0001$; $Rho = 0.95$) (**figure 6**). In addition, the amount of catK detected tends to be correlate with cystatin C levels ($p = 0.13$; $Rho = 0.34$).

Discussion

In this pilot study, we aimed to better understand the role of catK in the pathophysiology of LAM. The primary finding of this study is the possibility to detect this protease in an easily accessible biological fluid such as urine and in greater quantities in LAM patients. To our knowledge, this is the first time that it has been done. Also, we were able to quantify its regulator, cystatin C, without detecting a lack of inhibition. In addition, we found a tendency to higher levels of NTX in LAM patients, reflecting catK activity.

All patients with LAM were diagnosed according to the European guidelines. On average, our population had minimal lung involvement. Most of them have no respiratory failure, they mainly describe effort-related dyspnea without daily restriction. Three LAM patients had a FEV1 <70% and only two needed supplemental oxygen, one continuously and one during exercise. Variations in FEV1 were small for all LAM patients. Similarly, the variation in cystic volume was low between the last two thoracic CT scans. In addition, it should be noted that few of our patients, only five, had pathological VEGF-D value at diagnosis.

VEGF-D, a good tool?

With a threshold of 800ng/mL, this biomarker has an excellent diagnostic specificity of 100% in the presence of pulmonary cystic disease on thoracic CT scan (24). Its sensitivity is lower, at 73% (25). The use of VEGF-D as a biomarker of activity and severity is debated in literature (26,27). Studies have established that if VEGF-D levels were >800 ng/mL at diagnosis, FEV1 decline was faster than those with values <800 ng/mL (24,28). On the other hand, VEGF-D levels can decrease or be stabilized with mTOR inhibitors without its value being correlated to clinical improvement (24,29). Furthermore, VEGF-D levels do not increase during pregnancy (30,31). However, during such hormonal stimulation, LAM patients are at greater risk of pneumothorax and their respiratory capacity decreases, especially FEV1 and DLCO (32,33).

VEGF-D reflects exacerbated lymphangiogenesis but is not a witness to other pathways of disease progression. The discovery or combination of new markers is therefore necessary to better understand this disease.

Lymphangioleiomyomatosis and cathepsin K

In recent years, the role of catK in the pathogenesis of LAM is increasingly being studied. This lysosomal protease is essential to the maintenance of airway structural integrity (15,34). As said before for the diagnosis of LAM, it has been reported that the detection of catK on pathological specimens is more relevant than HMB 45, the standard marker (12). The principal hypothesis is that it participates in pulmonary cystic destruction. We therefore expect that such a protease could become a biomarker for LAM.

Detection of urine cathepsin K

We chose to measure this molecule using urine samples since they are easy to access and non-invasive. Patient compliance was good, even for 24-hour sampling. Immunoblotting analysis enables us to observe the form in which catK is present in samples. The use of a method more applicable to clinical routine, such as ELISA, is necessary. In this study, we were unable to detect catK by this way with the NOVUS biologicals kit. In fact, the plasma concentration of catK for a healthy person is around 0.15 ng/mL (35), the cut-off of the kit we used is from 0.16 to 10 ng/mL. We assume that the quantity of catK is much lower in urine than in blood, due to the presence of multiple inhibitors, which would explain why this kit was not sensitive enough and why we still detect this protease with immunoblotting.

Place of angiomyolipomas

The amount of catK detected in urine reflects its production at global level. In our study, we cannot distinguish whether the production of this protease is more related to pulmonary cyst destruction or the presence of renal angiomyolipomas. In fact, anatomopathological sections of renal angiomyolipomas have shown strong catK expression along LAM nodules, similar to the

immunoreactivity detected in lung biopsy of LAM patients (13). In our statistical analyses, we found no differences between patients with these lesions and those without. We were unable to quantify the abundance of these renal cysts. Correlating the amount of catK with their abundance could provide new answers.

In addition, based on our results, the presence of renal angiomyolipomas does not affect renal function or the quantity of catK.

Place of cathepsin K in lung

CatK is being studied in an increasing number of pathologies (15). In the lung, some teams have shown that catK-deficient mice develop lung fibrosis due to lack of collagen destruction (36). Pathophysiology of LAM remains poorly understood. LAM cells are thought to migrate through lymphatic pathways to the lungs and kidneys. Their association with fibroblasts (LAFs for *LAM associated fibroblasts*) forms LAM nodules and leads to the formation of cysts. As mentioned above, the emerging hypothesis is that cyst formation is due to the overproduction of catK in lung parenchyma by these nodules. In our study, all LAM patients had pulmonary cysts whose abundance differs between patients and does not seem to correlate with the amount of catK. However, there was a non-significant trend towards worsening pulmonary cystic destruction, but these results are difficult to interpret because of the small differences of cystic volume between the last two scans and respiratory function tests. This result may be limited by the small size of our cohort and the fact that they were in stable condition. In contrast, the patient hospitalized for pneumothorax did not have a particularly high catK value.

Cathepsin K and mTOR pathway

Chilosi *et al* were the first to describe a link between catK and mTOR activity (13). The principal hypothesis explained by Dongre *et al* is that this protease is produced by LAFs, themselves stimulated by extra-cellular acidification by LAM cells using activation of mTOR pathway (22). In fact, due to the constitutional activation of mTOR, abnormal smooth muscle

cells release hydrogen ions into extracellular environment, and therefore create acidic conditions required for catK activation.

