

Rôle de l'inflammation alvéolaire dans la survenue et l'aggravation de la pneumopathie interstitielle diffuse au cours de la sclérodermie systémique

Huy-Thong Hua

► To cite this version:

Huy-Thong Hua. Rôle de l'inflammation alvéolaire dans la survenue et l'aggravation de la pneumopathie interstitielle diffuse au cours de la sclérodermie systémique. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est, 2011. Français. NNT: 2011PEST0088. tel-01161873

HAL Id: tel-01161873 https://theses.hal.science/tel-01161873

Submitted on 9 Jun2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS-EST U.F.R. DE MEDECINE

ъШø

THESE de SCIENCES

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS-EST

Spécialité : Physiopathologie

Présentée et soutenue publiquement le 13 décembre 2011

par

Huy Thong HUA

Titre :

Rôle de l'inflammation alvéolaire dans la survenue et l'aggravation de la pneumopathie interstitielle diffuse au cours de la sclérodermie systémique

Directeur de thèse : Professeur Anh Tuan DINH-XUAN

Jury

Président :	Professeur Isabelle FAJAC
Rapporteur :	Professeur Frédéric BATTEUX
Rapporteur :	Docteur Philippe HERVÉ
Directeur :	Professeur Anh Tuan DINH-XUAN

Lał	oratoires	d'accueil	5
Rei	merciemer	its	6
Lis	te des abré	eviations	8
A.	INTROI	DUCTION	10
B.	REVUE	DE LA LITTERATURE	13
I	LA PNE	UMOPATHIE INTERSTITIELLE DIFFUSE	13
	I.1 Prév	alence	13
	I.2 Clin	ique	14
	I.3 Diag	nostic	14
	I.3.1	Examens radiologiques	14
	<i>I.3.2</i>	Explorations fonctionnelles respiratoires (EFR)	16
	I.3.3	Lavage broncho-alvéolaire	18
	I.3.4	Histo-anatomo-pathologie	19
	I.3.5	Biomarqueurs sériques	20
	I.3.6	Apports respectifs des différents examens complémentaires	21
II	MECANI	SMES CELLULAIRES DE LA FIBROSE PULMONAIRE	DANS LA
	SCLER	ODERMIE SYSTEMIQUE	23
	II.1 Lés	sions vasculaires et dysfonction endothéliale	24
	II.2 Inf	lammation et activation du système immunitaire	
	II.2.1	Inflammation	
	II.2.2	Activation du système immunitaire	27
		II.2.2.1 Monocytes/macrophages	27
		II.2.2.2 Lymphocytes T	27
		II.2.2.3 Lymphocytes B	
	II.3 Ac	tivation des fibroblastes	
	II.3.1	Caractéristiques des fibroblastes dans la ScS	

	П.,	3.2 Orig	ine des fibroblastes	
	П.,	3.3 Rôles	des médiateurs cellulaires dans les modifications phénoty	piques des
		fibro	blastes dans la ScS	
		II.3.	3.1 Transforming growth factor (TGF- β), Connective Tiss	sue Growth
			Factor (CTGF) et Platelet-Derived Growth Factor (PD	<i>GF</i>)33
		II.3	3.2 Interleukines et chimiokines	
	Ш.,	3.4 Stres	ss oxydatif	
III	MON	OXYDE	D'AZOTE (NO)	
	III.1	Proprié	tés physico-chimiques du NO	
	III.2	Synthès	se endogène du NO	
	III.3	Mécani	smes d'action du NO	40
		III.3.1	Activité du NO dépendante du GMP cyclique	41
		III.3.2	Activité du NO indépendante du GMP cyclique	41
	III.4	Voies n	nétaboliques du NO	42
	III.5	Rôles b	iologiques du NO	43
		III.5.1	Le NO en tant que vasodilatateur	
		III.5.2	Le NO en tant que biomarqueur de l'inflammation	
IV	MES	URE DU	NO DANS L'AIR EXPIRE	48
	IV.1	Principe	es de mesure	48
	IV.2	Modèle	s de mesure du NO expiré chez l'homme	48
		IV.2.1	Mesure directe de la concentration fractionnaire de	NO expiré
		(F_ENO)		
		IV.2.2	Modèle à deux compartiments	
	IV.3	Mesure	du NO expiré chez la souris	
V	MOD	DELES A	NIMAUX	
	V.1	Modèle	de la fibrose induite par la bléomycine	
		V.1.1	Introduction du modèle	
		<i>V.1.2</i>	Mécanismes physiopathologiques du modèle	59
	V.2	Modèle	murin de la ScS induite par le stress oxydatif	61
		V.2.1	Rôle du stress oxydatif dans la physiopathologie de la ScS	61

<i>V.2.2</i>	Caractéristiques	biochimiques	de l'acide	hypochloreux	(HOCl)6	52

V.2.3 Modèle murin de ScS induite par l'acide hypochloreux......64

C. TRAVAUX PERSONNELS	6)(5
-----------------------	---	----	---

I Première étude :

II Deuxième étude :

La CANO permet de prédire la détérioration de la fonction respiratoire des patie	nts
atteints de sclérodermie systémique	77

III Troisième étude :

Cinétique de l'augmentation du NO e	expiré dans	un modèle	murin de	sclérodermie
systémique induite par l'acide hypochle	oreux (HOCl	l)		

D.	DISCUSSION	103
E.	CONCLUSION – PERSPECTIVES	112
F.	BIBLIOGRAPHIE	114
G.	ANNEXES	132
H.	RESUME	156

LABORATOIRES D'ACCUEIL

- Service de Physiologie - Explorations Fonctionnelles, Hôpital Cochin, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris.

Adresse : 27 rue du faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris.

- Laboratoire Universitaire de Physiologie Respiratoire, UPRES-EA 2511 « Biologie, Physiologie et Pathologie Respiratoires ». Faculté de Médecine Cochin-Port-Royal.

Adresse : 24 rue du faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris

REMERCIEMENTS

Je souhaite adresser mes profonds remerciements à Monsieur le Professeur Anh Tuan DINH-XUAN de m'avoir accepté dans son équipe, de m'avoir soutenu pendant mes études et d'avoir accepté de diriger ce travail de thèse. Il m'a accordé sa confiance tout au long de ces années et je lui en suis profondément reconnaissant.

Je remercie Madame le Professeur **Isabelle FAJAC** de me faire l'honneur de juger cette thèse en qualité d'examinateur et de présidente du Jury. Qu'elle trouve ici l'assurance de ma respectueuse considération.

Je tiens à remercier chaleureusement Monsieur Le Professeur **Frédéric BATTEUX** d'avoir accepté de juger mon travail de thèse en qualité de rapporteur. Qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude et de mon profond respect.

J'exprime mes sincères remerciements à Monsieur le Docteur **Philippe HERVE** d'avoir accepté de juger mon travail de thèse en qualité de rapporteur. J'en suis vraiment très honoré.

Je tiens à remercier le Docteur **Kiet Phong TIEV** pour sa collaboration, ses conseils éclairés dans l'analyse statistique et la rédaction scientifique ainsi que son amitié.

Je remercie vivement le Docteur **Sy DUONG-QUY** de m'avoir guidé dans mes premières expériences au laboratoire et pour sa contribution à la mesure du NO expiré chez la souris.

Je tiens à remercier le Docteur **Nhat Nam LE-DONG** pour sa collaboration dans la mesure du NO expiré et pour les bons moments partagés ensemble.

Je remercie également

Mes collègues du Laboratoire de Physiologie Respiratoire : Clémence, Sébastien, Yihua, Guïti et Murielle ainsi que mes collaborateurs du Laboratoire d'Immunologie clinique, Christiane et Carole, et le personnel du Service de Physiologie - Explorations Fonctionnelles de l'Hôpital Cochin pour le travail accompli.

Je dédie ce travail

A *ma mère et ma sœur* au Vietnam, pour m'avoir soutenu et encouragé tout au long de ma vie.

A *mon père* qui nous a quittés pendant la réalisation de ce travail de Thèse.

A *ma femme* et *notre première fille* qui remplissent ma vie en lui donnant un autre sens.

LISTE DES ABREVIATIONS

- α -SMA Alpha smooth muscle actine
- AECA Anticorps anti-cellule endothélial
- AFA Anticorps anti-fibroblaste
- AOPP Produits d'oxydation avancée des protéines
 - AP-1 Activating protein-1
 - **BAF** B cell-activating factor
- BH4 Tétrahydrobioptérine
- **BPCO** Broncho-pneumopathie chronique obstructive
- C_ANO Concentration alvéolaire du NO
- CCL18 Chemokine (C-C motif) ligand 18
- CCL2 Chimiokine C ligand 2
 - CNO Concentration du NO en phase gazeuse dans la lumière bronchique
 - **CO** Monoxyde de carbone
- **CPT** Capacité pulmonaire totale
- CTGF Connective tissue growth factor
- **CVF** Capacité vitale forcée
- DLCO Facteur de transfert pour le CO dans les poumons
 - $\mathbf{D}_{\mathbf{NO}}$ Facteur de transfert du NO dans les poumons
 - EFR Explorations fonctionnelles respiratoires
- **ERO** Espèces réactives de l'oxygène
- **ET-1** Endothéline 1
- FAD Flavine adénine dinucléotide (Co enzyme)
- F_ENO Concentration fractionnaire du NO expiré
- FMN Flavine mononucléotide (Co enzyme)
- H₂O₂ Peroxyde d'hydrogène
- Hb Hémoglobine
- HTAP Hypertension artérielle pulmonaire
- ICAM Inter-cellular adhesion molecule 1
- IFN-γ Interféron-γ
- **IGF-1** Insulin-like growth factor-1
 - IL Interleukine
- J°awNO Débit absolu bronchique du NO
 - **J°**_{NO} Débit absolu alvéolaire du NO
 - KL-6 Glycoprotéine Klebs de type mucine à haut poids moléculaire
 - LBA Lavage broncho-alvéolaire
- MAPK Mitogen-activated protein kinase
- MCP-1 Monocyte chemoattractant protein-1
- MEC Matrice extracellulaire
- **MIP-1** α Macrophage inflammatory protein-1 α
 - MPO Myéloperoxidase
 - N2O Oxyde de dinitrogène
 - N2O3 Trioxyde dinitrogène
 - N₂O4 Tétraoxyde dinitrogène
- NADPH Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (co-facteur)
- NANC Système non-adrénergique et non-cholinergique
- **NF-κB** Nuclear factor kappa-B (facteur de transcription)

- **NGF** Nerve growth factor
- NO Monoxyde d'azote
- **NO-** Anion nitroxyl
- NO2* Dioxyde d'azote
- NO2- Nitrite
- NO3- Nitrate
- **NOS** NO synthase (Enzyme)
- NOS-1 (NOSn) NO synthase neuronale
- NOS-2 (NOSi) NO synthase inductible
- NOS-3 (NOSe) NO synthase endothéliale
 - **NOx** Nitrite et nitrate
 - NSIP Pneumopathie interstitielle non spécifique
 - **O2**^{o-} Anion superoxyde
 - O3 Ozone
 - **OH°** Radical hydroxyle
 - **ONOO**⁻ Peroxynitrite
 - PAR-1 Protease-activated receptor-1
 - PCNA Proliferating cell nuclear antigen
 - **PDGF** Platelet-derived growth factor
 - **PID** Pneumopathie interstitielle diffuse
 - PKG Protéine kinase dépendante de GMP cyclique
 - **RS-NO** Nitrosothiols et nitrosamines
 - ScS Sclérodermie systémique
 - SP-A Surfactant-A
 - SP-D Surfactant-D
 - **STAT-1** α Signal transducer and activator of transcription-1 α
 - TDM Tomodensitométrie
 - **TDM-HR** Tomodensitométrie à haute résolution
 - **TGF-β** Transforming growth factor beta
 - **Th2** Lymphocyte T helper de type 2
 - **TNF***α* Tumor necrosis factor-alpha
 - **UIP** Pneumopathie interstitielle commune
 - VA Volume alvéolaire
 - **V°**_A**NO** Débit de production alvéolaire du NO
 - VCAM Vascular cell adhesion molecule 1
 - V°_E Débit expiratoire
 - VEGF Vascular endothelial growth factor
 - **V°NO** Débit de production du NO

INTRODUCTION

La sclérodermie systémique est une maladie auto-immune d'origine inconnue, caractérisée par une activation du système immunitaire, une dysfonction endothéliale et une fibrose progressive des organes internes et de la peau [1]. L'atteinte pulmonaire présente deux facettes : la fibrose pulmonaire (ou pneumopathie interstitielle diffuse, PID) et l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP). Elle représente actuellement la première cause de morbidité et de mortalité directement liée à la ScS [2, 3]. La prise en charge de l'atteinte pulmonaire des patients atteints de ScS reste difficile car la progression de la PID est imprévisible et sa gravité variable entre patients. La physiopathologie de la maladie est complexe et n'est que partiellement connue. Un des défis cliniques est d'identifier les patients atteints de ScS ayant un risque élevé de développer une PID afin de leur proposer un traitement précoce dont l'efficacité sera d'autant plus grande que l'atteinte respiratoire est encore peu importante. Les traitements disponibles sont basés sur les médicaments immunosuppresseurs qui ont pour but de freiner ou d'arrêter l'alvéolite, manifestation précoce et encore réversible de la fibrose pulmonaire [4, 5]. Les explorations fonctionnelles respiratoires (EFR) constituent actuellement la méthode de surveillance recommandée de la PID liée à la ScS. Le test de marche de 6 minutes et le scanner thoracique évaluent respectivement les conséquences fonctionnelles et radiologiques des lésions de fibrose à un stade avancé de la maladie. La fibroscopie bronchique avec lavage broncho-alvéolaire (LBA) est un examen invasif qui apporte des preuves directes de l'alvéolite active, mais son usage reste limité en pratique clinique chez le patient atteint de ScS, réputé fragile [6, 7]. Il est donc nécessaire de développer un test non-invasif capable de détecter la présence, et/ou de suivre l'évolution, d'une inflammation débutante et/ou évolutive du poumon profond chez le patient atteint de ScS.

Le monoxyde d'azote (NO) est un médiateur inter- et intracellulaire de nature gazeuse. Le NO joue un rôle physiologique important dans la régulation du tonus vasculaire. Lors de la réaction inflammatoire, le NO participe à l'immunité non spécifique et à la défense antiinfectieuse par ses effets cytotoxiques vis-à-vis des virus, bactéries et parasites. Sous l'effet d'une stimulation par des cytokines pro-inflammatoires, la cellule produit une grande quantité de NO, 100 à 1 000 fois plus élevée que la production physiologique normale [8]. Il semble pertinent de quantifier ce marqueur lors de la fibrose pulmonaire tant les arguments en faveur du rôle de l'inflammation alvéolaire dans l'apparition et la progression de la fibrose pulmonaire au cours de la ScS semblent convaincants. La première partie de ma thèse décrira l'état de nos connaissances sur le rôle du NO dans la fibrose interstitielle et les moyens disponibles pour évaluer sa production pulmonaire. Les produits d'oxydation du NO peuvent être quantifiés par la mesure des concentrations sériques de nitrites et de nitrates, et l'évaluation quantitative du NO dans l'air expiré. Puisque le NO peut être synthétisé aussi bien par les cellules des voies aériennes que celles du compartiment alvéolaire, il est donc important de pouvoir préciser l'origine anatomique du NO détecté dans l'air expiré. La modélisation de la synthèse pulmonaire et de la diffusion du NO entre différents compartiments tissulaires permet de calculer les concentrations locales (alvéolaires et bronchiques) et les débits de production du NO en fonction des débits expiratoires. Grâce à la modélisation des poumons assimilés à un organe à deux compartiments (un compartiment conducteur représenté par les bronches et un compartiment échangeur représenté par l'espace alvéolaire), nous avons mesuré le débit bronchique et la concentration alvéolaire du NO (CANO) à partir d'un minimum de 3 débits expiratoires. La concentration de NO dans l'air expiré est utilisée pour suivre l'évolution des maladies inflammatoires bronchiques comme l'asthme et la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) [9]. Nous avons trouvé [10], avec d'autres équipes [11-13], que la mesure de la CANO permet non seulement de détecter l'inflammation alvéolaire, mais elle est également corrélée à la présence et l'importance de la PID chez les patients porteurs d'une ScS. La deuxième partie de ma thèse porte sur l'évaluation de la valeur prédictive de la CANO sur l'évolution de la PID liée à la ScS et les liens physiopathologiques entre l'augmentation du NO expiré et les modifications phénotypiques des fibroblastes pulmonaires.

Une des difficultés de l'étude de la physiopathologie de la PID est l'accès aux tissus pulmonaires des patients atteints de ScS. Les modèles expérimentaux de fibrose pulmonaire sont développés pour mieux caractériser les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans les processus inflammatoires et profibrosants. La recherche effectuée chez l'animal de laboratoire, contrairement à la recherche clinique, permet un accès facile aux cellules et tissus. Pour autant, les études in vivo chez le petit animal, notamment la mesure du NO expiré effectué chez l'animal éveillé est loin d'être aisée. C'est pour cela que nous avons mis au point un système de mesure de concentration fractionnaire du NO dans l'air expiré (F_ENO) chez les souris porteuses d'une ScS expérimentale, pour évaluer l'inflammation pulmonaire avant et pendant l'installation de la fibrose pulmonaire causée par un inducteur de stress oxydatif, l'acide hypochloreux.

REVUE DE LA LITTERATURE

L'atteinte pulmonaire au cours de la sclérodermie systémique (ScS) comprend l'hypertension artérielle pulmonaire et la pneumopathie interstitielle diffuse (PID). La crise rénale sclérodermique, qui fut dans les années 80 la première cause de mortalité, a depuis nettement diminué de fréquence grâce à l'avènement des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine. En revanche, faute de traitements efficaces à visée pulmonaire, la fréquence des complications pulmonaires est restée stable, expliquant pourquoi les deux complications pulmonaires réunies sont aujourd'hui devenues la première cause de mortalité des patients atteints de ScS [2].