In cell experiments, it has been revealed that suppression of mTOR activity reduced catK gene expression (22). mTOR inhibitor is the only treatment currently available in LAM to have been approved for prescription due to the randomized, controlled MILES trial (24). Here, we found no significant relationship between the amount of catK and mTOR inhibitor use ($p = 0.96$). These results are limited since only four patients in our cohort were undergoing this treatment.

Cystatin C, the main inhibitor

Regarding the primary findings of this study, we can wonder if an excess of catK was related to a lack of inhibition. Cystatin C does not seem to be overexpressed in LAM patients in order to regulate the action of catK. It is also a marker of renal function. In fact, with the exception of one patient with grade IV renal failure, all the patients in the study were within the standard norms (0.03; 0.3g/L) for renal function. With the experiments carried out here, we can only observe the quantity produced and excreted in the urine, but we cannot observe the functional aspect of cystatin C.

Systemic collagen degradation

Urinary NTX reflect the action of catK mainly on type I collagen, present in all extra-cellular matrices, including in the lungs. Though are not organ-specific, they are known to play a part in bone homeostasis and reflect the action of catK product by osteoclasts (20). Upregulation of catK could therefore lead to overexpression of these collagen residues. We have shown that there is a tendency for urinary NTX to be more abundant in LAM patients. The small number of patients in our cohort limits the significance of our results. Besides, we found a significant correlation between urinary NTX value and quantity of catK which may testify to the increasing destruction of type 1 collagen. However, urinary NTX does not seem to be a good marker of LAM severity due to the lack of correlation with cyst abundance and FEV1. As we know that

LAM patients have greater risk of developing early osteoporosis, we collated data from their most recent bone densitometry. As a reminder, six of eight results were pathological, but only one had proven osteoporosis. Urinary NTX are now used in clinical routine to diagnose osteoporosis, attesting to bone demineralization (21). Based on our results, we found no significant correlation between the quantity of urinary NTX and T-score values. This trend could mean that urinary NTX promoted by catK at systemic level could be a reflection of its action in both lungs and bones.

Limitations

There are several limitations to our study. The main one is the small size of our cohort, which limits the power of our results. This can be explained by the fact that LAMCAK is an exploratory study of a rare disease. Moreover, this is a single-center study, carried out at the university hospital of Tours. We have shown that it is possible to take simple samples from LAM patients in an attempt to better understand the involvement of catK in the pathophysiology of LAM. The immunoblotting detection method is an obstacle in itself since it takes a long time to perform and is not applicable in routine clinical practice. The development of another quantification method is therefore necessary. ELISA detection would be easier to apply in everyday practice. Some studies have investigated catK in other pathologies, notably cardiovascular diseases, by quantifying it in the blood (23). However, as this is a non-interventional study, it was not possible to perform such sampling. The development of an ELISA test targeting urinary catK would enable the project to be extended on a larger scale. In addition, four patients in the LAM cohort were unable to undergo osteodensitometry. Because this is the first time such an assay has been performed, we only have one sample per patient in their baseline state. Longitudinal analysis of catK levels and urinary NTX could provide answers about LAM activity.

Conclusion

This experimental study shows that it is possible to detect catK in greater quantity in LAM patients. However, these results lack the power to use catK or urinary NTX as a marker of activity or severity of lung damage. Further studies are needed to better characterize the impact of catK on the pathophysiology of LAM. This pilot study could serve as a starting point for conducting a multicenter study.

Furthermore, anti-catK treatments for osteoporosis such as Odanacatib developed by Merck and co, are appearing in the literature (37–39). These are still under development due to significant adverse events. The main aim of a better understanding of the role of catK is to offer new therapeutic opportunities for these young patients.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge the patients for their participation in this trial. This study was supported by a grant from Nouveau Souffle and France LymphAngioleioMyomatose (FLAM) Associations. We thank Pr Lalmanach Gilles, Pr Lecaille Fabien, Ms Lise Vanderlynden for their contribution to this study.