I La pneumopathie interstitielle diffuse

I.1 Prévalence

La prévalence de la PID varie selon la méthode diagnostique mise en œuvre. En effet, la radiographie thoracique est moins performante que le scanner thoracique en coupes fines pour détecter la PID. La prévalence de la PID retrouvée à la radiographie pulmonaire varie entre 33% et 65% [14-16], celle retrouvée avec le scanner thoracique en coupes fines est plus élevée, se situant entre 53% et 93% [15, 17-20]. La prévalence retrouvée au scanner thoracique est plus proche de celle des séries autopsiques qui se situe entre 74% à 100% [21, 22]. Il faut néanmoins signaler que les atteintes pulmonaires des études autopsiques ne concernent que les patients gravement atteints et ne pourraient de ce fait être représentatives des atteintes respiratoires au cours de la ScS.

La PID évolue dans un tiers des cas vers une insuffisance respiratoire terminale liée à une perte de volume pulmonaire, elle-même consécutive à la progression de la fibrose pulmonaire [2]. Le profil évolutif de cette complication sévère reste imprévisible. Les facteurs associés à un profil évolutif agressif et rapide sont : le sexe masculin, la forme diffuse de ScS, une longue évolution de la maladie, l'origine africaine des patients, et la présence d'auto-anticorps anti-topoisomérase-1 (ou Scl-70) [23, 24].

I.2 Clinique

La dyspnée d'effort est le symptôme le plus fréquent dont l'aggravation marque un tournant évolutif de l'atteinte pulmonaire. La toux sèche et les douleurs thoraciques atypiques représentent les autres symptômes, moins fréquents mais tout aussi invalidants pour les patients. A l'auscultation pulmonaire, on entend le plus souvent des râles crépitants en « velcro » aux bases pulmonaires. Cependant, la PID peut être découverte de manière fortuite au scanner thoracique chez un patient totalement asymptomatique. La dyspnée peut être d'apparition tardive, traduisant déjà une atteinte pulmonaire importante et étendue de la fibrose pulmonaire [25].

Les facteurs prédictifs de l'aggravation de la PID sont peu nombreux, comprenant la capacité vitale forcée (CVF) et l'étendue de la fibrose pulmonaire constatée au scanner thoracique [6]. Seule la détection précoce des formes de fibrose pulmonaire ayant un risque élevé d'aggravation serait cliniquement utile, car elle permettrait alors l'identification de patients atteints de ScS nécessitant un traitement approprié et précoce afin d'empêcher l'évolution de la fibrose pulmonaire vers un stade irréversible [26, 27]. Les examens complémentaires pratiqués régulièrement au cours du bilan de surveillance annuel sont primordiaux pour le suivi de la PID.

I.3 Diagnostic

L'examen de référence pour le diagnostic de PID est la tomodensitométrie (TDM) pulmonaire. Les EFR permettent d'évaluer le retentissement de la PID sur la fonction respiratoire. Le LBA permet de détecter de manière invasive l'alvéolite. Cependant, il n'existe pas de corrélations étroites entre les anomalies retrouvées avec ces différents examens.

I.3.1 Examens radiologiques

La sensibilité de la radiographie thoracique à évaluer l'extension de l'atteinte interstitielle dans la PID est faible par rapport à la TDM thoracique, surtout dans la phase débutante de la maladie [28]. Les signes évocateurs sont un syndrome interstitiel, les images en aspect de verre dépoli, d'épaississement septal, de type réticulaire ou en aspect de « rayon de miel » dans les formes les plus évoluées [29].

- Les *images en verre dépoli* sont définies par une augmentation floue de la densité du parenchyme pulmonaire, avec conservation des bords bronchiques et vasculaires ; pouvant être associées à un bronchogramme aérien. Elles peuvent avoir plusieurs étiologies, comme un comblement partiel des espaces aériens, un épaississement de l'interstitium, un collapsus partiel des alvéoles, ou une augmentation du volume sanguin capillaire.
- Les opacités réticulées sont caractérisées par des lignes ombrées innombrables et entrelacées ressemblant à un grillage, qui peuvent être fines, intermédiaires ou épaisses. L'aspect radiologique en « rayon de miel » correspond à des espaces aériens kystiques, de localisation sous-pleurale, caractérisés par des parois souvent épaissies, de diamètre variant de 0,3 à 1 cm mais pouvant aller jusqu'à 2,5 cm. Les lésions prédominent au niveau des lobes inférieurs, dans les régions périphériques et postérieures. D'autres anomalies sont moins fréquemment retrouvées comme des adénopathies médiastinales, des anomalies pleurales, des micronodules parenchymateux ou sous-pleuraux [18, 30, 31].

L'association de certains aspects de la tomodensitométrie thoracique et la répartition des lésions pulmonaires sont préférentiellement associées à certains aspects histologiques. Ainsi, la pneumopathie interstitielle non spécifique (*non specific interstitial penumonia*, NSIP) est caractérisée par des images en verre dépoli bilatéraux et symétriques prédominant aux bases pulmonaires, associées à des images réticulaires et linéaires irrégulières et disséminées. Ces deux types de lésions peuvent coexister dans la même zone du parenchyme pulmonaire avec une distribution péri-bronchique préférentielle. L'aspect de pneumopathie interstitielle commune (*usual interstitial pneumonia*, UIP) se voit plus souvent aux bases pulmonaires avec des lésions sous-pleurales et para-septales, d'aspect pseudo-kystique ou en rayon de miel. L'aspect en rayon de miel est prédominant, bien qu'il existe une alternance de zones pathologiques et de zones saines, ce type histologique d'UIP est plus sévère que la NSIP [32].

Plusieurs études ont trouvé une bonne corrélation entre les images radiologiques et les aspects histologiques [33, 34]. Les images en verre dépoli correspondent généralement au niveau anatomopathologique à des zones d'inflammation des poumons, avec un infiltrat abondant de cellules mononucléées intra-alvéolaire et interstitiel. Ces images en verre dépoli

sont communément considérées comme le reflet de la phase précoce et inflammatoire de la PID [30].

Dans l'histoire naturelle de l'évolution de la fibrose pulmonaire, les « images en verre dépoli » se transforment peu à peu en images réticulaires. Les images en « rayon de miel » correspondent à une fibrose évoluée et rétractile responsable d'une bronchiectasie ou bronchioloectasie par traction [35]. La fibrose pulmonaire débute de façon multifocale, touchant plusieurs zones du parenchyme pulmonaire en même temps. Sa progression se fait par phases successives, ce qui explique la coexistence de deux aspects scanographiques [25, 36] et des lésions histologiques associant des zones pulmonaires inflammatoires et des zones de fibrose pulmonaire. La présence isolée des images en verre dépoli est davantage le reflet d'une pneumopathie inflammatoire pouvant parfois être réversible avec régression des images tomodensitométriques. En revanche, les lésions réticulaires et en aspect de rayon de miel sont des images totalement irréversibles [35, 37].

Goh et coll. [6] ont montré que la CVF et l'étendue de la fibrose visualisée au scanner thoracique permettaient d'identifier les patients présentant un risque élevé d'aggravation de la fibrose pulmonaire. Les patients ayant à la fois une fibrose étendue (supérieure à 20%) et une diminution de la CVF (inférieure à 70%) avaient davantage de risque d'avoir une fibrose rapidement évolutive associée à une plus forte mortalité. Les auteurs ont proposé un simple système d'évaluation semi-quantitative de l'étendue de la PID basé sur la TDM-HR et le résultat des EFR [6]. Cependant, l'ensemble de ces paramètres (score tomodensitométrique et valeurs de la CVF) ne mesure que l'étendue des lésions « irréversibles », la valeur pronostique de ces paramètres restant faible. En effet, la constatation selon laquelle les patients ayant déjà une fibrose pulmonaire sévère sont également ceux ayant la mortalité la plus élevée relève presque de l'évolution (sévère ou non) ultérieure de cette fibrose lorsqu'elle est encore peu évoluée.

I.3.2 Explorations fonctionnelles respiratoires (EFR)

Les EFR sont des examens non invasifs et reproductibles qui permettent d'évaluer le retentissement fonctionnel et mécanique de la sclérodermie sur la fonction respiratoire. Elles peuvent mettre en évidence un syndrome restrictif, caractérisé par une diminution de la

capacité pulmonaire totale (CPT < 80% de la valeur théorique). Le syndrome restrictif est souvent associé à une diminution de la CVF et de la diffusion pulmonaire du monoxyde de carbone (DLCO).

Bien que la définition du syndrome restrictif soit basée sur la diminution de la CPT, la CVF et la DLCO sont plus souvent utilisées comme critères de jugement objectifs dans les essais cliniques. Les études évaluant l'efficacité des médicaments, comme le cyclophosphamide ou l'interféron- γ (IFN- γ), ont utilisé les valeurs absolues pour calculer le pourcentage de variation des paramètres respiratoires. La réduction de la CVF \geq 10% ou de la DLCO \geq 15% (à partir des valeurs mesurées à l'inclusion) ont été utilisés dans les essais cliniques testant l'efficacité des médicaments dans la prise en charge thérapeutique des PID [6, 38]. Dans les études prospectives et longitudinales évaluant la PID, la diminution de la CVF est plus performante que la différence alvéolaire-artérielle en oxygène ou la réduction de la DLCO pour prédire la dégradation de la fonction respiratoire et la mortalité des malades [39-41]. Il existe une corrélation significative entre la CVF (atteinte fonctionnelle) et l'étendue des lésions pulmonaires évaluées par la TDM-HR (atteinte anatomo-radiologique) [6].

La valeur de la DLCO est inversement proportionnelle à l'épaisseur de la membrane alvéolo-capillaire et directement proportionnelle au volume capillaire pulmonaire comme l'ont montré Roughton et Forster dans leur description princeps du phénomène de diffusion alvéolo-capillaire des gaz [42]. Ainsi, la diminution de la DLCO peut être le reflet soit d'un épaississement de la membrane alvéolo-capillaire, soit d'une diminution du volume capillaire pulmonaire. Les patients atteints de ScS ayant une DLCO initiale inférieure à 55% de la valeur théorique ont un plus grand risque de développer une HTAP sur une période de suivi de 5,4 ans en moyenne [41, 43, 44]. D'après Steen et collaborateurs, la diminution isolée de la DLCO est plus sensible que les anomalies scanographiques de la TDM-HR pour prédire l'aggravation de la fibrose pulmonaire dans la ScS [45].

Le test de marche de 6 minutes est un test fonctionnel qui mesure la distance de marche (que le patient effectue à une allure vive, sans courir) parcourue en 6 minutes. Cette distance intègre la capacité de l'appareil locomoteur et la capacité d'adaptation cardiorespiratoire à l'exercice. La désaturation en oxygène, pendant et au décours du test de marche de 6 minutes, est un signe de sévérité de la PID [46, 47] et de l'HTAP [47, 48]. Bien

que la reproductibilité et la validité du test soient satisfaisantes chez les patients ayant une ScS [49], les études évaluant la corrélation entre la distance de marche et les paramètres fonctionnels respiratoires (CVF et DLCO) donnent des résultats contradictoires, probablement à cause de l'hétérogénéité interindividuelle des facteurs de comorbidité et de déconditionnement à l'exercice d'origine non respiratoire [48-50].

I.3.3 Lavage broncho-alvéolaire

Le lavage broncho-alvéolaire (LBA) est la quantité de liquide obtenu par aspiration des bronches distales et des alvéoles après une injection de 60 ml à trois reprises. Le liquide de LBA permet l'analyse du nombre de cellules et de leurs proportions, et reflète l'infiltration des cellules dans la zone du parenchyme pulmonaire lavée. L'analyse cellulaire du liquide de LBA permet d'éliminer une infection broncho-pulmonaire et d'affirmer une alvéolite active chez les patients ayant une sclérodermie systémique dont les signes cliniques et fonctionnels évoquent une atteinte pulmonaire (fièvre, asthénie, crépitants aux bases). L'alvéolite est caractérisée par une augmentation des polynucléaires neutrophiles [7, 51-56], associée ou non à une augmentation des polynucléaires éosinophiles [7, 51, 53, 56, 57]. Certaines études ont également trouvé une augmentation des lymphocytes chez des patients sclérodermiques [7, 54, 55] mais l'alvéolite à lymphocytes est plutôt présente dans les formes débutantes de fibrose pulmonaire [55].

Certaines études ont montré que l'augmentation des neutrophiles ou des éosinophilies dans le liquide du LBA est associée à des formes évoluées de la PID [51, 53, 58]. Bien que plusieurs études utilisent la neutrophilie du LBA comme critère d'évaluation de la sévérité de la PID, et dans le suivi thérapeutique des essais cliniques [7, 51, 54-56, 59], la valeur pronostique de ce marqueur reste controversée [6, 7, 56]. Dans une étude de cohorte de 141 patients atteints de ScS, la neutrophilie retrouvée dans le LBA est un mauvais facteur pronostique chez les patients dont la durée de la maladie est inférieure à 2 ans, mais ne l'est pas chez les patients ayant une durée de la maladie supérieure à 2 ans. L'étude a conclu que les résultats de LBA n'ont pas apporté plus d'information vis-à-vis de l'évolutivité de la PID par rapport aux EFR et à la TDM-HR. Il n'existe pas de corrélation entre le nombre d'éosinophiles et de lymphocytes du LBA et la mortalité, ou la vitesse de la dégradation fonctionnelle respiratoire chez ces patients [6]. Une étude ancillaire du groupe « Scleroderma Lung Study » a montré que la cellularité du LBA (reflétant la présence ou non d'une

alvéolite) ne permet pas l'identification des patients répondeurs au traitement par le cyclophosphamide [56]. En revanche, le LBA est un outil indispensable pour étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires de la physiopathologie de la PID liée à la ScS [7, 56, 60].

I.3.4 Histo-anatomo-pathologie

Les pneumopathies interstitielles diffuses comprennent classiquement deux phases : une phase inflammatoire du parenchyme pulmonaire encore appelée alvéolite, suivie d'une phase fibrosante irréversible. Les patients atteints de sclérodermie systémique ayant une inflammation pulmonaire sont plus susceptibles d'aggraver leur fonction respiratoire au cours de l'évolution de leur maladie [61, 62].

Les informations scientifiques des études anatomo-pathologiques des poumons prélevés en post-mortem chez les patients présentant une fibrose pulmonaire publiées avant 1990 semblent aujourd'hui discutables. En 1991, Harrison et collaborateurs [32, 63] ont effectué la première étude mettant en relation l'aspect histologique des biopsies pulmonaires et les anomalies radiologiques chez les malades atteints de ScS. Ces auteurs ont mis en évidence une association entre les anomalies structurales précoces du parenchyme pulmonaire et les lésions histologiques. Cet infiltrat leucocytaire, associé à une augmentation du nombre des macrophages et plus rarement des polynucléaires neutrophiles et des lymphocytes dans les espaces alvéolaires, est corrélé de façon significative à une fibrose des parois alvéolaires. On note aussi la présence des lymphocytes activés et les plasmocytes. Des mastocytes sont retrouvés par endroit au contact des fibroblastes interstitiels, suggérant que la fibrose pourrait être médiée par les mastocytes. Cette étude princeps a permis à ses auteurs de montrer la présence de foyers inflammatoires alvéolaires actifs associée à une fibrose pulmonaire étendue [63].

On décrit habituellement 6 grands types de lésions histologiques de la pneumopathie interstitielle diffuse d'après les recommandations de l'ATS/ERS publiées en 2002, résumées dans l'Annexe A [64]. Les formes anatomopathologiques de la PID les plus fréquemment rencontrées au cours de la sclérodermie sont la pneumopathie interstitielle non spécifique (ou NSIP) et la pneumopathie interstitielle commune (ou UIP). L'aspect histologique de NSIP semble plus fréquent que celui d'UIP bien que les fréquences relatives de ces deux formes

varient selon les études [32, 65, 66]. Dans une étude rétrospective portant sur les biopsies chirurgicales pulmonaires de 80 patients atteints de ScS, Bouros et collaborateurs [67] ont trouvé un aspect de NSIP chez 62 patients (77,5%), d'UIP chez 6 patients, et de fibrose en rayons de miel avec une perte complète de l'architecture alvéolaire chez 6 patients (Bouros_2002). En revanche, le pronostic de la fibrose pulmonaire ne semble pas dépendant de l'aspect histologique alors qu'il est fortement corrélé à la diminution de la CVF et de la DLCO. Dans ces conditions, la biopsie pulmonaire itérative n'est pas justifiée pour suivre les patients atteints de ScS avec une fibrose pulmonaire, contrairement à la fibrose pulmonaire idiopathique où la présence d'une UIP, synonyme de pronostic péjoratif, nécessite le recours à la biopsie pulmonaire pour sa mise en évidence.

I.3.5 Biomarqueurs sériques

Plusieurs biomarqueurs ont été impliqués dans le diagnostic, le pronostic et le suivi thérapeutique de la PID dans la ScS. Ces biomarqueurs peuvent être différenciés et classés selon leurs origines cellulaires. Provenant des cellules épithéliales alvéolaires de type-2, les protéines du surfactant-A (SP-A), -D (SP-D) et la glycoprotéine Klebs de type mucine à haut poids moléculaire (KL-6) dont la concentration sérique est corrélée à la sévérité de la maladie évaluée par la TDM-HR [68, 69] ou par les EFR [70-72], sont les biomarqueurs les plus spécifiques pour l'évaluation du pronostic de la maladie [73, 74].

La chimiokine CCL-18, essentiellement sécrétée par les macrophages alvéolaires activés par les cytokines de type Th2, joue un rôle important dans la fibrose pulmonaire par stimulation des fibroblastes responsables de la production excessive des collagènes. L'augmentation de la concentration sérique de CCL-18 est associée au développement de la fibrose pulmonaire ainsi qu'à la réduction de la CVF et de la DLCO [75]. La concentration de CCL-18 dans le liquide de LBA est également plus élevée chez des patients sclérodermiques avec une alvéolite active, attestée par la cellularité leucocytaire [76]. Plus récemment, nous avons montré que la concentration sérique de CCL-18 permet d'identifier les patients ScS possédant un risque élevé d'aggravation de la fonction respiratoire sur une période de suivi de 33 mois en moyenne [77] (Annexe B).

Enfin, les biomarqueurs d'origine endothéliale comme le VEGF, l'endothéline-1 ou les molécules d'adhésion vasculaire [78] sont parfois associés à l'activité de la PID [79,80].

Ces marqueurs endothéliaux sont néanmoins considérés comme plus spécifiques de l'HTAP (que de la PID) dans la sclérodermie systémique [74].

I.3.6 Apports respectifs des différents examens complémentaires

Les résultats de ces examens complémentaires ne sont pas toujours cohérents, rendant l'interprétation difficile [28, 30]. La plupart des auteurs ont néanmoins conclu que l'examen du liquide de LBA est plus sensible que le scanner thoracique pour détecter la pneumopathie interstitielle diffuse dans la sclérodermie systémique et que les anomalies du liquide de LBA pourraient précéder les anomalies radiologiques dans la majorité des cas.

Dans une étude prospective réalisée sur 54 patients avec une alvéolite fibrosante cryptogénique et 57 patients sclérodermiques, Wells et coll. ont trouvé que la sévérité de l'atteinte fonctionnelle respiratoire n'est pas associée à la présence d'images en verre dépoli visualisées par la TDM-HR et que les EFR ne permettent pas, de ce fait, de distinguer la phase inflammatoire précoce de la phase fibrosante irréversible de la PID. Cette constatation est valable tant pour l'examen initial que pour les études de suivi de la maladie [81].

Au final, les données anatomopathologiques, cytologiques et radiologiques confirment l'existence d'une inflammation pulmonaire à la phase initiale de la PID. Cette phase inflammatoire semble transitoire et difficile à détecter. Il s'agit cependant de la seule phase au cours de laquelle nous avons la possibilité d'agir de façon précoce et efficace afin de changer le cours de la maladie par un traitement anti-inflammatoire empêchant l'évolution ultérieure vers une fibrose irréversible. En effet l'inflammation pulmonaire évolue, mais de façon non linéaire, avec des phases d'accalmie et des périodes d'exacerbation, vers le développement d'une fibrose irréversible, altérant de façon définitive la fonction d'échanges gazeux des poumons. Malgré son intérêt pour le diagnostic de l'alvéolite, la fibroscopie bronchique et le LBA sont difficilement réalisables de façon répétée pour le suivi des malades. Il serait alors intéressant de disposer d'un paramètre biologique plus facilement accessible pour le personnel soignant, et moins invasif pour le malade, obtenu à partir d'un prélèvement sanguin et/ou urinaire ou à partir de l'analyse de l'air expiré, pour détecter cette inflammation et suivre son évolution au cours du temps ou en réponse à telle ou telle intervention thérapeutique.

Il n'existe pas d'études évaluant la relation entre le nombre et la proportion des cellules inflammatoires du liquide de LBA et la concentration de monoxyde d'azote (NO) ou

de ses métabolites (nitrites et nitrates ou NOx) dans le sérum ou le liquide de LBA. En revanche, de nombreuses études, initiées depuis le milieu des années 90, ont porté sur la mesure du NO dans l'air expiré et des NOx dans le sérum chez les patients atteints de ScS [10, 11, 82-86]. La partie concernant le NO dans la ScS sera traitée dans une partie à part de cette thèse.

II Mécanismes cellulaires de la fibrose pulmonaire dans la sclérodermie systémique

La physiopathologie de la ScS n'est que très partiellement connue. En revanche, les anomalies histologiques sont bien décrites, montrant l'implication des cellules endothéliales, des fibroblastes et des cellules du système immunitaire dont les monocytes/macrophages et les lymphocytes. Les altérations fonctionnelles de ces cellules expliquent certaines des manifestations cliniques de la maladie. Les lésions cellulaires (Figure 1) sont caractérisées par une triade, comprenant :

- 1. un *dysfonctionnement endothélial* qui semble jouer le rôle de phénomène initiateur,
- un dérèglement du système immunitaire avec activation des lymphocytes T et B, responsables d'une production accrue des cytokines, des facteurs de croissance et des auto-anticorps, ainsi qu'une infiltration chronique des monocytes/macrophages et des lymphocytes T dans les tissus touchés,
- 3. une *fibrose progressive* de la peau et des organes internes [87, 88] qui résulteraient des évènements précédents.



Figure 1: Mécanismes cellulaires de la pathophysiologie de la fibrose dans la sclérodermie systémique.

II.1 Lésions vasculaires et dysfonction endothéliale

La lésion vasculaire représente l'événement le plus précoce au cours de l'histoire naturelle de la ScS comme attestée par le phénomène de Raynaud et les ulcères digitaux chez les patients atteints de ScS [89]. Ces lésions vasculaires peuvent être la conséquence des effets directs ou indirects des auto-anticorps anti-cellules endothéliales (AECA) dont la concentration sérique est souvent élevée chez les patients atteints de ScS. Les AECA provoquent l'activation des cellules endothéliales qui vont surexprimer à leurs surfaces les molécules d'adhésion vasculaire (VCAM1, ICAM et E-Sélectine) permettant l'adhésion et la diapédèse des cellules mononucléées. Ces dernières vont migrer vers le site de la lésion, entretenant et/ou accentuant l'inflammation locale [87].

Une dysfonction endothéliale favorise également la vasoconstriction. Les cellules endothéliales lésées augmentent la synthèse et la sécrétion des cytokines vasoconstrictrices comme l'endothéline-1 (ET-1) et diminuent celle de facteurs endothéliaux vasodilatateurs comme le monoxyde d'azote (NO) et la prostacycline. Ceci entraîne une vasoconstriction et un défaut d'oxygénation tissulaire dont l'hypoxie résultante stimule la production de VEGF [90]. On note également une augmentation de la synthèse des facteurs angiogéniques accompagnée d'une diminution des cellules progénitrices des cellules endothéliales au cours de la ScS, responsables de la raréfaction du lit vasculaire, l'apparition des ulcères digitaux et le développement d'une hypertension artérielle pulmonaire [91].

L'endothéline-1 joue un rôle primordialt dans la fibrogenèse de la ScS. Elle induit la prolifération des fibroblastes [92] et stimule la différentiation de ces derniers en myofibroblastes [93]. L'ET-1 a un effet profibrosant similaire à celui du TGF- β en stimulant la sécrétion de CTGF qui provoque à son tour la synthèse de collagènes [94]. Le traitement par le bosentan, un antagoniste non sélectif des récepteurs ET-A et ET-B de l'ET-1, peut empêcher la survenue d'une fibrose pulmonaire chez les rats intoxiqués par la bléomycine [95]. Malheureusement, le traitement par le bosentan n'a pas amélioré de façon significative la capacité d'exercice des patients porteurs d'une PID associée à la ScS [96].

Les lésions vasculaires entraînent un déséquilibre de la balance coagulation/fibrinolyse et provoquent la libération in situ de thrombine [97]. La thrombine induit la prolifération des fibroblastes [98] et la transformation des fibroblastes pulmonaires en myofibroblastes [99, 100]. L'inhibiteur direct de thrombine, le Dabigatran, inhibe les effets profibrosants de la thrombine sur les fibroblastes *in vitro* en diminuant l'expression de α -SMA, du CTGF et la production de collagènes. L'étude préclinique récente a confirmé l'intérêt thérapeutique du Dabigatran dans la prévention et le traitement de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez la souris [101].

II.2 Inflammation et activation du système immunitaire:

L'inflammation et l'activation du système immunitaire jouent également un rôle important dans la fibrogenèse de la ScS, liant l'atteinte endothéliale à la fibrose tissulaire [102, 103].

II.2.1 Inflammation

L'inflammation pulmonaire est un processus cellulaire, caractérisé par l'infiltration de cellules inflammatoires (comme les lymphocytes T, les macrophages, les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, et les mastocytes) dans l'espace alvéolaire et le tissu interstitiel pulmonaire [61, 63]. Ces cellules inflammatoires induisent la fibrose pulmonaire par la production de médiateurs solubles capables d'initier et d'amplifier l'inflammation locale, puis l'activation secondaire des fibroblastes résidents.

Les chimiokines comme l'interleukine-8 (IL-8), la MIP-1 α , la RANTES (ou CCL-5) et la MCP-1 (ou CCL-2) peuvent attirer les lymphocytes T, les macrophages, les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles vers les lésions inflammatoires pulmonaires. Ces chimiokines peuvent indirectement stimuler la fibrose via l'augmentation de la production d'IL-6 et de TGF- β dont les effets profibrosants sont bien connus [104-106].

Les cytokines de la réponse immunitaire Th2 comme l'IL-4 et l'IL-5 peuvent également stimuler l'inflammation et la fibrose. La sécrétion de ces cytokines dans le liquide de LBA par les cellules mononucléées des patients atteints de ScS est plus élevée que celle des sujets témoins [107]. L'IL-4 exerce son effet chimiotactique vis-à-vis des fibroblastes cutanés [108] et stimule la transcription du collagène 1 α 2 par les fibroblastes cutanés et pulmonaires des patients atteints de ScS [109]. Les souris transgéniques surexprimant l'IL-4 sont caractérisées par une hyperplasie des cellules épithéliales et la présence d'un infiltrat pulmonaire constitué de macrophages, des lymphocytes et des polynucléaires éosinophiles et neutrophiles [110]. Les ARN messagers codant l'IL-2, l'IL-4, l'IL-5 et l'IFN- γ sont significativement augmentés chez des patients porteurs d'une PID liée à la ScS par rapport aux patients atteints d'alvéolite fibrosante cryptogénique et par rapport aux témoins [111].

En résumé, l'inflammation chronique, tant cutanée que pulmonaire, accompagne les lésions fibrotiques chez des patients atteints de ScS. Les cellules inflammatoires activées

synthétisent et sécrètent des cytokines profibrosantes dans le plasma et le liquide de LBA. Que ce soit à un niveau local (alvéolaire) ou systémique (affectant la peau et divers organes internes), les cytokines profibrosantes stimulent à leur tour les fibroblastes et initient la fibrose. Ces cytokines peuvent également avoir une action autocrine et/ou paracrine et induisent une fibrose pulmonaire dont l'évènement initiateur est de nature inflammatoire. La fibrose peut par la suite s'auto-entretenir alors que l'inflammation peut s'estomper, surtout lors des phases tardives de la maladie [1, 112].

II.2.2 Activation du système immunitaire

Les principales cellules du système immunitaire impliquées dans la physiopathologie de la ScS sont les macrophages et les lymphocytes.

II.2.2.1 Monocytes/macrophages

Les macrophages sont présents dans les infiltrats interstitiels et péri-vasculaires dermiques [113], les espaces alvéolaires et l'interstitium pulmonaire [61] des patients atteints de ScS. Chez ces patients, les monocytes CD14+ circulants et les macrophages dermiques expriment les marqueurs membranaires d'activation et de différentiation (CD163⁺ ou CD204⁺) vers le phénotype M2, caractérisé par la libération plus importante de médiateurs pro-inflammatoires et fibrogéniques comme le TGF- β [114]. Dans les phases précoces du modèle murin de réaction du greffon contre l'hôte, l'infiltration dermique de macrophages est accompagnée d'une augmentation de sécrétion des cytokines et des chimiokines comme le TGF- β , la MCP-1, la MIP-1 α et la RANTES. Il existe une bonne corrélation entre la présence de ces cellules inflammatoires et l'importance de la fibrose cutanée et de la fibrose pulmonaire survenue ultérieurement [115].

II.2.2.2 Lymphocytes T

Au cours de l'activation du système immunitaire adaptatif, les lymphocytes T CD4⁺ produisent classiquement soit des cytokines de type T helper-1, Th1 (IL12 et interféron γ), soit des cytokines de type Th2 (IL4, IL5 et IL13). Au cours de la ScS, il existe un déséquilibre de la balance Th1/Th2 en faveur du profil Th2 qui favorise les processus biologiques menant à la fibrose, quel qu'en soit le facteur déclenchant [88, 103]. Des expérimentations animales avec l'infection par le parasite *Schistosoma mansoni* montrent le rôle prédominant de l'IL13

au cours de la fibrose hépatique liée à la présence chronique des œufs de parasites [116]. Chez la souris, le transfert de lymphocytes T avec un profil Th1 confère un effet protecteur lors de la stimulation par les antigènes de mycobactérie, alors que le transfert des lymphocytes Th2 entraîne une réponse inflammatoire granulomateuse et fibrosante au niveau du tissu pulmonaire [117]. Les souris présentant une réponse T helper orientée vers Th2, par déficit du facteur T-bet un facteur de transcription spécifique pour Th1, développent une fibrose cutanée exagérée en réponse à la bléomycine, médicament anticancéreux inducteur de fibrose [118]. Ces données montrent l'importance du rôle du profil cytokinique Th2 dans les mécanismes de la fibrose.

Chez les patients atteints de ScS, les données de la littérature attestent aussi une orientation du profil cytokinique en faveur de Th2. En effet, l'étude du profil d'expression par micro-array des lymphocytes circulants des patients atteint de ScS - par rapport aux patients atteints de lupus et à des volontaires sains - montre une augmentation de l'expression des gènes ILR2B et GATA3, qui orientent le profil des cytokines vers Th2 [119]. La production des cytokines Th2 est retrouvée au niveau de la peau [120], mais aussi dans les liquides de LBA [107] des patients atteints de ScS.

Pendant la phase inflammatoire précoce, il existe une augmentation d'IL-1 α , TNF- α , MIP-1 α , IL-8, RANTES et thrombine dans le liquide de LBA des patients atteints de ScS. Les cytokines profibrosantes telles que le PDGF et le TGF- β sont augmentées au cours de la phase chronique de la maladie [121]. Il existe également une augmentation de la concentration d'IL-4, IL-6, IL-8 et CCL2 (MCP-1) dans le liquide du LBA des patients ayant une ScS avec PID. Cette augmentation est significativement associée à la sévérité de la fibrose pulmonaire évaluée par la TDM-HR (pour la MCP-1) ou les EFR (pour IL-4, IL-8 et MCP-1) [60].

En revanche, le dosage plasmatique et/ou sérique des cytokines des patients atteints de ScS donne des résultats contradictoires. La plupart des études ont trouvé une production élevée des cytokines Th2 comme IL-4, IL-13, IL-6, IL-10 et MCP-1 [122-126] alors que d'autres ont mis en évidence une augmentation des cytokines Th1 comme IFN- γ , TNF- α , IL-1 α , IL-2, IL-12 et CXCL10 [127-129]. Les effets profibrosants des principales cytokines impliquées dans la ScS sont brièvement présentés dans le tableau I.

Médiateurs	Rôle dans la fibrogenèse
TGF-β	Production de la matrice extracellulaire, prolifération et différentiation des fibroblastes
CTGF	Régulation de la prolifération et de la migration des fibroblaste
PDGF	Induction de l'expression des récepteurs du TGF- β , recrutement des cellules souches et des fibroblastes
FGF	Régulation de la croissance des fibroblastes
ET-1	Régulation de la production et de la contraction de la matrice extracellulaire
IL-1	Médiateur inflammatoire
IL-4	Régulation de la production des collagènes
IL-6	Régulation de l'expression d' α -SMA dans les myofibroblastes
IL-10	Médiateur anti-inflammatoire, prolifération de lymphocytes B
IL-12	Régulation de la production des collagènes
IL-13	Induction de l'expression du TGF-β
IL-17	Prolifération des fibroblastes
MCP-1	Médiateur inflammatoire et régulation de la production des collagènes
MCP-3	Régulation de la production des collagènes
TNF-α	Recrutement des lymphocytes, effets pro-inflammatoire et anti-fibrosant

Tableau I : Cytokines impliquées dans l'induction de la fibrose dans la ScS [130,131]

II.2.2.3 Lymphocytes B

La présence des auto-anticorps est non seulement utile au diagnostic clinique de la ScS, elle est également le témoin de l'activation des lymphocytes B au cours de la ScS. Les anticorps anti-centromères et les anticorps dirigés contre la topo-isomérase I permettent d'orienter le diagnostic vers une forme limitée ou diffuse de la maladie. En dehors de leur intérêt diagnostique, ces anticorps ne présentent pas de caractère pathogénique direct et leurs concentrations ne sont corrélées ni à la sévérité ni à l'activité de la maladie [132]. Les rôles physiopathologiques de certains auto-anticorps sont aujourd'hui mieux compris bien qu'il subsiste de nombreuses interrogations quant à leurs significations pronostiques [133].

Les anto-anticorps anti-récepteur du Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) sont présents dans le sérum des trois quarts de patients atteints de ScS. L'effet pathogène de ces autoanticorps s'explique par l'activation des cellules endothéliales et le stress oxydatif qui en résulte. Les auto-anticorps anti-PDGFR sont aussi capables d'induire la transformation phénotypique des fibroblastes en myofibroblastes et la production de collagène de type I par ces derniers [134].

Malgré l'absence de déterminants antigéniques précis, les auto-anticorps anti-cellules endothéliales (AECA) et les auto-anticorps anti-fibroblastes (AFA) semblent jouer un rôle dans la physiopathologie de la ScS. Les AECA induisent l'apoptose des précurseurs endothéliaux venant de la moelle osseuse. Ce phénomène est responsable à la fois de la dysfonction endothéliale, de l'inflammation et de l'activation immunitaire dans la ScS [135, 136]. Les AFA activent les fibroblastes pulmonaires des patients atteints de ScS, comme le montre la surexpression d'ICAM-1, qui favorise la communication intercellulaire entre les fibroblastes activés et les monocytes. Les fibroblastes activés par les AFA augmentent la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires comme IL-1 α , IL-1 β et IL-6 et sont sujets au mécanisme autocrine via IL-1 et son récepteur IL-1Ra [137].

D'autres arguments en faveur de l'implication des lymphocytes B dans la physiopathologie de la fibrose viennent de l'expérimentation menée chez la souris Tight-skin 1 (Tsk-1), un modèle animal génétique (mutation du gène de la Fibrillin-1) de ScS. Cette souris Tsk présente une fibrose cutanée progressive qui peut diminuer si la déplétion en lymphocytes a lieu précocement (pendant les 3 premiers jours de vie de la souris). En revanche, on n'observe aucun effet sur la fibrose cutanée en cas de déplétion lymphocytaire plus tardive. Ces données montrent l'implication des lymphocytes B dans la phase initiale du processus de la fibrose qui évolue par la suite pour son propre compte indépendamment des lymphocytes B [138].