Bibliography

1. Taveira-DaSilva AM, Stylianou MP, Hedin CJ, Hathaway O, Moss J. Bone Mineral Density in Lymphangioleiomyomatosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Jan;171(1):61–7.
2. Cottin V, Ahmad K. Lymphangioléiomyomatose - PNDS. Haute Autorité de Santé.
3. Henske EP, McCormack FX. Lymphangioleiomyomatosis — a wolf in sheep’s clothing. *J Clin Invest*. 2012 Nov 1;122(11):3807–16.
4. Chebib N, Cottin V. Lymphangioléiomyomatose. In: L Guillevin, L Mouthon, H Lévesque *Traité de médecine*, 5e ed Paris. 5th ed. 2020. (TdM Editions).
5. Gupta N, Finlay GA, Kotloff RM, Strange C, Wilson KC, Young LR, et al. Lymphangioleiomyomatosis Diagnosis and Management: High-Resolution Chest Computed Tomography, Transbronchial Lung Biopsy, and Pleural Disease Management. An Official American Thoracic Society/Japanese Respiratory Society Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017 Nov 15;196(10):1337–48.
6. Calìo A, Mengoli MC, Cavazza A, Rossi G, Ghimenton C, Brunelli M, et al. Cathepsin K expression in clear cell “sugar” tumor (PEComa) of the lung. *Virchows Arch*. 2018 Jul;473(1):55–9.
7. Young LR, VanDyke R, Gulleman PM, Inoue Y, Brown KK, Schmidt LS, et al. Serum Vascular Endothelial Growth Factor-D Prospectively Distinguishes Lymphangioleiomyomatosis From Other Diseases. *Chest*. 2010 Sep;138(3):674–81.
8. Seyama K, Kumasaka T, Souma S, Sato T, Kurihara M, Mitani K, et al. Vascular endothelial growth factor-D is increased in serum of patients with lymphangioleiomyomatosis. *Lymphat Res Biol*. 2006;4(3):143–52.
9. Crino PB, Nathanson KL, Henske EP. The tuberous sclerosis complex. *N Engl J Med*. 2006 Sep 28;355(13):1345–56.
10. Smolarek TA, Wessner LL, McCormack FX, Mylet JC, Menon AG, Henske EP. Evidence That Lymphangiomyomatosis Is Caused by TSC2 Mutations: Chromosome 16p13 Loss of Heterozygosity in Angiomyolipomas and Lymph Nodes from Women with Lymphangiomyomatosis. *The American Journal of Human Genetics*. 1998 Apr;62(4):810–5.
11. McCormack FX, Inoue Y, Moss J, Singer LG, Strange C, Nakata K, et al. Efficacy and Safety of Sirolimus in Lymphangioleiomyomatosis. *N Engl J Med*. 2011 Apr 28;364(17):1595–606.
12. Rolim I, Makupson M, Lovrenski A, Farver C. Cathepsin K is Superior to HMB45 for the Diagnosis of Pulmonary Lymphangioleiomyomatosis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2022 Feb 1;30(2):108–12.
13. Chilosi M, Pea M, Martignoni G, Brunelli M, Gobbo S, Poletti V, et al. Cathepsin-k expression in pulmonary lymphangioleiomyomatosis. *Mod Pathol*. 2009 Feb;22(2):161–6.
14. Zhao R, He XW, Shi YH, Liu YS, Liu FD, Hu Y, et al. Cathepsin K Knockout Exacerbates Haemorrhagic Transformation Induced by Recombinant Tissue Plasminogen Activator After Focal Cerebral Ischaemia in Mice. *Cell Mol Neurobiol*. 2019 Aug;39(6):823–31.
15. Dai R, Wu Z, Chu HY, Lu J, Lyu A, Liu J, et al. Cathepsin K: The Action in and Beyond Bone. *Front Cell Dev Biol*. 2020 Jun 4;8:433.

16. Aoki T, Kataoka H, Ishibashi R, Nozaki K, Hashimoto N. Cathepsin B, K, and S are expressed in cerebral aneurysms and promote the progression of cerebral aneurysms. *Stroke*. 2008 Sep;39(9):2603–10.
17. Zheng T, Zhu Z, Wang Z, Homer RJ, Ma B, Riese RJ, et al. Inducible targeting of IL-13 to the adult lung causes matrix metalloproteinase- and cathepsin-dependent emphysema. *J Clin Invest*. 2000 Nov;106(9):1081–93.
18. Golovatch P, Mercer BA, Lemaître V, Wallace A, Foronjy RF, D'Armiento J. Role for cathepsin K in emphysema in smoke-exposed guinea pigs. *Exp Lung Res*. 2009 Oct;35(8):631–45.
19. Turk V, Stoka V, Vasiljeva O, Renko M, Sun T, Turk B, et al. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Jan;1824(1):68–88.
20. Atley LM, Mort JS, Lalumiere M, Eyre DR. Proteolysis of human bone collagen by cathepsin K: characterization of the cleavage sites generating the cross-linked N-telopeptide neoepitope. *Bone*. 2000 Mar 1;26(3):241–7.
21. Ganesan G, Vijayaraghavan P. Urinary N-telopeptide: The New Diagnostic Test for Osteoporosis. *Surg J*. 2019 Jan;05(01):e1–4.
22. Dongre A, Clements D, Fisher AJ, Johnson SR. Cathepsin K in Lymphangioleiomyomatosis. *The American Journal of Pathology*. 2017 Aug;187(8):1750–62.
23. Naumnik W, Niklińska W, Ossolińska M, Chyczewska E. Serum cathepsin K and cystatin C concentration in patients with advanced non-small-cell lung cancer during chemotherapy. *Folia Histochem Cytobiol*. 2009;47(2):207–13.
24. Young LR, Lee HS, Inoue Y, Moss J, Singer LG, Strange C, et al. Serum VEGF-D concentration as a biomarker of lymphangioleiomyomatosis severity and treatment response: a prospective analysis of the Multicenter International Lymphangioleiomyomatosis Efficacy of Sirolimus (MILES) trial. *The Lancet Respiratory Medicine*. 2013 Aug;1(6):445–52.
25. McCormack FX, Gupta N, Finlay GR, Young LR, Taveira-DaSilva AM, Glasgow CG, et al. Official American Thoracic Society/Japanese Respiratory Society Clinical Practice Guidelines: Lymphangioleiomyomatosis Diagnosis and Management. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016 Sep 15;194(6):748–61.
26. Li M, Zhu WY, Wang J, Yang XD, Li WM, Wang G. Diagnostic performance of VEGF-D for lymphangioleiomyomatosis: a meta-analysis. *J Bras Pneumol*. 2022;48(1):e20210337.
27. Amaral AF, de Oliveira MR, Dias OM, Arimura FE, Freitas CSG, Acencio MMP, et al. Concentration of Serum Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF-D) and Its Correlation with Functional and Clinical Parameters in Patients with Lymphangioleiomyomatosis from a Brazilian Reference Center. *Lung*. 2019 Apr;197(2):139–46.
28. Radzikowska E, Jaguś P, Sobiecka M, Chorostowska-Wynimko J, Wiatr E, Kuś J, et al. Correlation of serum vascular endothelial growth factor-D concentration with clinical presentation and course of lymphangioleiomyomatosis. *Respir Med*. 2015 Nov;109(11):1469–75.
29. Taveira-DaSilva AM, Jones AM, Julien-Williams P, Stylianou M, Moss J. Long-Term Effect of Sirolimus on Serum Vascular Endothelial Growth Factor D Levels in Patients With Lymphangioleiomyomatosis. *Chest*. 2018 Jan;153(1):124–32.