Les arguments *in vivo* en faveur de l'implication des lymphocytes B sont apportés par l'étude de Matsushita et collaborateurs, montrant que les concentrations sériques du facteur activateur des lymphocytes B (B cell-activating factor : BAF) sont augmentés chez les sujets sclérodermiques par rapport aux volontaires sains. Le suivi longitudinal montre qu'une diminution de la concentration sérique de BAF s'accompagne d'une amélioration de la fibrose cutanée. A l'inverse, une augmentation de la concentration sérique de BAF s'accompagne d'une aggravation de la fibrose cutanée. Cette même équipe a montré que les lymphocytes B, stimulés *in vitro* par le BAF, sont capables de produire de l'IL6 qui active et stimule les fibroblastes cutanés [139].

II.3 Activation des fibroblastes

II.3.1 Caractéristiques des fibroblastes dans la ScS

Les fibroblastes isolés des lésions cutanées des patients atteints de ScS (fibroblastes ScS) ont un phénotype constitutivement activé de type myofibroblaste, caractérisé par l'expression de l' α -SMA et par la production excessive de collagènes et d'autres macromolécules de la MEC. Cette caractéristique hyperactive persiste in vitro après plusieurs passages de subculture [140]. Plusieurs études ont montré le rôle important de la voie de TGF- β dans l'augmentation de la production de collagènes par les fibroblastes ScS [141-143]. La production exagérée de collagènes est significativement corrélée à l'augmentation de l'expression des récepteurs du TGF-\u03b3 (TGF-\u03b3RI et TGF-\u03b3RII), même si la concentration de TGF-β n'est pas élevée dans les surnageants de culture de fibroblastes [143]. Le TGF-β à faibles concentrations induit l'expression des récepteurs a du PDGF (PDGF-Ra) et la costimulation par le TGF-B et le PDGF-AA entraîne de manière sélective l'augmentation de la prolifération cellulaire des fibroblastes ScS en comparaison avec d'autres types de fibroblastes [142]. Les fibroblastes produisent eux-mêmes le TGF-β qui les maintient activés, formant une autorégulation positive et suggérant un mécanisme autocrine dans l'activation des fibroblastes. L'inhibition de cette voie autocrine peut constituer une éventuelle voie thérapeutique de la fibrose pulmonaire dans la ScS [144, 145].

En dehors de la production exagérée de collagènes, les fibroblastes contribuent à la persistance de l'inflammation locale par un effet chimiotactique via la sécrétion de la MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1), favorisant la migration des monocytes à travers la barrière des cellules endothéliales vasculaires et augmentant l'infiltration inflammatoire des tissus. Cet effet est indépendant de l'activation des cellules endothéliales car les surnageants de culture de fibroblastes ScS n'induisent pas l'expression des molécules d'adhésion vasculaires y compris la VCAM-1, l'ICAM-1 et la E-selectin [146, 147].

Un défaut d'apoptose est également impliqué dans l'accumulation des myofibroblastes. En effet, les fibroblastes isolés des patients atteints de ScS sont plus résistants à l'apoptose induite par le système Fas/Fas-L par rapport aux fibroblastes normaux. Cette résistance à l'apoptose peut être liée à l'exposition chronique au TGF-β [148].

II.3.2 Origine des fibroblastes

Les myofibroblastes sont des fibroblastes atypiques qui présentent un phénotype activé incontrôlé en exprimant l' α -SMA. Dans les années 70s, les myofibroblastes sont considérés comme ayant uniquement une origine locale, provenant des fibroblastes résidents de l'organe atteint [140]. Aujourd'hui, l'on pense que ces myofibroblastes ont une origine multiple avec différents précurseurs, y compris les péricytes des parois vasculaires, les fibroblastes adventitiels, les précurseurs fibroblastiques circulants d'origine médullaire, connus sous le nom de fibrocytes, les cellules épithéliales et les cellules endothéliales [88, 149-152].

L'expression de l'extra-module A de la fibronectine (ED-A FN) et les forces biomécaniques sont nécessaires pour la transdifférenciation des fibroblastes en myofibroblastes induite par le TGF- β . Abraham et collaborateurs ont montré que les myofibroblastes et les péricytes vasculaires expriment ED-A FN et Thy-1 dans la peau des patients atteints de ScS diffuse mais pas dans la peau des sujets sains. L'expression préférentielle du marqueur de prolifération cellulaire PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) par les péricytes et les myofibroblastes est un bon argument en faveur de la transition entre ces deux types de cellules et du lien existant entre l'atteinte vasculaire et la phase fibro-proliférative précoce chez les patients atteints de ScS [150].

Les fibrocytes, un précurseur mésenchymateux provenant de la moelle osseuse, peuvent migrer vers les tissus atteints selon le gradient de chimiokines. L'expression du récepteur CXCR4 et de son ligand CXCL12, une chimiokine connue pour son rôle dans la régulation de la circulation des cellules progénitrices, est élevée dans le derme et l'épiderme des malades atteints de ScS [153]. L'utilisation d'un anticorps neutralisant CXCL12 permet de prévenir la fibrose pulmonaire expérimentale induite par la bléomycine [154].

Les cellules épithéliales et endothéliales contribuent à la fibrose par la transdifférenciation en myofibroblastes via la transition épithéliale mésenchymateuse [155] et la transition endothéliale mésenchymateuse [152], induites par le TGF- β .

II.3.3 Rôles des médiateurs cellulaires dans les modifications phénotypiques des fibroblastes dans la ScS

Plusieurs cytokines, chimiokines et facteurs de croissance contribuent à l'activation des fibroblastes, et à la formation puis l'accumulation des myofibroblastes dans les foyers de fibrose.

<u>II.3.3.1 Transforming growth factor (TGF- β), Connective Tissue Growth Factor</u> (CTGF) et Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)

Le TGF- β est à la fois un facteur de croissance et une cytokine pléiotrope appartenant à la superfamille du même nom qui regroupe les Activins et les Bone Morphogenetic Protein (BMP). Synthétisé par plusieurs types de cellules, dont les fibroblastes et les cellules endothéliales, le TGF- β se fixe sur le récepteur TGF β -R2 et provoque une hétérodimérisation avec l'autre type de récepteur, le TGF β R1, qui possède une activité enzymatique de type sérine/thréonine kinase permettant la phosphorylation des protéines de transduction de la voie Smad. Les protéines Smad 2 et Smad 3 phosphorylées se fixent sur Smad 4 et le complexe des protéines Smad ainsi formé est capable d'effectuer une translocation nucléaire relayant l'information du signal de la membrane cellulaire vers le noyau. Cette translocation nucléaire est inhibée par Smad 7 qui inhibe la phosphorylation des Smads 2 et 3. L'adhésion du complexe Smad avec les promoteurs des gènes cibles provoque une transcription et une augmentation de l'expression de ces gènes [156]. Le TGF- β est nécessaire à la cicatrisation car celle-ci est anormalement retardée chez les souris dont le gène TGF- β est invalidé.

Chez les patients atteints de ScS, les fibroblastes dermiques présentent une forte capacité de production du Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) [157] et du Connective Tissue Growth Factor (CTGF) [158]. Il existe une sécrétion paracrine et autocrine de TGF- β et CTGF [158] et une augmentation de l'expression des récepteurs de TGF- β par les fibroblastes de patients atteints de ScS [159]. Il existe une accumulation nucléaire anormale et spontanée de molécules Smad 3 phosphorylées en l'absence de stimulation par le TGF- β [160], ainsi qu'un défaut d'expression de Smad 7 dans les fibroblastes dermiques issus des patients atteints de ScS par rapport aux fibroblastes normaux [161]. Ce défaut relatif en Smad 7 existe également dans un modèle murin de fibrose cutanée et pulmonaire induite par des injections répétées de bléomycine [162].

Les fibroblastes dermiques des patients atteints de ScS présentent une activation aberrante de la voie PDGF-A/PDGF-R α . La production de PDGF-A est augmentée par l'IL-1 α endogène alors que l'expression de PDGF-R α est stimulée en réponse au TGF- β et/ou à la thrombine [142]. De plus, le PDGF peut induire l'expression des récepteurs du TGF- β dans les fibroblastes dermiques, suggérant une activation réciproque de ces deux voies de signalisation TGF- β et PDGF à l'origine de la persistance des mécanismes de fibrose dans la ScS [163].

II.3.3.2 Interleukines et chimiokines

D'autres cytokines de type Th2 comme l'IL4 et l'IL13 sont également capables d'induire les modifications phénotypiques des fibroblastes. L'IL13 est une cytokine pléiotrope, capable de stimuler la prolifération des fibroblastes et la production des collagènes [164]. Les effets profibrosants d'IL13 sont liés à l'activation irréversible des fibroblastes induite directement ou indirectement par le TGF- β [165].

Les études récentes ont montré que les chimiokines et leurs récepteurs peuvent jouer un rôle important dans l'inflammation et la fibrose de la ScS [166]. La chimiokine ligand 2 (CCL2), aussi appelée Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP1), est sécrété par les cellules endothéliales, les macrophages, les fibroblastes, etc. Elle exerce son effet chimiotactique sur les monocytes et les lymphocytes. L'expression génique de CCL2 est augmentée dans la fibrose chez l'homme et dans divers modèles animaux. Le CCL2 stimule l'expression génique de collagène de type I dans les fibroblastes de rats par l'intermédiaire de l'induction génique endogène de TGF-ß [167]. CCL2 induit également l'expression des métallo-protéinases de la matrice (MMP-1 et MMP-2) et l'inhibiteur tissulaire de MMP-1 (TIMP-1) dans les fibroblastes dermiques in vitro [168]. Il existe une augmentation de l'expression de CCL2 et son principal récepteur CCR2 dans les vaisseaux, les infiltrats inflammatoires péri-vasculaires et les fibroblastes des patients atteints de ScS [169, 170]. En particulier, les fibroblastes ScS qui expriment le CCR2 durant la phase précoce de ScS présentent un phénotype activé profibrosant avec une surexpression de α-SMA, CTGF et CCL2 [171]. Ces résultats suggèrent une activation autocrine des signaux profibrosants via la voie de CCL2/CCR2 dans la phase fibro-proliférative de la ScS.

<u>II.3.4 Stress oxydatif</u>

Le métabolisme cellulaire génère de nombreux métabolites énergétiques utiles mais également de nombreuses molécules néfastes via le « stress oxydatif ». Ces molécules, nocives pour la cellule, sont neutralisées par plusieurs systèmes antioxydants qui les empêchent de provoquer des lésions cellulaires. Le stress oxydatif est dû aux effets cytotoxiques des molécules capables d'induire une réaction d'oxydation. La famille de ces molécules, nombreuses, est constituée d'espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO). Les ERO sont représentées par les molécules radicalaires, les radicaux libres, (NO°, O2°, OH°) ou non-radicalaires (H₂O₂, ONOO⁻). Il existe dans la plupart des cellules une production constitutive (physiologique et en faible quantité) des ERO par la chaîne respiratoire mitochondriale. Ces molécules interviennent dans l'apoptose, la prolifération cellulaire et le remodelage tissulaire. Les ERO sont neutralisées par plusieurs mécanismes antioxydants dont les enzymes superoxyde dismutase (SOD), catalase, glutathion peroxydase et des substances non-enzymatiques comme l'α-tocophérol, la β-carotène, l'acide ascorbique et le glutathion [172]. Un déséquilibre de la balance stress oxydatif/enzymes antioxydants en faveur du premier survient lorsque la production des ERO est trop élevée ou les systèmes antioxydants sont insuffisants [173].

Les ERO peuvent stimuler l'expression des cytokines pro-inflammatoires et profibrosantes comme le PDGF et le TGF- β . Les fibroblastes ScS produisent de manière constitutive, et en l'absence de stimulus externes, une quantité plus importante d'ERO comme l'anion superoxyde (O_2^-) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) via l'activation du complexe NADPH oxydase membranaire. Cette production intracellulaire excessive d'ERO est responsable de la prolifération des fibroblastes et l'expression élevée de collagène de type I dans la ScS [174]. Les ERO dont la production est induite par le PDGF peuvent, même à de faibles concentrations, stimuler la prolifération et l'activation des fibroblastes [175, 176]. Un traitement par les antioxydants réduit l'expression des ARN messagers du CTGF et la production de collagènes et d'autres protéines de la MEC [177, 178].

Des injections sous-cutanées quotidiennes d'acide hypochloreux (HOCl), un puissant agent oxydant, induisent la formation d'une fibrose locale et systémique chez la souris et reproduisent les principales caractéristiques de la ScS comprenant l'inflammation, l'autoimmunité, la vasculopathie ainsi que la fibrose cutanée et pulmonaire [179, 180]. Ce modèle 35
murin, qui a permis d'explorer différentes voies de signalisation impliquées dans la physiopathologie de cette maladie [181, 182], nous a également servi de moyen d'étude pour explorer in vivo et in vitro l'inflammation alvéolaire dans le troisième volet de nos travaux présentés dans cette Thèse.

III Monoxyde d'azote (NO)

III.1 Propriétés physico-chimiques du NO

Avant sa mise en évidence comme l'un des principaux médiateurs paracrines endogènes, le monoxyde d'azote (NO) fut avant tout considéré comme un gaz nocif produit par l'activité industrielle, la fumée de cigarette et les gaz d'échappement des moteurs des voitures. En partie responsable de la destruction de la couche d'ozone, le NO est également utilisé comme un indice de l'état de la pollution atmosphérique. Mais le NO est avant tout un médiateur inter- et intracellulaire contrôlant de nombreuses fonctions physiologiques à l'échelle moléculaire, cellulaire et de l'organisme entier. Ainsi, depuis la description princeps du facteur relaxant dérivé de l'endothélium (EDRF, *endothelium-derived relaxing factor*) faite par Furchgott et Zawadzki en 1980 [183], de nombreux effets physiologiques du NO ont été découverts et son implication physiopathologique dans diverses maladies humaines est maintenant unanimement reconnue.

Le NO est avant tout un gaz, qui possède à la fois des propriétés chimiques similaires à celles des radicaux libres (oxygénés ou azotés) et des caractéristiques d'un médiateur cellulaire assurant la communication entre deux cellules voisines (communication paracrine intercellulaire) ou à l'intérieur d'une même cellule (communication intracellulaire). Au niveau des appareils circulatoire et respiratoire, le NO joue un rôle essentiel dans la régulation des fonctions physiologiques de ces organes, allant de la modulation du tonus vasculaire et bronchique jusqu'à servir de support moléculaire à l'immunité non spécifique et la transmission synaptique du système non-adrénergique non-cholinergique.

Le NO est un gaz incolore et inodore. Il est peu stable car se combinant facilement avec des radicaux libres, notamment l'anion superoxyde (O_2^-) pour former l'anion peroxynitrite (ONOO⁻). L'association d'un atome d'azote avec un atome d'oxygène laisse un électron non apparié, cet électron isolé confère au NO les propriétés d'un radical très réactif, qui franchit les membranes biologiques en réagissant rapidement avec d'autres molécules. La demi-vie du NO est de 5 à 6 millisecondes. En raison de sa forte capacité de diffusion, le NO peut non seulement traverser tous les compartiments cellulaires, mais il peut aussi créer un champ d'action autour des cellules qui le produisent [8].

III.2 Synthèse endogène du NO

Le NO est synthétisé à partir de l'un des deux atomes d'azote terminal chimiquement équivalents du groupement guanidine de la L-arginine, d'une part, et de l'oxygène moléculaire (O_2) , d'autre part (25) *(Figure 1)*. L'autre produit de synthèse, formé de manière stœchiométrique avec le NO, est la L-citrulline, qui dérive de la L-arginine, d'abord hydroxylée en N^G-hydroxy-L-arginine. La réaction de biosynthèse du NO et de la L-citrulline à partir de la L-arginine et de l'oxygène est sous le contrôle d'une famille d'enzymes, les NO synthases (NOS), dont il existe au moins trois isoformes. Ces trois isoformes – codées par trois gènes distincts localisés sur les chromosomes 7, 12 et 17 – diffèrent entre elles par leurs localisations cellulaires, leurs caractéristiques biochimiques et leurs fonctions enzymatiques *(Tableau II)*.

lsoformes	Neuronale (NOS-1)	Inductible (NOS-2)	Endothéliale (NOS-3)
Activité	Constitutive	Inductible	Constitutive
Localisation chromosomique du gène	12q24.2	17cen-q12	7q35-36
Masse moléculaire de la protéine	160 kDa	130 kDa	140 kDa
Cellules de l'appareil respiratoire	Neurones, aux alentours des cellules musculaires lisses bronchiques et bronchiolaires	Macrophages, pneumocytes de type II, fibroblastes, Cellules musculaires lisses, chondrocytes, mastocytes, neutrophiles, cellules endothéliales	Cellules endothéliales, cellules épithéliales bronchiques, pneumocytes de type II
Fonction du NO	Neurotransmission	Bactéricidie Tumoricidie	Vasodilatation
Cofacteurs Ca++/Calmoduline	Dépendante	Indépendante	Dépendante
Effecteurs membranaires	Acides aminés neuroexcitateurs	LPS, IL-1β, TNFα, etc	Acétylcholine, bradykinine, etc

Tableau II : Les trois principales isoformes des NO synthases.

Les isoformes présentes dans les cellules endothéliales (NOSe ou NOS-3), d'une part, et les cellules nerveuses (NOSn ou NOS-1), d'autre part, appartiennent à la famille des NOS constitutives, c'est-à-dire celles dont l'expression – normalement présente à l'état physiologique – permet la synthèse du NO respectivement en tant que médiateur paracrine de la relaxation du muscle lisse vasculaire et en tant que neurotransmetteur. A l'inverse, l'isoforme macrophagique appartient à la famille des NOS inductibles (NOSi), c'est-à-dire celles dont l'expression, normalement absente à l'état physiologique, ne se manifeste que dans des états pathologiques, comme l'inflammation et/ou les infections. La NOS-3 est activée principalement par les forces de cisaillement ou par la stimulation des récepteurs membranaires par des agonistes entraînant une augmentation de la concentration de calcium à l'intérieur de la cellule endothéliale ou l'activation de la voie Akt/PKB indépendante du calcium.

Bien que normalement présente dans la cellule (endothéliale ou neuronale), l'isoforme constitutive de la NOS n'est pas active en l'absence d'une augmentation transitoire du calcium intracellulaire et de l'activation de la calmoduline qui en résulte. L'activité des NOS constitutives se traduit par la production d'une faible quantité de NO pendant une période brève. A l'opposé, l'induction du gène codant la NOSi donne lieu à la synthèse *de novo* de cette protéine par activation transcriptionnelle. La NOSi, une fois produite par la traduction de l'ARN messager en protéine, devient continuellement active du fait de sa liaison quasi irréversible à la calmoduline. Ceci explique la relative indépendance de cette isoforme par rapport au calcium intracellulaire [8].

En dehors du contrôle exercé par les NOS, la production du NO dépend également des substrats de la réaction chimique qui en découle comme la L-arginine et la tétrahydrobioptérine (BH4). Les analogues de la L-arginine comme le N^G-monométhyl-L-arginine (L-NMMA) et le N^G-nitro-L-arginine-méthyl-ester (L-NAME) sont des inhibiteurs non sélectifs des NOS alors que l'aminoguanidine et les glucocorticoïdes sont considérées comme des inhibiteurs spécifiques de la NOS inductible. L'arginase est une enzyme métabolique du cycle de l'urée qui catalyse l'hydrolyse de la L-arginine en L-ornithine, diminuant la biodisponibilité de ce substrat des NOS et réduisant la production du NO [184]. De plus, le déficit en L-arginine peut inhiber l'expression protéique de la NOS inductible [185]. La diméthylarginine diméthylaminohydrolase (DDAH) est une enzyme catabolique du

diméthylarginine asymétrique (ADMA), un analogue de la L-arginine qui inhibe la synthèse de NO en entrant en compétition avec la L-arginine pour le site actif des NOS. Il existe une augmentation de l'expression de la DDAH dans la fibrose pulmonaire alors que l'inhibition sélective de la DDAH, en réduisant la production endogène de NO, atténue augmente la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine intra-trachéale chez la souris [186]. L'anomalie quantitative ou qualitative de la BH₄ peut conduire au découplage de la NOS endothéliale, responsable de la formation excessive d'anions superoxydes (O_2^-). Ce dernier réagit immédiatement avec le NO pour former l'anion peroxynitrite (ONOO⁻) qui oxyde de nouveau la BH₄, aggravant ainsi la dysfonction endothéliale [187].



Figure 2. Biosynthèse du NO

Le NO est synthétisé à partir de la L-arginine et de l'oxygène moléculaire (O_2) sous l'action catalytique de la NO synthase (NOS), dont l'activité enzymatique dépend de nombreux cofacteurs : NADPH, flavine adénine dinucléotide (FAD), flavine mononucléotide (FMN), tétrahydrobioptérine (BH₄), et calmoduline (CaM).

III.3 Mécanismes d'action du NO

Une fois synthétisé, le NO diffuse rapidement vers l'extérieur de la cellule qui le synthétise et agit sur les cellules avoisinantes selon un mode paracrine. L'action du NO est

essentiellement dépendante du GMP cyclique (GMPc) mais d'autres mécanismes indépendants du GMPc sont également décrits.

III.3.1 Activité du NO dépendante du GMP cyclique

Il s'agit du mécanisme de relaxation classique des cellules musculaires lisses des vaisseaux. Dans la cellule du muscle lisse vasculaire sous jacente à la cellule endothéliale, le NO agit en se liant au fer de l'hème de la guanylate cyclase soluble qui synthétise à son tour un second messager nucléotidique, le guanosine monophosphate cyclique (GMPc), à partir de GTP. Le GMPc active la protéine kinase G (PKG), dont la phosphorylation des diverses molécules cibles contrôlant l'interaction actine-myosine aboutit à la relaxation in vitro des fibres musculaires lisses et à la vasodilatation in vivo. En revanche, la relaxation des cellules musculaires lisses des voies aériennes en réponse au NO peut être indépendante du GMPc [188].

III.3.2 Activité du NO indépendante du GMP cyclique

L'activation de la NOS-2 par les cytokines pro-inflammatoires produit une grande quantité de NO, ce qui rend compte de l'activité anti-infectieuse des macrophages [189]. Ainsi, le NO et ses métabolites sont capables d'inhiber la duplication de l'ADN [190], la réplication des particules virales par la réaction de S-nitrosylation des protéases [191] et la prolifération des mycobactéries [192].

Le NO joue un rôle important dans la régulation de la prolifération cellulaire en induisant un arrêt du cycle cellulaire. L'effet inhibiteur du NO est dépendante la concentration intracellulaire du GMPc, qui interfère avec l'expression et l'activité de diverses protéines du cytosquelette, ainsi que les protéines contrôlant le cycle cellulaire comme les cyclines et les kinases dépendantes de cyclines [193, 194]. De plus, le NO peut également réguler la prolifération cellulaire par un mécanisme indépendant du GMPc, via l'inhibition de l'activité des récepteurs tyrosine kinase comme les EGF-R (epidermal growth factor receptor) exprimés à la membrane cellulaire des fibroblastes [195] et des cellules tumorales A431 [196]. A l'inverse, de faibles concentrations de NO semblent pouvoir accélérer la prolifération cellulaire *in vitro* des fibroblastes murins [197] et des cellules endothéliales humaines [198].

III.4 Voies métaboliques du NO

En raison du nombre impair de ses électrons, le NO réagit rapidement avec diverses molécules des milieux biologiques, comme l'oxyhémoglobine des hématies, l'oxygène libre, les radicaux libres dérivés de l'oxygène, le fer contenu dans les noyaux héminiques (comme l'hémoglobine, la myoglobine, la guanylate cyclase) ou d'autres métaux de transition contenus dans des noyaux non héminiques, les composés comportant un radical thiol, les disulfides. Le NO est transformé en produits d'oxydation stables, les NOx comprenant les nitrites (NO₂⁻) et nitrates (NO₃⁻). Le NO peut aussi réagir avec l'anion superoxyde (O₂⁻) pour donner la peroxynitrite (ONOO⁻), une molécule hautement cytotoxique.



Figure 3 : Réactions biologiques du monoxyde d'azote (NO).

Dans la circulation sanguine, au contact des hématies, le NO et les nitrites réagissent avec le fer du groupe héminique de l'oxyhémoglobine, avec une réaction d'oxydation transformant le fer ferrique en fer ferreux, conduisant à la formation de méthémoglobine et d'un ion nitrate. Dans le plasma, le NO réagit avec l'oxygène pour donner des nitrites puis des nitrates. L'affinité de l'hémoglobine pour le NO est 3 000 fois supérieure à celle de l'oxygène. De ce fait, la réaction très rapide du NO avec l'oxyhémoglobine entraîne la formation d'une grande quantité de nitrates, ce qui explique pourquoi la concentration de nitrates est plus élevée que celle des nitrites dans les hématies. Cependant, une partie du NO circulant dans les vaisseaux sanguins n'est pas captée par l'hémoglobine, du fait de la « barrière de diffusion » représentée par la membrane érythrocytaire, la couche immobile qui entoure les hématies et l'existence d'une zone de plasma dépourvue d'hématies le long de la surface de l'endothélium vasculaire. Dans le plasma, le NO réagit avec l'oxygène pour former des nitrites, ce qui explique la prépondérance des nitrites par rapport aux nitrates dans le plasma. A l'état gazeux, le NO réagit avec l'oxygène pour former un gaz toxique, le dioxyde d'azote (NO₂) (Figure 3) [8].

III.5 Rôles biologiques du NO

Dans les conditions physiologiques, le NO est produit de manière prédominante par les cellules endothéliales et assure le contrôle du tonus vasculaire de base en assurant la vasodilatation et en inhibant la prolifération des cellules musculaires lisses. Le NO intervient également dans de nombreuses autres fonctions cellulaires. La NOS-1 est impliquée dans la relaxation des CML bronchiques. Chez le cobaye, la bronchoconstriction induite par la métacholine est atténuée par le NO inhalé (entre 5 et 300 ppm) [199]. Chez les malades asthmatiques, l'inhalation de 80 ppm de NO entraîne une légère bronchodilatation mais n'a pas d'effets significatifs chez les sujets sains ou les malades atteints de bronchopneumopathie chronique obstructive [200]. La NOS-3 est présente dans différents types de cellules pulmonaires, dont les cellules endothéliales vasculaires, les cellules épithéliales bronchiques [201] et les pneumocytes de type II [202]. La NOS-3 est impliquée dans les mouvements ciliaires [203]. La NOS-2 est aussi présente dans les cellules épithéliales bronchiques et alvéolaires. L'augmentation l'activité de la NOS-2 au cours de certaines maladies inflammatoires chroniques comme l'asthme contribue à une production élevée de NO dans les voies aériennes et sert de base physiologique à l'utilisation de la mesure du NO dans l'air expiré dans le diagnostic et le suivi des maladies inflammatoires bronchiques [204].

III.5.1 Le NO en tant que vasodilatateur

L'effet vasodilatateur du NO est lié aux propriétés biologiques d'un second messager nucléotidique cyclique, le GMPc, synthétisé à partir du GTP par une famille d'enzymes, les guanylyl cyclases (GC). On distingue deux types de GC en fonction de leurs localisations cellulaires : les GC membranaires et les GC ou solubles (GCs). Les GC membranaires sont les récepteurs membranaires des hormones natriurétiques (ANP, BNP) ou des peptides apparentés (guanyline, uroguanyline, toxines thermostables d'E. Coli). Les GC solubles (GCs) sont des enzymes intracytosoliques assimilables à des récepteurs intracellulaires du NO. Il existe différents isoformes de la GCs dont le plus fréquent étant la forme $\alpha 1$ - $\beta 1$. La structure moléculaire de la GCs comprend 3 domaines : un domaine catalytique, un domaine régulateur dans lequel se trouve le groupement héminique, conférant ainsi à la GCs le statut d'hémoprotéine (au même titre que la NOS et d'autres hémoprotéines bien connues, comme l'hémoglobine) et un domaine de dimérisation [205].

Chez le fœtus, cette enzyme est fortement exprimée par les cellules musculaires lisses des vaisseaux pulmonaires alors que son expression dans la cellule endothéliale vasculaire pulmonaire est quasi inexistante. La tendance inverse (augmentation de l'expression endothéliale et diminution de l'expression musculaire de la GCs) s'observe dès la période néonatale et se maintient jusqu'à l'âge adulte [206]. Le NO se fixe directement sur l'hème (contenu dans la région N-terminale) de la GCs au niveau de l'histidine 105 de la sous-unité β , cassant le lien fer-histidine et permettant un changement de conformation de la GCs et l'activation de son effet catalytique. Cette stimulation est dite dépendante du NO [207].

La GCs peut également être stimulée par d'autres molécules que le NO endogène, notamment les dérivés nitrés (encore appelés donneurs du NO exogène), ou par des agonistes de synthèse dont la structure biochimique est très différente du NO, notamment l'YC-1 et le BAY 41-2272. A la différence du NO (endogène ou exogène), ces molécules ne se lient pas à l'histidine 105 de la sous-unité β , mais se fixent sur les cystéines 238 et 243 de la sous-unité a1 [208]. L'effet activateur de la GCs dépendant du NO peut s'additionner à celui des molécules autres que le NO (comme l'YC-1). Ainsi la stimulation des cellules par l'YC-1 associée à un donneur de NO augmente de façon importante la synthèse du GMPc à partir du GTP [207, 209]. L'YC-1 aurait même un rôle inhibiteur de la phosphodiestérase-5 (PDE-5), enzyme transformant le GMPc actif en 5'-GMP inactif, contribuant ainsi par un double mécanisme à l'accumulation intracellulaire du GMPc [210].

Une fois activée, la GCs catalyse la synthèse du GMPc à partir du GTP. Le GMPc relâche le muscle lisse vasculaire et inhibe l'agrégation plaquettaire. L'augmentation du GMPc dans le muscle lisse vasculaire active une série de protéines kinases dépendantes de la protéine G (PKG). Par des réactions de phosphorylations électives, les PKG inhibent la MLCK et/ou activent la MLCP, diminuant ainsi l'interaction entre l'actine et la myosine, ce

qui aboutit à la relaxation vasculaire. Les PKG activent également l'ouverture des canaux potassiques, permettant la sortie des ions potassium. L'hyperpolarisation membranaire qui en résulte réduit la probabilité d'ouverture des canaux calciques dépendant du voltage (VOC). En diminuant l'entrée de calcium dans la cellule vasculaire, le GMPc et son effecteur, la PKG, favorisent la survenue d'une dilatation artérielle et veineuse [211]. Plusieurs mécanismes contrôlent et modifient la concentration intracellulaire du GMPc. La phosphodiestérase de type 5 (PDE-5), en hydrolysant le GMPc en 5'-GMP inactif, est l'objet d'un intérêt croissant pour le traitement de l'HTAP [212, 213].



Figure 4. Effet relaxant du NO sur le muscle lisse vasculaire

L'acide aminé L-arginine est converti par la NOSe (NOS-3) en NO et en L-citrulline. Le NO diffuse de la cellule endothéliale vers la cellule musculaire lisse sous-jacente où il active un effecteur enzymatique, la guanylyl cyclase soluble (GCs). La GCs convertit le GTP en un second messager cyclique, le GMPc, qui active à son tour la protéine kinase G (PKG). Cette dernière diminue l'interaction actine-myosine en activant la protéine phosphatase de la chaîne légère de la myosine (MLCP) et en favorisant l'ouverture des canaux potassiques (K^+).

III.5.2 Le NO en tant que biomarqueur de l'inflammation

Depuis la première étude de Gustafsson et collaborateurs montrant en 1991 la possibilité de quantifier le NO en tant que molécule gazeuse synthétisée par l'appareil respiratoire [214], la mesure de NO dans l'air expiré est aujourd'hui effectuée en routine par de nombreuses équipes pour évaluer l'inflammation des voies aériennes (comme dans l'asthme) et du parenchyme pulmonaire [215].

Il existe à l'état de base une production continue de NO par les cellules pulmonaires comme attestée par la mesure de NO dans l'air expiré des sujets sains. Les trois isoformes des NOS sont présentes dans l'appareil respiratoire (Tableau 1) et peuvent contribuer à la production basale de NO. Chaque isoforme peut être exprimée par plusieurs types cellulaires et chaque type cellulaire peut exprimer une, deux, voire l'ensemble des trois isoformes de la NOS.

La NOS neuronale (NOSn ou NOS-1), exprimée dans les neurones parasympathiques post-ganglionnaires, libère de très faibles quantités de NO. Dans ce contexte, le NO joue le rôle de neuromédiateur du système non-adrénergique non-cholinergique inhibiteur (NANCi), avec un effet bronchodilatateur très localisé [216]. Cette source de NO ne semble pas contribuer de façon significative au NO détecté dans l'air expiré.

La NOS endothéliale (NOSe ou NOS-3) est exprimée par les cellules endothéliales des vaisseaux pulmonaires mais aussi par d'autres cellules pulmonaires, comme les pneumocytes de type II, les cellules épithéliales bronchiques, les cellules de Clara, les cellules musculaires lisses bronchiques [184, 201]. La contribution de la NOSe à la production massique de NO détecté dans l'air expiré n'est pas connue avec exactitude. Nous sommes, en revanche certains qu'il existe une diminution significative de la F_ENO dans l'hypertension pulmonaire, en relation avec la dysfonction endothéliale et à la diminution de l'activité et de l'expression de la NOSe qui en résulte [217].

La NOS inductible (NOSi) est exprimée de manière quasi permanente par l'épithélium bronchique [218] et la production du NO par la NOSi contribue majoritairement à la quantité de NO détectée dans l'air expiré des malades porteurs d'une affection inflammatoire bronchique [204]. La NOSi est aussi présente dans les macrophages, les pneumocytes de type II, les fibroblastes pulmonaires et les cellules musculaires lisses bronchiques [219]. En cas 46 d'inflammation, le recrutement et l'activation des cellules immunitaires comme les lymphocytes, les neutrophiles et les macrophages stimulent l'expression de la NOSi et induisent l'augmentation du NO expiré. La transcription du gène codant la NOSi dépend de l'activation des facteurs de transcription pro-inflammatoires comme le NF- κ B (Nuclear Factor κ B), le STAT-1 α (Signal transducer and activator of transcription-1 α) et l'AP-1 (Activating protein-1) [220].







Figure 5: Monoxyde d'azote produit en grande quantité par la NOS inductible en réponse aux stimulus pro-inflammatoires.

En résumé, l'augmentation de la concentration de NO mesurable dans l'air expiré est due essentiellement à l'activation de la NOSi. Cette activation est en rapport avec la présence de diverses cytokines pro-inflammatoires et reflète le degré de l'inflammation active dans les poumons.

Les progrès récents des techniques utilisées dans la mesure du NO expiré permettent non seulement de quantifier exactement la production de NO mais également de mieux préciser la source de production du NO au niveau de l'arbre trachéo-bronchique proximale mais aussi des voies aériennes distales incluant les bronchioles et l'espace alvéolaire. Nous allons brièvement décrire les différentes méthodes de mesure de NO expiré et leurs applications dans le diagnostic et le suivi des maladies respiratoires où la composante inflammatoire est prépondérante.

IV Mesure du NO dans l'air expiré

IV.1 Principes de mesure

La méthode de mesure la plus sensible pour détecter le NO dans l'air expiré utilise le principe de la chimiluminescence, qui quantifie le nombre de photons émis dans un échantillon d'air expiré. La réaction entre les molécules de NO mises en présence de l'ozone en excès produit du NO_2^* et de l' O_2 . Le retour de la molécule NO_2^* à son état stable (NO_2) entraîne l'émission d'un photon capté par l'appareil chimiluminescent. Le signal lumineux ainsi mesuré est proportionnel à la concentration de NO dans l'échantillon d'air étudié, exprimée en nombre de particules par milliard de molécules (ppb : particle(s) per billion).

 $NO + O_3 \rightarrow NO_2^* + O_2 \rightarrow NO_2 + photon$

IV.2 Modèles de mesure du NO expiré chez l'homme

IV.2.1 Mesure directe de la concentration fractionnaire de NO expiré (F_ENO)

Les premiers résultats étaient peu reproductibles à cause d'un certain nombre de paramètres non contrôlés comme la contamination du circuit respiratoire par le NO ambiant et/ou l'arrivée dans les bronches du NO provenant de la sphère ORL. Il est, de ce fait, conseillé de faire inhaler au patient une source d'air dépourvu de NO et de lui demander d'expirer contre une pression positive constante (20 cm d'eau) permettant de fermer le voile mou du palais et d'arrêtant le flux naso-sinusal [9, 221].