30. Hirose M, Matsumuro A, Arai T, Sugimoto C, Akira M, Kitaichi M, et al. Serum vascular endothelial growth factor-D as a diagnostic and therapeutic biomarker for lymphangioleiomyomatosis. *PLoS One*. 2019;14(2):e0212776.
31. Zhou J, Diao M. Lymphangioleiomyomatosis and pregnancy: a mini-review. *Arch Gynecol Obstet*. 2024 Apr 9;
32. Taveira-DaSilva AM, Johnson SR, Julien-Williams P, Johnson J, Stylianou M, Moss J. Pregnancy in lymphangioleiomyomatosis: clinical and lung function outcomes in two national cohorts. *Thorax*. 2020 Oct;75(10):904–7.
33. Hayashida M, Yasuo M, Hanaoka M, Seyama K, Inoue Y, Tatsumi K, et al. Reductions in pulmonary function detected in patients with lymphangioleiomyomatosis: An analysis of the Japanese National Research Project on Intractable Diseases database. *Respir Investig*. 2016 May;54(3):193–200.
34. Zhang D, Leung N, Weber E, Saftig P, Brömme D. The effect of cathepsin K deficiency on airway development and TGF- β 1 degradation. *Respir Res*. 2011;12(1):72.
35. Boruk M, Railwah C, Lora A, Nath S, Wu D, Chow L, et al. Elevated S100A9 expression in chronic rhinosinusitis coincides with elevated MMP production and proliferation in vitro. *Sci Rep*. 2020 Oct 1;10:16350.
36. Bühling F, Röcken C, Brasch F, Hartig R, Yasuda Y, Saftig P, et al. Pivotal Role of Cathepsin K in Lung Fibrosis. *The American Journal of Pathology*. 2004 Jun;164(6):2203–16.
37. Zhao Q, Jia Y, Xiao Y. Cathepsin K: a therapeutic target for bone diseases. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Mar 20;380(4):721–3.
38. McClung MR, O'Donoghue ML, Papapoulos SE, Bone H, Langdahl B, Saag KG, et al. Odanacatib for the treatment of postmenopausal osteoporosis: results of the LOFT multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial and LOFT Extension study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2019 Dec;7(12):899–911.
39. Ng KW. Potential role of odanacatib in the treatment of osteoporosis. *CIA*. 2012 Jul;235.

Table

Characteristics	All patients	LAM patients (n=12)	Healthy volunteers (n=9)
Median age	49 [21 ; 81]	44,5 [23 ; 81]	57 [21 ; 73]
Ménopausal	10 (48%)	5 (42%)	5 (56%)
Renal failure	1 (5%)	1 (8%)	0
Tuberous sclerosis	2 (10%)	2 (17%)	0
Comorbidities	5 (24%)		
Hypertension		0	2 (22%)
Cancer		0	1 (remission 2021) (11%)
Diabetes		0	1 (11%)
Cardiopathy		0	1 (11%)
Specific characteristics of LAM patients (n=12)			
mTor inhibitor	4 (33%)		
Oxygen therapy	2 (17%)		
Dyspnea (mMRC)	8 (67%)		
I	5 (42%)		
II	2 (17%)		
III	0		
IV	1 (8%)		
FEV1 % (n=11)	91 [41 ; 116]		
Monthly changes	- 0.01% [-0.12; 0.28]		
DLCO % (n=11)	77 [29 ; 117]		
VEGF-D ng/mL (n=11)	535.5 [166 ; 1913]		
Renal angiomyolipomas	5 (42%)		
Spinal T-score (n=8)	-1 [-2.6 ; 0.4]		
Femoral T-score (n=8)	-1.45 [-2.9 ; 0.3]		
Concomitant treatments			
NSAID	0		
Diuretics (all types)	0		
Corticosteroids	0		
IEC/ARA2	0		
Biphosphonates	1 (8%)		
Lung cyst volumes (mL)			
Quantification	112.48 [4.16 ; 1280.15]		
Monthly volumetric changes	+ 0.3 [-5.79; 8.4]		