La concentration du NO expiré varie inversement au débit expiratoire [222], selon la formule :

$$V'_{NO} = C_E NO \times V'_E$$

(Avec V'_{NO} : débit de NO expiré en nl/minute ; C_ENO : concentration de NO mesurée dans l'air expiré en nl/L et V'_E : débit expiratoire en L/minute)

Ainsi, l'expiration à débit constant permet d'obtenir une relation linéaire entre le débit de NO (V'_{NO}) et la concentration fractionnaire de NO expiré (F_ENO). Pour pouvoir comparer les résultats entre les différentes études, les recommandations internationales préconisent de maintenir le débit expiratoire constant à 50 ml/s [9].

En appliquant ces règles, l'augmentation de la quantité de NO détectée dans l'air expiré reflète soit l'augmentation de la production bronchique, soit la production alvéolaire d'une maladie inflammatoire touchant le poumon profond [9]. En utilisant ce modèle, nous avons montré [83] avec d'autres auteurs [84, 85] que la concentration fractionnaire de NO expiré ($F_{E}NO$) est augmentée au chez les patients atteints de ScS. Paredi et collaborateurs [84] ont montré que cette augmentation est associée à une alvéolite active, définie par la présence dans le liquide de LBA d'un pourcentage de polynucléaires neutrophiles $\geq 4\%$, de polynucléaires éosinophiles $\geq 3\%$ ou de lymphocytes $\geq 14\%$. Ils ont également trouvé que la $F_{E}NO$ est inversement corrélée aux volumes pulmonaires et directement liée à la sévérité de la fibrose pulmonaire, évaluée par les scores scannographiques [84]. Cependant, cette méthode de mesure du NO expiré dite « globale » ne permet pas de différencier la production du NO d'origine bronchique du NO provenant des alvéoles dont l'augmentation pourrait être le reflet d'une alvéolite active. Le modèle à deux compartiments développé par Tsoukias et George [223] permet de compartimenter les différentes sources de NO et d'en préciser l'origine anatomique.

IV.2.2 Modèle à deux compartiments

Cette modélisation des poumons permet d'étudier les échanges du NO au niveau des bronches et du parenchyme pulmonaire. Les poumons sont représentés par une bronche de forme cylindrique rigide de diamètre constant et par une alvéole unique (Figure 6). La bronche est formée par un tissu bronchique d'épaisseur constante accolé à un système vasculaire dont le débit sanguin est également constant. L'alvéole est un sac formé par un tissu alvéolo-interstitiel extensible et compressible, permettant de chasser le contenu de l'air vers le milieu ambiant par la bronche unique. Les tissus bronchiques et alvéolaires sont tous deux capables de produire du NO. La diffusion des gaz de l'alvéole vers le compartiment sanguin s'effectue selon la loi de diffusion de Fick. Le débit sanguin des vaisseaux accolés à l'alvéole est considéré comme constant. Comme l'affinité du NO pour l'hémoglobine est très élevée, le NO diffusant de l'alvéole vers le sang se fixe sur l'hémoglobine et la concentration de NO dans le compartiment vasculaire est considérée comme négligeable par rapport à la concentration alvéolaire de NO [223].

Le principe de mesure repose sur une modélisation simplifiée du système respiratoire en deux compartiments : un compartiment parenchymateux compressible, constitué de l'espace alvéolaire et bronchiolo-alvéolaire, additionné d'un compartiment non compressible, représenté par les voies aériennes de conduction [223]. La production de NO dans l'espace alvéolaire et bronchiolaire distal, au-delà de la 18ème génération de division des bronches d'après Weibel [224], est considérée comme constante. Elle résulte d'un équilibre entre la production épithéliale et endothéliale (avec celle des cellules inflammatoires dans certaines conditions pathologiques) et la diffusion du NO vers le lit vasculaire pulmonaire (D_{NO}).



Figure 6 : Modèle à deux compartiments pulmonaires régissant les échanges gazeux du NO. Accumulation progressive du NO dans les voies aériennes de conduction : à la sortie de l'alvéole, la CNO initiale est égale à la C_ANO . Pendant le trajet dans les bronches, le NO est progressivement rajouté dans le flux expiratoire. Le débit maximal bronchique J'awNO = CawNO * DawNO.

Dans le compartiment alvéolaire, le volume de gaz contenant une concentration de NO (C_ANO) est chassé du compartiment compressible durant l'expiration et s'enrichit pendant son parcours le long des voies aériennes d'une certaine quantité de NO provenant de la paroi bronchique (J'_{NO}). Cet enrichissement progressif augmente la concentration de NO dans la lumière bronchique d'une valeur initiale qui est celle de la concentration alvéolaire jusqu'à la valeur finalement mesurée à la bouche (C_ENO , ppb). Cette valeur finale dépend de la vitesse avec laquelle le gaz a balayé les voies de conduction et du débit de NO maximal que les bronches peuvent fournir (J'_{NO} , nl/mn).

L'équation simplifiée de Tsoukias et George [223] permet de déterminer la concentration alvéolaire de NO et le débit maximal bronchique (J'_{NO}), que l'on calculera après au moins trois mesures de la C_ENO à trois débits expiratoires variant de 50 à 250 mL/s. Les mesures de NO expiré selon différent débits constants permettent de définir une relation linéaire entre le débit expiré de NO et celui de l'air expiré (Figure 7). Cette relation linéaire entre le débit d'air expiré est définie par les équations suivantes :

$$V'_{NO} = C_E NO \times V'_E = C_A NO \times V'_E + J'_{NO}$$

V'_E: débit d'air expiré

 V'_{NO} : débit expiré du NO; pour une valeur donné de débit d'air expiré comme 50 ml/min, on détermine le FE_{NO,50} décrit dans la littérature qui reflète la fraction expirée de NO à un débit expiratoire constant unique de 50 ml/s.

C_E : concentration expirée du NO

CA: concentration alvéolaire du NO

J'_{NO} : débit maximal bronchique



Figure 7 : Relation linéaire entre V'_E et V'_{NO} d'après le modèle à deux compartiments de Tsoukias et George (référence). La pente et l'ordonnée à l'origine de cette expression linéaire permet de déterminer C_ANO et **J'awNO**, respectivement.

Ce modèle à deux compartiments (2CM) a été utilisé pour la première fois par Girgis et collaborateurs chez des patients atteints de ScS. Ils ont trouvé une augmentation significative de la C_ANO chez les patients porteurs de la PID par rapport aux sujets sains. Ils ont montré également chez un petit nombre de patients atteints de ScS avec hypertension artérielle pulmonaire que les C_ANO étaient augmentées par rapport aux sujets de contrôle et comparables à celles des patients présentant une PID [11].

Utilisant le modèle 2CM, notre équipe a montré que l'augmentation de la C_ANO est associée à une alvéolite active et que la C_ANO est proportionnelle à la sévérité de la PID, attestée par une réduction de la capacité de diffusion du monoxyde de carbone [10]. Nous avons également déterminé les valeurs seuils de CANO permettant d'affirmer (10,8 ppb) ou d'écarter (3,8 ppb) une PID avec une valeur prédictive positive et une valeur prédictive négative > 95% [225]. Faisant suite à ces résultats encourageant, nous souhaitons étudier la valeur prédictive de CANO dans le suivi longitudinal des patients atteints de ScS avec une PID et prédire le risque de mortalité et/ou de survenue d'une dégradation de fonction respiratoire. Pour valider la valeur de la CANO en tant que biomarqueur de la ScS avec PID, nous avons établi un modèle in vitro évaluant le lien biologique entre la présence d'une augmentation de la CANO et la pouvoir prolifératif sur des fibroblastes pulmonaires humains du sérum des patients atteints de ScS. Nous avons également mis au point un système de mesure du NO expiré chez les souris, et nous l'avons appliqué à l'évaluation in vivo de l'inflammation pulmonaire dans un modèle murin classique de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine et dans un deuxième modèle original de ScS induite par l'acide hypochloreux. Ces deux modèles in vivo nous permettent d'étudier les aspects histologiques et biologiques des poumons en relation avec les anomalies de la voie de signalisation du NO [179].

IV.3 Mesure du NO expiré chez la souris

Des modèles murins présentent plusieurs avantages : (1) ils permettent l'accès aux tissus des animaux sacrifiés afin de confronter les données des mesures physiologiques aux analyses cellulaires et moléculaires des tissus touchés par les processus pathologiques, (2) les conditions d'études sont mieux contrôlés chez des animaux que les patients, permettant de minimiser les variations inter-individuelles. Puisque le génome des souris possède plus de 80% de similitude avec le génome humain [226], on peut étudier des modèles murins dont les gènes codant l'une des trois isoformes de la NOS sont invalidés, et raisonnablement

extrapoler les observations faites chez l'animal aux mécanismes physiopathologiques impliqués dans telle ou telle situation pathologique chez l'homme [227].

L'activité du NO peut être évaluée soit par la mesure de l'expression de leurs enzymes de synthèse (les NOS) [228], leurs métabolites circulants (les nitrites et nitrates) [229] ou leurs effets biologiques cellulaires ou tissulaires. Cependant, la mesure du NO dans l'air expiré est particulièrement utile pour évaluer le rôle du NO dans les maladies pulmonaires. Le seul inconvénient concernant cette méthode est la difficulté de corréler les résultats obtenus avec les méthodes plus invasives telles que le lavage broncho-alvéolaire ou les mesures des expressions protéiques dans les tissus pulmonaires, ce qui justifie l'utilisation de modèles animaux qui nous permettrait de couples mesures in vivo (NO exhalé) et in vitro.

L'intérêt de l'étude du NO expiré en tant que marqueur de l'inflammation chez les souris a débuté avec l'étude des maladies inflammatoires des voies aériennes. Signalons à cet effet que le NO a été évalué pour la première fois dans l'air expiré des petits animaux [230]. Lorsque nous avions débuté ce projet de recherche, la mesure du NO expiré a été déjà effectuée par certaines équipes étudiant l'inflammation et l'hyperréactivité bronchique induite chez les souris [231-233].

La structure générale de l'appareil respiratoire des souris est comparable à celle de tous les mammifères [234, 235]. Les voies aériennes supérieures comportent les narines, les cavités nasales et le rhinopharynx. Les voies aériennes inférieures comprennent le larynx, la trachée, les bronches, les bronchioles et les alvéoles.

La concentration de NO mesurée dans l'air expiré est non seulement déterminée par la synthèse biologique du NO, mais également par la dynamique de la ventilation et la structure anatomique des poumons. La ventilation est caractérisée par la fréquence respiratoire, le volume courant et le débit de ventilation par minute. Ces facteurs peuvent conditionner la technique de mesure, parce qu'ils déterminent la quantité d'échantillon gazeux que l'on peut prélever, la sensibilité et l'amplitude du signal mesuré.

Les souris ont un petit volume courant, et un débit expiratoire important, elles ont besoin pour leur respiration normale un volume d'oxygène aussi important [234, 235]. Les paramètres ventilatoires sont fortement variables selon les lignées de souris étudiées. Les souris C57/BL6, utilisées dans notre modèle de SSc induite, ont une fréquence respiratoire de 53 163 min⁻¹, un volume courant de 160 μ l et une ventilation par minute de 25,5 ml.min⁻¹ [234, 235].

La partie supérieure des voies aériennes des souris est caractérisée par une grande vitesse de ventilation. Malheureusement, les données concernant la souche B57/BL6 ne sont pas disponibles. A défaut de pouvoir exclure la contribution de la cavité nasale de la production globale du NO, nous devons admettre la possibilité d'une contamination nasale dans la mesure du NO d'origine nasale dans nos expériences visant à étudier le NO d'origine pulmonaire. Ainsi, à défaut de pouvoir compartimenter les sources anatomique du NO expiré, nous avons mis l'accent sur la comparaison des valeurs de NO entre différents groupes d'animaux (et en faisant l'hypothèse qu'il n'existe pas de différence significative quant à la production nasale de NO entre les différents groupes d'animaux). Chez les souris de la lignée B6C3/F1, la longueur de la cavité nasale est de 5 mm, représentant ainsi une surface de contact de 289 mm² et un volume total de 31,5 mm³ [234].

Les poumons des souris ont un volume très limité, dix fois plus petit que celui des rats (1 ml vs 10 ml). Le poumon droit comporte 5 lobes mais le poumon gauche n'a qu'un lobe unique. Le parenchyme pulmonaire des souris occupe un volume considérable par rapport au volume corporel total avec un rapport encore plus important que celui noté chez l'homme (18% vs 12%) [234]. Le nombre de divisions bronchiques est beaucoup plus faible chez la souris, avec seulement de 13 à 17 générations, mais ce nombre peut varier en fonction de la lignée de souris [235]. L'air inspiré dans les bronches peut atteindre directement les alvéoles sans passer par les bronchioles respiratoires. Le diamètre alvéolaire des souris est de 80 μ m en moyenne (alors que ce diamètre est de 210 μ m chez l'homme). La barrière alvéolo-capillaire chez la souris est également plus fine : 0,32 μ m (vs 0,62 μ m chez l'homme) [234].

Les bronches de souris sont caractérisées par un grand calibre, donc une plus faible résistance. Le volume bronchique occupe une partie importante (11%) du volume pulmonaire total. Une couche très fine de cellules épithéliales tapisse la lumière bronchique, qui ne comporte par ailleurs pas de glandes muqueuses [234], ce qui facilite le transfert du NO de la cellule épithéliale à la lumière bronchique.

La dynamique du NO gazeux dans le système respiratoire des souris est comparable à celle de l'homme. La concentration du NO dans l'air expiré reflète un équilibre dynamique

entre la production tissulaire et la diffusion. Stitt et coll. [236] ont montré que le NO expiré augmente brutalement après un arrêt cardiaque chez les rats, ce qui suggère que la plupart du NO (75%) est capté avant d'être libéré dans l'air. Autrement dit, le NO expiré ne reflète qu'une partie de la quantité totale de NO synthétisé par les cellules pulmonaires. Une heure après l'arrêt cardiaque, le tissu pulmonaire est encore capable de produire du NO, à condition que l'animal continue à être ventilé et oxygéné. Ainsi, le tissu pulmonaire des rongeurs utilise directement l'oxygène de l'air inspiré pour synthétiser du NO.

Le NO endogène peut également être synthétisé par une voie non enzymatique, dont la source potentielle est le métabolisme des bactéries cutanées ou digestives [237, 238]. Cependant, les études chez les souris effectuées par Steudel et coll. [239], Yates et coll. [240] et Cook et coll. [241] ont confirmé que le NO expiré chez les souris est essentiellement synthétisé par les NOS, dont les trois isoformes sont inégalement exprimées selon le type de cellules, l'espèce étudiée et les circonstances physiologiques ou pathologiques lors de la mesure. Chez la souris, la contribution spécifique de chacune des trois isoformes à la production du NO expiré n'est pas totalement connue [231, 239, 241].

Le NO expiré augmente pendant les premières 24 heures suite à une exposition directe aux allergènes inhalés chez la souris [242]. Lors d'une administration systémique d'allergènes, le NO expiré augmente aussi, probablement par une activation de la NOS inductible [243-245]. L'augmentation du NO expiré est stable une semaine après la stimulation initiale. La valeur mesurée est indépendante du moment de la journée où s'effectue la mesure ou du régime alimentaire [242].

Contrairement à ce qui est habituellement observée chez l'homme, la contribution nasale au NO expiré semble modeste chez la souris [242]. Chez l'homme, on a montré que la diffusion du NO dans la région alvéolaire est à sens unique, car le NO endothélial dans les capillaires n'est pas capable de rediffuser vers l'alvéole [246]. De façon semblable, la contribution du NO endothélial au NO expiré semble faible voire nulle chez la souris, malgré l'existence d'une barrière alvéolo-capillaire plus fine [231]. La technique non-invasive est préférée par la plupart des auteurs [232, 233, 239, 242, 247], parce que les médicaments utilisés en anesthésie peuvent diminuer la production du NO de manière importante [242]. La mesure non-invasive du NO chez les souris comprend 2 étapes : le prélèvement du gaz et l'analyse (Figure 8).



Figure 8: Mesure du NO expiré chez les souris par une méthode non-invasive La souris est mise dans une chambre fermée (A). La chambre est ventilée par le gaz qui ne contient pas du NO (B) via un ventilateur au débit contrôlé (C). L'air expiré par la souris sera accumulé dans la chambre pendant 10 minutes et sera ensuite dirigé vers l'analyseur à chimiluminescence (D).

Des auteurs ont utilisé une enceinte close, connectée au ventilateur d'un côté et à l'analyseur du NO de l'autre. Dans leur premier modèle de mesure non-invasive du NO expiré chez les souris, Steudel et coll. [239] ont mis un groupe de 5 souris dans une chambre fermée de 400 mL et recueille le gaz expiré à analyser. Weicker et coll. [242] ont ventilé de façon continue la chambre dans laquelle il n'y a qu'une seule souris. Dans la plupart des études, la chambre a été utilisée comme un récipient d'air enrichi par l'air contenant du NO provenant de l'animal et à partir duquel l'analyse sera faite pour quantifier le NO produit par l'animal. La durée du recueil peut varier de 4 à 10 minutes selon l'amplification désirée du signal.

Le tableau suivant présente les études utilisant la mesure du NO expiré chez les souris et les résultats obtenus:

Auteur	Année de publication	Volume de chambre	Valeur normale de FENO (ppb)
Steudel [239]	2000	400 ml	9,1
Weicker [242]	2000	85 ml	10,1
Ameredes [247]	2005	600 ml	10
Sethi [233]	2008	600 ml	5-8
Bratt JM [248]	2009	Non connu	3,4
Ahmad [232]	2009	460 ml	10,6

V Modèles animaux

Les modèles animaux sont utiles pour étudier la physiopathologie et tester les nouvelles thérapeutiques éventuellement applicables à l'homme. Bien qu'aucun modèle animal ne puisse reproduire toutes les manifestations cliniques et biologiques de la ScS chez l'homme, plusieurs modèles animaux sont utilisés pour étudier les aspects cliniques de la ScS [249, 250]. Nous avons étudié les modèles murins de fibrose pulmonaire te de ScS induits par les substances chimiques comme la bléomycine et l'acide hypochloreux, dont les caractéristiques sont succinctement résumées ici.