Table 1 : characteristics of LAMCAK cohort

Figures

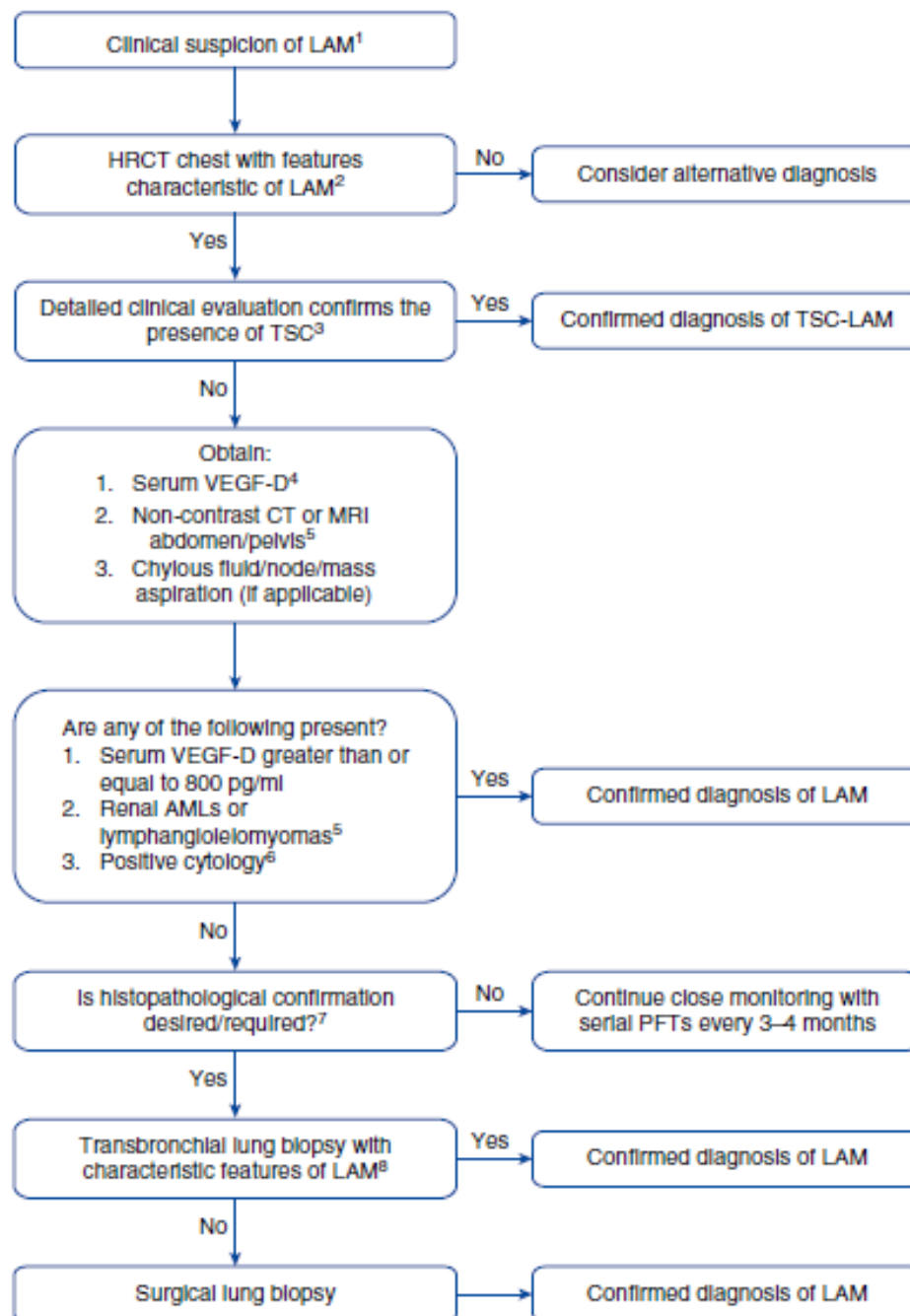


Figure 1: Diagnostic algorithm for LAM proposed by European guidelines

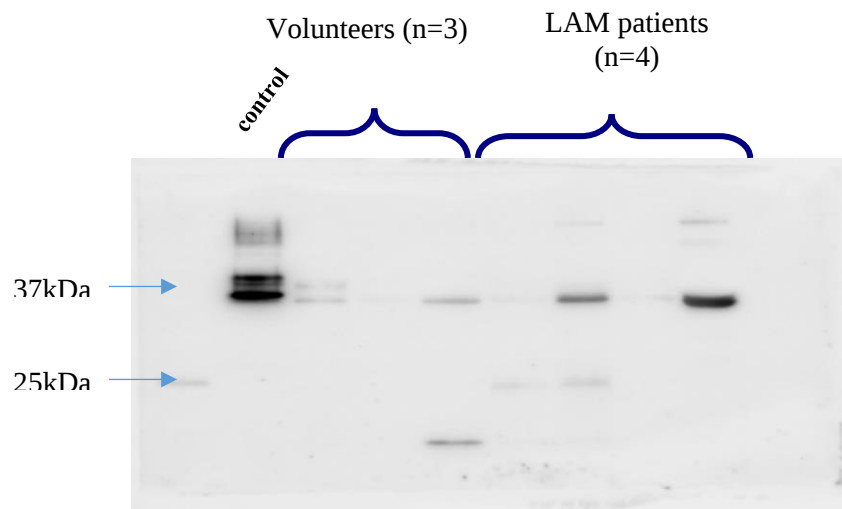


Figure 2: Example of cathepsin K immunoblotting

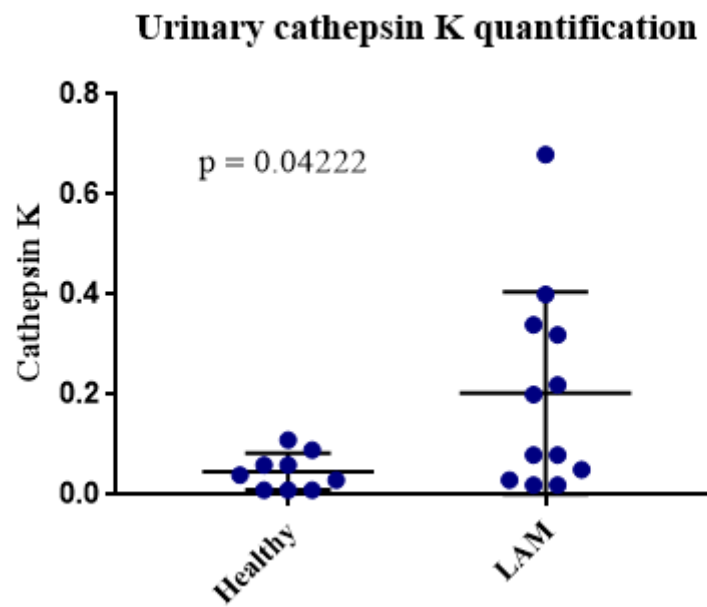


Figure 3: Urinary cathepsin K quantified by western blot between healthy volunteers and LAM patients

Correlation of Cystatin C and creatininuria

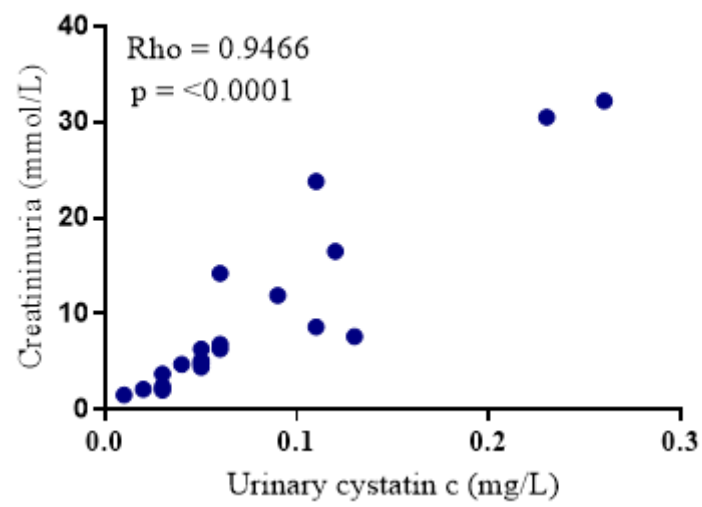


Figure 6: Correlation of cystatin C and creatininuria detected by immunoassay in LAMCAK cohort

Appendix

Appendix 1: French-language information letter given to study patient with LAM

LETTRE D'INFORMATION DE LA RECHERCHE – PATIENTE LAM

Version n°1.1 du 29/03/2022

LAM-CAK

Etude de nouveaux biomarqueurs potentiels de la lymphangioléiomyomatose : dosage de la cathepsine K, de la cystatine C, des télopeptides de collagène.

Coordonnateur de la recherche :

Pr MARCHAND-ADAM Sylvain

Service de Pneumologie et Explorations Fonctionnelles Respiratoires

CHU de Tours, Hôpital Bretonneau

Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires, UMR INSERM 1100-Université de Tours, équipe 2

"Mécanismes Protéolytiques dans l'Inflammation" e-mail :

sylvain.marchand-adam@univ-tours.fr

Madame,

Vous avez été invitée à participer à une recherche intitulée « Etude de nouveaux biomarqueurs potentiels de la lymphangioléiomyomatose : dosage de la cathepsine K, de la cystatine C, des télopeptides de collagène ».

Cette recherche dite non interventionnelle ne comporte aucun risque ni contrainte pour vous. Cette étude entre dans le cadre d'une recherche impliquant la personne humaine, avec l'obtention de prélèvement urinaire ne nécessitant pas de geste invasif et la réutilisation de données collectées dans le cadre du soin et du suivi clinique à visée d'évaluation. Le fait de participer à cette recherche ne changera donc pas votre prise en charge. En l'absence d'opposition, un traitement de vos données de santé pourra être mis en œuvre.

Prenez le temps de lire les informations contenues dans ce document et de poser toutes les questions qui vous sembleront utiles à sa bonne compréhension. Vous pouvez prendre le temps nécessaire pour décider si vous souhaitez vous opposer à ce que les données qui vous concernent soient utilisées dans le cadre de cette recherche.

QUEL EST L'OBJECTIF DE CETTE ETUDE ?

La lymphangioléiomyomatose (LAM) est une maladie rare caractérisée par une destruction kystique pulmonaire, des anomalies des voies lymphatiques (lymphangiomes) et des tumeurs abdominales comme les angiomyolipomes rénaux. Elle touche quasi-exclusivement la femme jeune de manière sporadique ou associée à une pathologie génétique, la sclérose tubéreuse de Bourneville (STB).

Selon les dernières recommandations européennes, le diagnostic de LAM repose sur des arguments provenant de l'analyse d'une biopsie pulmonaire, montrant la présence de cellules anormales de LAM, ou sur une combinaison de critères provenant de votre scanner thoracique. Le dosage dans le sang du VEGF-D, un facteur de prolifération lymphatique, est actuellement le seul marqueur permettant le diagnostic de la LAM.

Dans cette étude, nous cherchons à isoler de nouveaux marqueurs permettant de diagnostiquer, suivre cette maladie ou encore d'ouvrir sur de nouvelles thérapeutiques. Plusieurs études récentes ont suggéré que la cathepsine K pourrait intervenir dans la formation des lésions de la LAM. Il s'agit d'une enzyme destructrice de protéines (=qui coupe les protéines). Cette protéinase intervient dans la régulation pulmonaire mais est principalement connue pour son rôle dans la régulation de l'os en promouvant l'ostéoporose. Chez les patientes atteintes de LAM, la fréquence de l'ostéoporose est plus élevée que dans la population générale entraînant une augmentation du risque de fractures osseuses. Il existe des marqueurs permettant de quantifier cette destruction osseuse causée en partie par la cathepsine K, ce sont les télépeptides. Leur dosage est corrélé à la gravité de l'ostéoporose. Par ailleurs, il a été démontré que la cathepsine K est surexprimée au niveau des kystes pulmonaires. La cystatine C, la plus puissante protéine inhibitrice de la cathepsine K, est une protéine ubiquitaire retrouvée dans l'ensemble des fluides biologiques du corps humain. Nous savons déjà que son taux est augmenté dans certaines maladies pulmonaires comme dans les pathologies fibrosantes.