V.1 Modèle de la fibrose induite par la bléomycine

V.1.1 Introduction du modèle

La bléomycine est un antibiotique fongique dérivé du fongus Streptomyces verticillus. Elle est surtout connue pour sa toxicité et sa capacité d'induire une fibrose cutanée et pulmonaire, du fait de l'absence dans ces organes de la bléomycine hydrolase, enzyme protectrice inactivant la bléomycine [251, 252]. Ainsi, la bléomycine est souvent utilisée dans les modèles animaux de fibrose cutanée et pulmonaire.

La fibrose pulmonaire induite par la bléomycine dépend de l'espèce de souris utilisée. Les souris C57Bl/6 sont sensibles à la bléomycine alors que les souris Balb/c y sont relativement résistantes, un caractère qui s'explique par la différence génétique concernant l'enzyme inactivant cette molécule [253]. L'induction de la fibrose pulmonaire par la bléomycine peut s'effectuer efficacement par différentes voies d'administration : intra-trachéale (IT), intraveineuse (IV), intra-péritonéale (IP) ou sous-cutanée (SC) et à des doses très variables (ex : 1,25 à 4 UI/kg monodose IT ou 20 mg/kg IV deux fois par semaine ou 0,5-1 mg/kg SC tous les jours pendant 4 semaines) [250, 254-256]. La fibrose pulmonaire est présente après 2 semaines d'instillation intra-trachéale ou 3 à 6 semaines en cas d'utilisation des autres voies, évaluée par le dosage de collagènes ou d'hydroxyproline dans les extraits pulmonaires. L'instillation intra-trachéale de bléomycine est utilisée essentiellement pour reproduire chez l'animal la fibrose pulmonaire idiopathique de l'homme, car elle est caractérisée par des lésions épithéliales alvéolaires initiales avec une pan-alvéolite

lymphocytaire et neutrophilique, suivies d'une prolifération des fibroblastes et d'une hyperproduction de collagènes [250]. L'injection sous-cutanée de bléomycine est utilisée dans les modèles de ScS, car elle entraîne des effets locaux (fibrose cutanée) et systémiques (fibrose pulmonaire) [249, 254].

V.1.2 Mécanismes physiopathologiques du modèle

Les premières études par microscopie électronique du modèle animal de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine ont montré l'apparition chronologique des processus pathologiques suivants : détachement des cellules endothéliales lésées des capillaires pulmonaires suivi d'apoptose, œdème interstitiel, infiltration inflammatoire de macrophages activés et de lymphocytes, nécrose multifocale des pneumocytes de type II, prolifération et hyperplasie des pneumocytes de type I [256, 257]. L'atteinte endothéliale initiatrice est caractérisée par la surexpression de molécules d'adhésion vasculaire comme l'ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1) et l'E-selectine qui favorisent l'infiltration inflammatoire. Ces molécules d'adhésion vasculaire jouent un rôle crucial dans la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine car les souris déficientes en ICAM-1 et/ou en Eselectine sont relativement protégées avec peu d'accumulation de collagènes après traitement par la bléomycine [258]. Ces molécules (L-selectine et ICAM-1) modulent de façon sélective l'orientation et l'accumulation des lymphocytes Th2 et Th17, induisant le développement de la fibrose cutanée et pulmonaire [259].

L'activation de la coagulation est également bien documentée dans la fibrose pulmonaire. La thrombine a un effet profibrosant via son récepteur PAR-1 (protease-activated receptor-1). Le traitement par un inhibiteur direct de la thrombine a permis d'inhiber la prolifération des fibroblastes stimulés *in vitro* par la thrombine et de réduire la production excessive de collagènes dans les poumons des rats injectés par la bléomycine [260].

L'infiltration des macrophages et des lymphocytes est une caractéristique des tissus fibrotiques dans la ScS ainsi que chez les souris traitées par la bléomycine [254]. Les macrophages jouent un rôle profibrosant important en sécrétant des facteurs de croissance (TGF- β , PDGF, CTGF) et des cytokines pro-inflammatoires. Ils sont aussi une source importante des espèces réactives de l'oxygène (ERO) via l'activation de la NADPH oxydase

et participent à la régulation de la matrice extracellulaire par modulation de l'expression des protéases (MMP) et des inhibiteurs de protéases (TIMP) [261, 262]. Cependant, certaines études ont montré que l'effet profibrosant de la bléomycine peut se produire de manière indépendante de l'inflammation, comme attestée par la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez les animaux avec une déficience immunitaire [263-265].

L'activation et le recrutement des fibroblastes sont au centre de la fibrogénèse. La bléomycine peut stimuler directement l'expression génique *in vitro* des collagènes par les fibroblastes humains [266, 267]. Les cytokines profibrosantes comme le TGF- β , le PDGF, le CTGF, l'IGF-1, l'ET-1, etc. sont activées et jouent un rôle clé dans la fibrogenèse induite par la bléomycine [268-271]. L'inhibition des voies de signalisation de ces molécules, soit par blocage des récepteurs, soit par neutralisation des ligands dans les liquides biologiques, peut atténuer voire prévenir la fibrose induite par la bléomycine. Le traitement par les anticorps (neutralisant) anti-TGF- β après instillation intra-trachéale de bléomycine réduit significativement la quantité de collagènes déposés dans les poumons des souris [272].

Certaines cytokines (IL-4, IL-6, IL-13, TNF- α , etc...) et chimiokines (MCP-1, MIP-1 α , IL-8, etc.) sont activées et leurs concentrations sériques sont élevées chez les souris traitées par la bléomycine [249, 273]. L'IL-4 stimule la prolifération des fibroblastes et augmente la synthèse des protéines de la matrice extracellulaire. En plus de ces mêmes effets directs sur les fibroblastes, l'IL-13 induit l'expression d'une chimiokine, la CCL-10 qui exerce, avec la MIP-1 α , un effet chimiotactique sur les monocytes et les lymphocytes T dans le modèle purin traité par la bléomycine, pérennisant ainsi l'inflammation et la fibrose pulmonaire. La neutralisation de l'IL-13 peut reverser l'effet fibrogénique de la bléomycine chez les souris [274]. Par ailleurs, la bléomycine est capable de provoquer un stress oxydatif via la production des ERO comme le superoxyde ($O_2^{\circ-}$) et le radical hydroxyle (OH°). Ces radicaux libres entraînent des lésions endothéliales, la prolifération des fibroblastes et la production de collagènes [254]. La bléomycine stimule également la voie extrinsèque de l'apoptose dans les cellules endothéliales [275] et dans les cellules épithéliales bronchiques [276].

En résumé, la bléomycine induit la fibrose selon différents mécanismes agissant sur les trois types de cellules principales : les cellules endothéliales, les cellules du système immunitaire et les fibroblastes. Les communications entre ces cellules activées dans ce modèle expérimental se font via un réseau complexe de cytokines, chimiokines, radicaux libres, aboutissant à l'activation des fibroblastes, acteurs de la fibrose [249, 250].



Figure 9 : Mécanismes cellulaires et moléculaires de la fibrogénèse induite par la bléomycine.

Implication de trois types de cellules effectrices : les cellules endothéliales qui sécrètent du monoxyde d'azote (NO) et l'endothéline ; les cellules inflammatoires sources de cytokines profibrosantes et de stress oxydatif ; et les fibroblastes responsables de la synthèse excessive de collagènes. Les fibroblastes sont contrôlés par des signaux provenant de cellules endothéliales et inflammatoires, mais sont également auto-induits par le TGF-β.

V.2 Modèle murin de la ScS induite par le stress oxydatif

V.2.1 Rôle du stress oxydatif dans la physiopathologie de la ScS

Le stress oxydatif survient quand il existe un déséquilibre entre les agents oxydants et les systèmes antioxydants, se faisant en faveur de l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) [172]. Par ses propriétés anatomiques et physiologiques, les poumons sont en permanence exposés au stress oxydatif. Les ERO occupent une place importante dans la physiopathologie des maladies broncho-pulmonaires, puisqu'ils sont générés de manière constitutive par différents types de cellules qui utilisent directement l'oxygène de l'air inspiré. Les principales cellules qui génèrent des ERO dans les poumons sont des cellules inflammatoires phagocytaires (les macrophages et les neutrophiles) ou les cellules nonphagocytaires comme les cellules endothéliales et les fibroblastes [277]. Le stress oxydatif est impliqué dans la pathophysiologie de la ScS selon une théorie proposée par Murrel en 1993, dans laquelle les ERO sont considérés comme un facteur reliant la réaction inflammatoire au dysfonctionnement endothélial et à la fibrose qui sont les trois pathogéniques principaux de la ScS [175, 277]. Plusieurs études ont trouvé une augmentation des marqueurs du stress oxydatif chez les patients atteints de ScS [134, 278]. Il existe une relation entre les concentrations élevées des ERO et/ou la réduction des antioxydants et le phénomène de Raynaud [279], l'activation des lymphocytes [280], l'apoptose des cellules endothéliales [281] ou l'expression génique des facteurs profibrosants [282]. Cependant, il existe aussi des études n'ayant pas réussi à montrer la contribution directe des ERO dans la phase initiale de la ScS [283-285]. Parmi les résultats contradictoires, on trouve ceux concernant le rôle du NO. Le NO fait partie des produits oxydatifs et nitrosatifs et joue un rôle multiple dans la physiologie respiratoire. L'effet pathologique du NO dans la ScS semble biphasique, et dépend de sa concentration et de l'environnement où il se trouve [286].

V.2.2 Caractéristiques biochimiques de l'acide hypochloreux (HOCl)

D'un point de vue chimique, l'acide hypochloreux est une forme acido-basique du chlore en solution aqueuse. Le chlore dilué dans l'eau est présent sous trois formes chimiques: l'acide hypochloreux (HOCl), l'ion hypochlorite ClO⁻ et l'ion chlorure Cl⁻.

$$Cl_2 + 2H_2O \rightarrow HOCl + Cl^- + H_3O^+$$

Dans des solutions physiologiques (pH =7,4), il existe un mélange équilibré de l'acide hypochloreux et sa base conjuguée : l'ion hypochlorite ClO⁻. Toutes les formes chimiques du chlore libre possèdent une toxicité importante sur les molécules vivantes [287-291]. Dans la vie quotidienne, ces produits chlorés sont largement utilisés comme désinfectants, ou dans la chloration de l'eau potable. L'acide hypochloreux est la forme active de l'eau de Javel

(hypochlorite de sodium, NaOCl) ou de Chloramine dans les milieux aquatiques. Dans les systèmes biologiques, l'acide hypochloreux est un produit intermédiaire dans la cascade des radicaux hydroxyles [291].

Au cours de la phagocytose, l'HOCl est formé par l'action de la myélo-peroxydase (MPO), cette réaction se produit dans les polynucléaires neutrophiles (PNN) et dans les monocytes.

$$H^+ + H_2O_2 + Cl^- \rightarrow HOCl + H_2O_2$$

L'HOCl réagit très vite avec l'anion superoxyde pour donner le radical hydroxyle OH°⁻; molécule oxydante responsable de lésions cytotoxiques [289, 290]. Les MPO, libérées lors de l'activation des neutrophiles, sont des enzymes ayant une double activité, étant à la fois capable d'une peroxydation et d'une chloration. La production d'HOCl par les MPO participe à la défense contre les agents infectieux [289]. L'HOCl et sa base conjuguée (ClO⁻) sont deux puissants agents oxydants ayant pour cibles majeures des molécules lipidiques [287-290]. La réaction d'HOCl avec la double liaison des acides gras insaturés donne la chlorhydrine qui est aussi un produit cytotoxique. L'HOCl réagit aussi avec les acides aminés comme la L-arginine, la lysine et la taurine pour former le radical N-Chloramine (R-NHCl) qui à son tour, entraine des lésions de l'ADN. Comme l'HOCL ne porte aucune charge électrique, il peut traverser facilement les membranes cytoplasmiques.

Un autre produit des MPO est l'ion nitrite $NO_2^{\circ-}$. Cette molécule peut interagir avec l'acide HOCl pour former le chlorure de nitrite (NO₂Cl) possédant à la fois la capacité de nitration, d'oxydation et de chloration [288].

$$HOCl + NO_2^{\circ} + H^+ \rightarrow NO_2Cl + H_2O$$

Le schéma suivant nous présente les principaux métabolites des ERO dans les systèmes biologiques et la place de l'HOCl :



Figure 10 : Production des ERO : HOCl, NO et $O_2^{\circ-}$

V.2.3 Modèle murin de ScS induite par l'acide hypochloreux

Fondé sur l'hypothèse que les espèces réactives oxydantes soient impliquées dans la pathologie de la ScS, Servettaz et coll. [179] ont développé un modèle murin de la ScS induite par les substances génératrices d'EROs. Le but de ce modèle était de mieux comprendre le rôle du stress oxydant dans la physiopathologie de la ScS. Après injection de différents générateurs du stress oxydants comme l'acide hypochloreux, DMSO-KO₂ et le peroxyde d'hydrogène, les auteurs ont évalué la capacité de ces substances à entraîner des lésions typiques de ScS [179]. Par rapport au modèle de référence utilisant la bléomycine, il semble que les lésions pulmonaires obtenues avec l'HOCl se rapprochent d'avantage à celles avec l'HOCl se caractérise par une fibrose pulmonaire associée à un important infiltrat de cellules inflammatoires. Le nouveau modèle montre aussi une prolifération des fibroblastes,

non observée avec la bléomycine. De plus, les souris injectées avec l'HOCl présentent dans le sérum des auto-anticorps similaires à ceux des patients atteints de ScS.

C'est la première étude qui étudie le rôle de l'acide HOCl dans le développement *in–vivo* de la fibrose pulmonaire. Les études précédentes n'ont porté que sur les anions hydroxyle et superoxyde qui sont des ERO bien connues dans les lésions d'ischémie-reperfusion [277].

TRAVAUX PERSONNELS

Article 1

Hua-Huy T, Tiev KP, Chéreau C, Duong-Quy S, Cabane J, Dinh-Xuan AT. Increased alveolar concentration of nitric oxide is related to serum-induced lung fibroblast proliferation in patients with systemic sclerosis.

J Rheumatol 2010; 37: 1680-7. PMID: 20595271

Article 2

Tiev KP, **Hua-Huy T**, Kettaneh A, Allanore Y, Le-Dong NN, Duong-Quy S, Cabane J, Dinh-Xuan AT. Alveolar concentration of nitric oxide predicts pulmonary function deterioration in scleroderma.

Thorax 2011 Oct 24. [Epub ahead of print]. PMID:22026971

Article 3

Hua-Huy T, Le-Dong NN, Duong-Quy S, Bei Y, Rivière S, Tiev KP, Nicco C, Dinh-Xuan AT. Increased exhaled nitric oxide as a biomarker of inflammation during the formation of lung fibrosis in a murine model of systemic sclerosis.

En cours de soumission.

Article 1

HUA-HUY T, TIEV KP, CHEREAU C, DUONG-QUY S, CABANE J, DINH-XUAN AT. Increased alveolar concentration of nitric oxide is related to serum-induced lung fibroblast proliferation in patients with systemic sclerosis. J Rheumatol 2010;37:1680-7. PMID: 20595271

Corrélation entre l'inflammation alvéolaire et la prolifération des fibroblastes induite par le sérum des patients atteints de sclérodermie systémique

Etat de la question

L'inflammation alvéolaire, déterminée par une augmentation de la concentration alvéolaire du NO expiré (C_ANO), est présente chez certains patients atteints de ScS avec pneumopathie interstitielle diffuse (PID). La C_ANO est corrélée à la sévérité de la PID, attestée par un syndrome restrictif et une diminution de la capacité de diffusion alvéolo-capillaire. Cependant, le lien biologique entre l'inflammation alvéolaire et le mécanisme de la fibrose pulmonaire reste inconnu. Notre objectif est de déterminer la relation entre l'augmentation de la C_ANO , reflétant la présence d'une alvéolite et la capacité du sérum des patients sclérodermiques présentant une C_ANO élevée à induire la prolifération des fibroblastes pulmonaires et leur transformation en myofibroblastes.

Matériels et méthodes

Les sérums de 37 patients atteints de ScS et de 10 volontaires sains, ayant eu une mesure de NO dans l'air expiré, ont été incubés durant 72 heures avec des fibroblastes pulmonaires normaux (Promocell®). Les patients atteints de ScS ont eu préalablement des explorations fonctionnelles respiratoires et un scanner thoracique. L'index de prolifération des fibroblastes pulmonaires (IPF) à 72 heures d'incubation avec les sérums des patients (dilués à 10% dans le milieu de base DMEM, Thermo Scientific®) a été comparé avec celui des volontaires sains.

Parmi les patients atteints de ScS, l'IPF des patients ayant une C_ANO augmentée (\geq 4,3 ppb) a été comparé à celui des patients ayant une C_ANO normale (< 4,3 ppb). De même la transformation des fibroblastes en myofibroblastes à 72 heures d'incubation avec le sérum a été déterminée par immunofluorescence et Western Blot et comparée entre les deux groupes.

Résultats

L'IPF et la C_ANO des patients atteints de ScS étaient significativement plus élevés que ceux des volontaires sains. L'IPF des patients était corrélé à la C_ANO (rho = 0,48 ; p = 0,002). L'IPF des patients atteints de ScS avec une C_ANO \geq 4,3 ppb était significativement supérieur à celui des patients atteints de ScS avec une C_ANO \leq 4,3 ppb (p < 0,001). En revanche, l'IPF n'était associé ni à la distance de marche parcourue en 6 minutes, ni au syndrome restrictif pulmonaire. L'augmentation de la prolifération des fibroblastes pulmonaires induite par le sérum des patients s'accompagnait aussi d'une transformation phénotypique des fibroblastes en myofibroblastes, caractérisées par une grande capacité de production de collagène et la présence d'actines musculaires lisses (α -smooth muscle actine ou α -SMA) dans le cytoplasme. L'augmentation de la C_ANO était associée à l'inflammation alvéolaire et à la capacité du sérum à induire la prolifération des fibroblastes pulmonaires et leur conversion en myofibroblastes.

Discussion

Les résultats de cette étude montrent qu'il existe une relation significative entre l'augmentation de la C_ANO et les mécanismes de fibrose pulmonaire. Ils suggèrent l'existence d'un facteur humoral synthétisé au niveau des zones pulmonaires où il existe une inflammation locale, puis libéré dans la circulation sanguine. Ce facteur humoral confère au sérum la capacité d'induire la fibrose. La nature de ce facteur n'est pas connue. Il peut s'agir d'un auto-anticorps, d'un peptide de bas poids moléculaire ou d'une cytokine, qui est à l'origine de ces processus fibrogéniques. L'identification de ce facteur pourrait aider à la compréhension des voies biologiques impliquées dans le processus de fibrose et l'inhibition de son effet biologique pourrait avoir des applications thérapeutiques dans le traitement préventif ou curatif des atteintes pulkmonaire au cours de la sclérodermie systémique.