Afin de répondre à l'objectif suivant, nous proposons cette étude à des patientes atteintes de LAM, des patientes atteintes de STB sans LAM et des femmes volontaires saines afin de comparer les résultats entre les 3 groupes de femmes.

Cette étude permettra de tester l'hypothèse de l'implication de la cathepsine K dans les mécanismes pathologiques de la LAM et son rôle dans la destruction kystique pulmonaire. Une augmentation du taux urinaire de cette protéinase sera comparée dans les 3 groupes. Nous étudierons également l'activité de la cathepsine K de manière directe et indirecte par le dosage de son inhibiteur la cystatine C et la destruction osseuse avec dégradation du collagène de type I par le dosage des télépeptides de collagène de type 1. Ces taux seront comparés aux données cliniques des patientes afin de rechercher un lien de causalité avec l'atteinte pulmonaire et sa gravité. La LAM est une maladie rare mais sévère avec beaucoup de complications et séquelles dont l'évolution vers l'insuffisance respiratoire terminale pouvant nécessiter une transplantation pulmonaire. A ce jour, nous ne disposons que d'un seul traitement, les inhibiteurs de mTor, qui semblent n'avoir qu'un effet suspensif sur l'évolution de LAM.

Nous souhaitons montrer par notre étude que la cathepsine K intervient dans les mécanismes pathologiques de la LAM. Une augmentation des taux urinaires de la cathepsine K, de la cystatine C ou des télépeptides de collagène pourrait servir de marqueurs diagnostiques ou d'activité de la LAM. Des inhibiteurs de la cathepsine K tels que MIV-711 pourraient être une nouvelle voie thérapeutique de la LAM.

QUE SE PASSERA-T-IL SI JE PARTICIPE À LA RECHERCHE ?

Si vous ne vous opposez pas à participer à cette recherche, les données vous concernant seront recueillies et traitées afin de répondre à l'objectif suivant : l'étude de nouveaux biomarqueurs potentiels de la lymphangioléiomyomatose avec le dosage direct de la cathepsine K et indirect via son inhibiteur (cystatine C) et les marqueurs de lyse du collagène par cette molécule (les télépeptides de collagène).

La durée totale de votre participation à la recherche est de 25h environ, temps nécessaire à l'information et au recueil de votre non opposition, à la vérification des critères d'inclusion et de non inclusion et au prélèvement urinaire le jour de la consultation ainsi qu'au recueil des urines sur 24h.

La période d'inclusion des patientes et des volontaires saines dans l'étude est de 12 mois.

Il n'y aura pas de période d'exclusion : vous pourrez participer simultanément à une autre étude.

Il n'y aura ni visite ni examen par rapport à votre suivi habituel.

Les analyses urinaires seront réalisées à partir des urines sur 24h des femmes incluses. Le recueil des échantillons pour la recherche se fera au domicile et seront remis à l'équipe de recherche au moment de votre consultation dans le service de pneumologie au CHU de Tours. Afin d'analyser au mieux la cathepsine K, une molécule très sensible, nous vous demanderons un prélèvement urinaire supplémentaire sur simple échantillon le jour de votre consultation. Ces urines seront tamponnées pour conserver l'activité de la cathepsine K. L'ensemble des prélèvements seront ensuite transférés au laboratoire INSERM U1100 pour conservation et analyses. Les dosages de la cathepsine K, cystatine C, N- et C-télopeptides seront réalisés sur les urines au laboratoire.

Le reste des analyses (VEMS, CVF, taille des angiomyolipomes rénaux, taux de VEGF-D, ostéodensitométrie) sera récupéré via le Dossier Patient Partagé du CHU de Tours après l'obtention de votre accord de participation à cette étude.

Les échantillons urinaires recueillis seront pseudonymisés dans le respect de votre confidentialité puis utilisés en cours d'étude pour les analyses biologiques. Les urines recueillies non utilisées seront détruites à la fin de l'étude.

EST-CE QUE JE PEUX RENONCER A MA PARTICIPATION ?

Votre participation est entièrement volontaire. Vous êtes donc libre d'accepter ou de refuser de participer sans que votre décision n'ait de conséquence sur vos soins médicaux.

Si vous acceptez, vous pourrez à tout moment renoncer à votre participation, sans justification, et sans que cela ne porte préjudice à la suite de votre prise en charge ou à vos relations avec votre médecin.

En accord avec l'article L1122-1-1 du code de la santé publique, les données obtenues jusqu'à votre opposition seront exploitées au moment des analyses sauf demande expresse de votre part.

EST-CE QUE MA PARTICIPATION RESTERA CONFIDENTIELLE ?

Un fichier informatique comportant vos données va être constitué. **Toutes ces informations seront traitées et analysées de manière confidentielle.** Vos noms et prénoms ne figureront pas dans ce fichier. Seuls les professionnels de santé, personnellement en charge du suivi, auront connaissance de ces données.

Dans le cadre de cette recherche, un traitement informatisé de vos données de santé va être mis en œuvre dans le respect de la réglementation en vigueur relative à la protection des données personnelles. Ce traitement de données permettra d'analyser les résultats au regard de l'objectif qui vous a été présenté. Vos données seront donc identifiées par un code et les initiales de votre nom et prénom. Elles pourront également, dans des conditions assurant leur confidentialité, être transmises au Promoteur ou aux personnes agissant pour son compte. A noter que les données collectées seront conservées pendant la durée réglementaire prévue pour ce type de recherche.

Conformément aux dispositions du Règlement (UE) 2016/679 (Loi RGPD), vous disposez à tout moment d'un droit d'accès, de rectification des données. En application des dispositions de l'article L1111-7 du code de la santé publique, vous pouvez accéder directement ou par l'intermédiaire du médecin de votre choix à l'ensemble de vos données médicales. Vous disposez d'un droit de limitation ou

d'opposition au traitement des données. En revanche, s'agissant d'un traitement de données nécessaire à des fins de recherche scientifique (article 17.3.d du Règlement (EU) 2016/679), le droit à l'effacement des données ne pourra pas s'appliquer. Le droit à la portabilité vous offre également la possibilité d'obtenir et de réutiliser vos données personnelles.

Ces droits peuvent s'exercer auprès des investigateurs de cette recherche ou du Promoteur, par l'intermédiaire de son délégué à la protection des données (dpo@chu-tours.fr). Vous avez également la possibilité de saisir la Commission nationale Informatique et Libertés (CNIL), autorité de protection des données personnelles (<https://www.cnil.fr>)

QUI A APPROUVÉ LA RECHERCHE ?

En application des dispositions de l'article L1121-4 du code de la santé publique, les modalités de cette recherche ont été soumises à un Comité de Protection des Personnes (CPP) qui a notamment pour mission de vérifier les conditions requises pour la protection et le respect de vos droits. Le CPP de Oest II a donné un avis favorable le 15/04/2022.

A noter qu'un résumé de la recherche ainsi que l'avis rendu par le CPP ont été transmis pour information à l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM).

QUI POURRAI-JE CONTACTER SI J'AI DES QUESTIONS ?

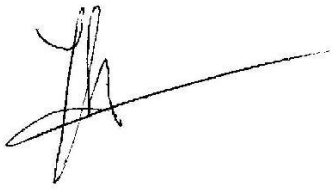
Le médecin qui vous a proposé cette recherche est à votre disposition pour vous fournir toutes informations complémentaires. Si vous le souhaitez, vous pouvez contacter directement le coordonnateur de cette recherche : le Pr MARCHAND ADAM.

En application des dispositions de l'article L1122-1 du code de la santé publique, les résultats globaux de l'étude pourront être communiqués en fin d'étude si vous en faites la demande.

A compléter par l'investigateur Nom, prénom investigateur : N° de téléphone : __ __ - __ __ - __ __ - __ __ - __ __ Nom, prénom de la personne qui se prête à la recherche : Date de naissance : __ / __ / ____ Date de délivrance de l'information : __ / __ / ____ Opposition exprimée pour la participation à l'étude : Oui Non Signature investigateur :
--

A compléter en 2 exemplaires : le 1^{er} exemplaire est à conserver dans le service, le 2nd par le patient.

Vu, le Directeur de Thèse

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'M' followed by a long horizontal stroke.

**Vu, le Doyen
De la Faculté de Médecine de Tours
Tours, le**

PRONOST Marion

43 pages – 1 tableau – 6 figures – 1 annexe

Résumé : LAMCAK : Rôle de la cathepsine K dans la lymphangioléiomyomatose

Contexte : La lymphangioléiomyomatose (LAM) est une maladie systémique rare de la femme jeune, responsable d'une destruction kystique pulmonaire, d'angiomyolipomes rénaux et possiblement d'ostéoporose. Une surexpression pulmonaire de cathepsine K (catK) a été démontrée en regard de nodules de LAM. Notre hypothèse est que cette protéase aurait un rôle central dans la physiopathologie de la LAM en favorisant la destruction kystique pulmonaire, la prolifération des angiomyolipomes et la dégradation osseuse.

Méthodes : L'objectif principal est de mesurer au niveau urinaire la catK, ainsi que son inhibiteur, la cystatine C, et les N-télopeptides de collagène (NTX) chez des patientes atteintes de LAM (n = 12) en comparant leurs dosages à ceux de patientes volontaires saines (n = 9) dans une étude prospective, monocentrique, translationnelle réalisée au CHU de Tours.

Résultats : La quantité de catK est significativement plus importante dans le groupe LAM (p = 0,04), sans être corrélée à la sévérité de l'atteinte pulmonaire, traduite par l'abondance des kystes (p = 0,49 ; Rho = -0,22) ou la valeur du VEMS (p = 0,85 ; Rho = -0,06). Il existe une tendance à une augmentation du taux de NTX chez les patientes LAM (p = 0,08) ainsi qu'une corrélation significative avec la quantité de catK (p = 0,01 ; Rho = 0,61). Nous constatons une corrélation significative entre le taux de catK et le T-score fémoral de déminéralisation osseuse (p = 0,046 ; Rho = 0,74) mais pas avec le T-score rachis (p = 0,24 ; Rho = 0,47). Il n'existe pas de différence significative de quantité de cystatine C entre les deux groupes.

Conclusion : Dans cette étude exploratoire, nous avons montré que la catK est présente en plus grande quantité chez les patientes atteintes de LAM, avec une tendance à une suractivité via une augmentation des NTX. La principale limite de notre étude est son faible effectif, un essai de plus grande ampleur pourrait permettre de mieux comprendre le rôle de cette protéase dans la physiopathologie de la LAM et d'ouvrir sur de nouvelles possibilités thérapeutiques.

Mots clés : Lymphangioléiomyomatose, cathepsine K, N-télopeptides de collagène, cystatine C

Jury :

Président du Jury : Professeur François MAILLOT
Directeur de thèse : Professeur Sylvain MARCHAND-ADAM
Membres du Jury : Docteur Sylvie LEGUE
Docteur Thomas FLAMENT
Docteur Marion FERREIRA

Date de soutenance : 23 mai 2024