Increased Alveolar Concentration of Nitric Oxide Is Related to Serum-induced Lung Fibroblast Proliferation in Patients with Systemic Sclerosis

THONG HUA-HUY, KIET PHONG TIEV, CHRISTIANE CHÉREAU, SY DUONG-QUY, JEAN CABANE, and ANH TUAN DINH-XUAN

ABSTRACT. Objective. Lung inflammation is present in patients with systemic sclerosis (SSc) and interstitial lung disease (ILD), but the mechanisms linking inflammatory and fibrotic processes in ILD are unknown. Our aim was to investigate whether alveolar inflammation, reflected by increased alveolar concentration of exhaled nitric oxide (C_ANO), is related to the ability of serum from patients with SSc to induce pulmonary fibroblast proliferation (PFP) and myofibroblast conversion.

Methods. C_ANO was measured in all subjects (37 patients with SSc and 10 healthy controls) whose sera were used to stimulate PFP (assessed by BrdU labeling index) and myofibroblast conversion (detected by α -smooth muscle actin expression). The PFP index in patients with SSc was compared to control values, and between patients with SSc who had elevated (> 4.3 ppb) and normal (≤ 4.3 ppb) C_ANO values.

Results. Both C_ANO and the PFP index were significantly greater in patients with SSc compared to controls. In patients with SSc, the PFP index was directly related to C_ANO levels (r = 0.48; p = 0.002). The median PFP index was significantly higher in patients with SSc who had elevated C_ANO (> 4.3 ppb; n = 25, median 1.1, range 0.98–1.23) than in patients with SSc who had normal C_ANO (\leq 4.3 ppb; n = 12, median 0.93, range 0.82–1.08; p = 0.01). Similarly, myofibroblast conversion induced by SSc serum was significantly greater in patients with $C_ANO > 4.3$ ppb than in patients whose C_ANO was \leq 4.3 ppb (p < 0.001) and controls (p < 0.001).

Conclusion. Alveolar inflammation reflected by increased nitric oxide production was related to serum-induced PFP and myofibroblast conversion, linking the active alveolitis process to cell proliferation and lung fibrosis in patients with SSc. (First Release July 1 2010; J Rheumatol 2010;37:1680–7; doi:10.3899/jrheum.090915)

Key Indexing Terms: SYSTEMIC SCLEROSIS NITRIC OXIDE

MYOFIBROBLAST ALVEOLITIS INTERSTITIAL LUNG DISEASE

Systemic sclerosis (SSc) is a connective tissue disease of unknown origin, characterized by microvascular endothelial damage, inflammation, and progressive fibrosis. The latter usually takes place in the skin but also involves multiple internal organs^{1,2}. Lung involvement, including pulmonary hypertension and interstitial lung disease (ILD), is now the

T. Hua-Huy, MD, MSc; S. Duong-Quy, MD, PhD; A.T. Dinh-Xuan, MD, PhD, Department of Physiology, University Paris Descartes, Cochin Hospital, APHP; K.P. Tiev, MD, PhD; J. Cabane, MD, Department of Internal Medicine, University Paris Est, Saint-Antoine Hospital, APHP; C. Chéreau, PhD, Laboratory of Immunology, University Paris Descartes.

Address correspondence to Prof. A.T. Dinh-Xuan, Department of Physiology, University Paris Descartes, Cochin Hospital, APHP, PRES-EA 2511, Paris, France. E-mail: anh-tuan.dinh-xuan@cch.aphp.fr Accepted for publication March 24, 2010. main cause of death in endstage disease³. Although the pathogenesis of ILD remains largely unknown, it is now accepted that endothelial cell damage and immune-inflammatory processes are the primary events leading to proliferation of fibroblast and its phenotypic switch to myofibroblast, the latter producing high amounts of collagen that eventually lead to lung fibrosis in SSc^{4,5}.

Nitric oxide (NO), an important intracellular mediator, is both a powerful endogenous vasodilator and a sensitive biomarker of inflammation⁶. In patients with SSc, inducible NO synthase (NOS) is highly expressed as a result of lung inflammation, which explains why exhaled NO could be increased when active alveolitis is present in patients with SSc⁷.

Lung parenchymal inflammation causes release into the bloodstream of several cytokines or chemokines that have both proinflammatory and proliferative effects. Serum from patients with SSc contains biological mediators that have the ability to induce fibroblast proliferation or myofibroblast conversion^{8,9}. Studies have shown that proinflammatory

Personal non-commercial use only. The Journal of Rheumatology Copyright © 2010. All rights reserved.

The Journal of Rheumatology 2010; 37:8; doi:10.3899/jrheum.090915

From the Department of Physiology, University Paris Descartes, Cochin Hospital (APHP); Department of Internal Medicine, University Paris Est, Saint-Antoine Hospital, APHP; and Laboratory of Immunology, University Paris Descartes, Paris, France.

Supported by the Legs Poix, Chancellerie des Universités de Paris, and the Association des Sclérodermiques de France.

cytokines known to be involved in fibroblast proliferation *in vitro* induce a high expression of NOS and a high amount of NO¹⁰.

Because metabolites of NO in serum were influenced by many factors such as a nitrite-rich diet, the amount of NO directly collected in exhaled air resulting from lung inflammatory activity could more accurately reflect active alveolitis¹¹. Several studies have reported that the total exhaled NO level was increased with SSc lung involvement^{12,13} and its association with alveolitis was documented by bronchoalveolar lavage (BAL) fluid cell count⁷. Using a new method, partitioned exhaled NO measurement, to separately assess NO originating from conducting airways (NO maximal bronchial flow rate: JawNO) and alveoli (NO alveolar concentration: C_ANO), we¹⁴ and others¹⁵ have reported that C_ANO was related to the severity of ILD in patients with SSc.

Although studies have reported the profibrotic effect induced by SSc serum in murine and human dermal fibroblasts^{9,16}, the links between the ability of serum from patients with SSc to induce lung fibroblast proliferation, the early launching process of lung fibrosis, and the importance of pulmonary inflammation, reflected by high alveolar output of NO, have not been fully described. We therefore investigated whether alveolar inflammation, quantified by increased C_ANO, is related to the ability of serum to induce pulmonary fibroblast proliferation (PFP) and myofibroblast conversion in patients with SSc.

MATERIALS AND METHODS

Subjects. Between November 2006 and 2008, all consecutive patients seen in our academic hospital over 18 years old who fulfilled the American College of Rheumatology SSc criteria¹⁷ were eligible for and enrolled into this prospective study. Patients who had upper airway infections less than 3 months before, history of smoking less than 1 month, pulmonary arterial hypertension (PAH, defined as systolic pulmonary artery pressure > 40 mm Hg, estimated by echocardiogram), or immunosuppressive, corticosteroid or NO donor therapy were excluded. Hence, 37 inpatients and outpatients with SSc (33 women, mean age 55 yrs, range 47-63.5) were included. Twenty-eight patients had the limited form and 9 had the diffuse form of SSc, according to LeRoy's subset classification18. The median disease duration was 10.4 years (range 4.9-18.7 yrs). Because endothelial dysfunction related to PAH in patients with SSc might decrease the exhaled NO output19, we excluded patients likely to have PAH in order to make sure that the increased CANO in our study was due only to alveolar inflammation.

Clinical features and blood samples were collected from all 37 patients within a week of measurement of partitioned exhaled NO. Pulmonary function tests (PFT) and chest high-resolution computed tomography (HRCT) were performed within 1 month of blood sampling. Blood sampling and measurement of partitioned exhaled NO were performed on the fast day after 72 h of low-nitrate meals. Blood samples were centrifuged after 1 h of coagulation at room temperature and serum was collected and stored at –80°C until use. We simultaneously collected serum of 10 age and sex-matched nonsmoking healthy subjects (8 women, mean age 53.5 yrs, range 42.5–57.0) for control. The study was approved by the local ethics committee and all patients provided written consent.

Exhaled NO measurement. Exhaled NO was measured in all 37 patients with SSc, using a chemiluminescent NO analyzer (Seres, EndoNO 8000;

Aix-en-Provence, France), according to the validated method for online measurement of exhaled NO concentration in adults by the American Thoracic Society/European Respiratory Society (ATS/ERS) recommendation²⁰. After full inspiration from room air with ambient NO levels < 20 ppb, the subject exhaled against positive pressure that was constantly kept between 5 cm H₂O (lower limit) and 20 cm H₂O (upper limit) to generate exhalation flow rates (V'_E) of 50, 100, 150, 200, and 250 ml/s (FE_{NO50-250}). For each V'_{E} , the elimination rate of NO (V'_{NO}) was calculated (V 'NO = $V'_E \times F_E NO)^{21,22}$. $F_E NO$ is inversely related to V'_E , while V'_{NO} varies directly as a function of V'_E. At the flow rate \geq 50 ml/s, the latter relationship is linear and can be expressed as $V'_{NO} = V'_E \times F_E NO = C_A NO \times V'_E$ + J'awNO. For each patient and control subject, the R² values of the relationship between F_ENO and V'_E were calculated. We have reported that the CANO cutoff value of 4.3 ppb accurately defined early impairment of DLCO (< 80% of predicted value) and the presence of ILD on lung HRCT scans23. We used this cutoff to separate patients with high and low levels of CANO.

Lung function measurement. This measure, including total lung capacity (TLC), forced vital capacity (FVC), DLCO, and alveolar volume (VA) was performed (MasterScreen[®] Body, VIASYS Healthcare GmbH, Hoechberg, Germany) according to ATS/ERS recommendations²⁴. Results were expressed as percentage of predicted values.

Pulmonary CT scanning. HRCT of the lungs was performed in all patients. ILD was considered present if lesions such as ground-glass attenuation, lobular septal thickening, and subpleural honeycomb changes were demonstrated on chest HRCT.

Cell culture and proliferation assays. Primary human lung fibroblasts from healthy subjects (PromoCell[®], Heidelberg, Germany) were used between the fourth and eighth passages with Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) complemented with antibiotics (100 IU/ml penicillin, 100 IU/ml streptomycin, and 0.25 µg/ml amphotericin B). Chemicals were provided by Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, unless otherwise stated.

Cell proliferation was determined by the colorimetric cell proliferation Biotrak ELISA method (GE Healthcare Europe GmbH, Orsay, France) based on the measurement of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation during DNA synthesis of proliferating cells.

Primary human normal pulmonary fibroblasts (4×10^3 /well) were seeded in 96-well plates (NunclonTM Delta, Nunc, Hørsholm, Denmark), starved of fetal bovine serum for 24 h, and then incubated in DMEM (10%) with serum from patients with SSc or healthy subjects for 72 h. Cells were then subjected to BrdU incorporation for 2 h. Detection procedure was performed according to manufacturer's instructions. Serum was used in quadruplicate. Results were accepted when the coefficients of variation were < 10%.

Immunofluorescence staining for α -smooth muscle actin (α -SMA). Normal human lung fibroblasts were seeded (3 × 10⁴/well) on cover slips placed on a 24-well plate in serum-free DMEM for 24 h. After being treated with sera as described, cells were fixed with 3% paraformaldehyde/PBS, permeabilized with 0.1% Triton X-100, and incubated sequentially with mouse anti- α -SMA IgG antibody (1:100; DakoCytomation, Glostrup, Denmark) and FITC goat anti-mouse IgG antibody (1:200; Molecular Probes, Invitrogen, Burlingame, CA, USA). Cell nuclei were stained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) Vectashield (Vector Labs, Burlingame, CA, USA). Expression of α -SMA was visualized by confocal microscopy and evaluated semiquantitatively by coding every visual field (250×) into 0, +1, +2, or +3 according to its density. Ten optical fields were counted for 1 slide and each group contained at least 5 sera used in duplicate.

Western blot analysis for α -smooth muscle actin. Primary human lung fibroblasts were seeded on 25-cm² flasks (1.5 × 10⁵ cells/flask) and treated with human sera as described. Cell extracts, protein measurement, and Western blot techniques were as described²⁵ using primary mouse anti- α -SMA IgG antibody (1:1000) and horseradish peroxidase-associated goat anti-mouse IgG antibody (1:15,000; Santa Cruz Biotechnology,

Personal non-commercial use only. The Journal of Rheumatology Copyright © 2010. All rights reserved.

Hua-Huy, et al: CANO and fibroblasts in SSc

1681

Heidelberg, Germany). Immunostained bands were visualized using the enhanced chemiluminescent kits (Amersham, Orsay, France). Samples were normalized to *B*-tubulin and quantified by densitometry.

Statistical analysis. Data were analyzed using SPSS 16.0 software (SPSS, Chicago, IL, USA). Categorical data were described using percentage, and comparisons were performed by chi-squared test with Yates correction. Continuous data were summarized using median and range (first and third quartiles). Comparisons were done with the Mann-Whitney U test unless otherwise specified. Spearman's test was used to study the relationship between PFP assessed by the BrdU labeling index and disease measurements. Multivariate linear regression analysis was also performed. All reported p values were 2-sided and deemed significant when < 0.05.

RESULTS

Demographic, clinical, and functional characteristics as well as the serum ability to induce PFP of 37 patients with SSc and 10 healthy controls are reported in Table 1. There was no difference in age and sex between the groups of patients and controls. Among patients with SSc, 16 had ILD on lung HRCT, 9 had restrictive respiratory syndrome (defined as TLC < 80% of predicted value), and 11 had severe gas exchange abnormalities (defined as DLCO < 60% of predicted value). C_ANO was significantly (p < 0.001) higher in patients with SSc (median 5.77 ppb; range 3.85–9.46) compared with controls (2.38 ppb; range 2.14–3.15). Twenty-five out of 37 patients with SSc had a level of C_ANO higher than 4.3 ppb (Table 2 summarizes the characteristics of the patients with SSc according to C_ANO levels).

Lung fibroblast proliferation induced by serum from patients with SSc and controls. The median of the PFP index induced by sera from patients with SSc (n = 37, median 1.04, range 0.93–1.19) was significantly higher than that

induced by sera from controls (n = 10, median 0.82, range 0.72–1.00; p = 0.007; Table 1).

The proliferative effect of serum from patients with $C_ANO > 4.3$ ppb (n = 25, median 1.1, range 0.98–1.23) was significantly stronger than that from patients with $C_ANO \le 4.3$ ppb (n = 12, median 0.93, range 0.82–1.08; p = 0.01; Table 2, Figure 1). Interestingly, there was no significant difference in the PFP index between sera from patients with $C_ANO \le 4.3$ ppb and those from controls (median 0.82, range 0.72–1.0; p = 0.3).

To identify other factors that could be associated with serum ability to induce PFP, we compared the PFP index between groups of patients following different clinical and functional features. Patients at the early stage of disease (\leq 4 yrs) had a higher PFP index (n = 7; median 1.24, range 0.98–1.28) compared to patients with SSc who had longer disease duration (> 4 yrs; n = 30; median 1.01, range 0.88–1.13; p = 0.03). Neither the form of SSc (limited or diffuse), nor the impairment of PFT measurements (such as FVC or DLCO), nor the presence of ILD significantly affected the ability of serum to induce lung fibroblast proliferation (data not shown).

Active alveolitis has been known to precede pulmonary fibrosis; we focused on the comparison of the serum ability to induce PFP between patients with SSc with $C_ANO > 4.3$ ppb and those with $C_ANO \le 4.3$ ppb in patients with SSc who did not have ILD. The serum from the former group exhibited a stronger ability to induce PFP (n = 12, median 1.19, range 1–1.25) than serum from patients without ILD and lower C_ANO levels (n = 9, median 0.93, range 0.79–1.13; p = 0.02). However, among patients with estab-

Table 1. Demographic, clinical, and functional characteristics of patients with SSc and healthy controls.

Characteristics	SSc, n = 37	Controls, $n = 10$	р
Age, yrs, mean (range)	55 (47-63.5)	53.5 (42.5-57.0)	0.33
Males, n (%)	4 (10.8)	2 (20)	0.59
Duration of disease*, yrs, mean (range)	10.4 (4.9-18.7)		
Patients with dSSc, n (%)	9 (24)		
Patients with ILD, n (%)	16 (43)		
TLC (% predicted)	101 (81-113)		
TLC < 80% of predicted, n (%)	9 (24)		
FVC (% predicted)	96 (77-117)		
FVC < 80% of predicted, n (%)	10 (27)		
DLCO (% predicted)	70 (53-78)		
DLCO/AV (% predicted)	77 (66-88)		
Systolic PAP, mmHg	30 (27-37)		
F _E NO, 50 ml/s, ppb	12.4 (8.2-19.3)	13.7 (12.2-19.1)	0.38
C _A NO, ppb	5.77 (3.85-9.46)	2.38 (2.14-3.15)	< 0.001
PFP index (optical density)	1.04 (0.93-1.19)	0.82 (0.72-1.00)	0.007

Results are given as median and range (first and third quartiles). dSSc: diffuse SSc; ILD: interstitial lung disease; TLC: total lung capacity; FVC: forced vital capacity; DLCO: diffusing capacity of carbon monoxide; AV: alveolar volume; systolic PAP: systolic pulmonary artery pressure estimated by echocardiogram; $F_{\rm E}$ NO, 50 ml/s: fractional exhaled NO concentration at 50 ml/s constant flow rate, exhaled fraction of intric oxide; C_ANO: alveolar concentration of exhaled nitric oxide; PFP: pulmonary fibroblast proliferation. * Calculated from first non-Raynaud's phenomenon clinical symptom of SSc to the date of enrollment into the study.

Personal non-commercial use only. The Journal of Rheumatology Copyright © 2010. All rights reserved.

1682

The Journal of Rheumatology 2010; 37:8; doi:10.3899/jrheum.090915
Characteristics	$C_A NO > 4.3 \text{ ppb},$ n = 25	$C_A NO \le 4.3 \text{ ppb},$ n = 12	р
Age, yrs, mean (range)	54 (44-65.5)	57.5 (52.5-61.5)	0.47
Duration of disease*, yrs, mean (range)	10.8 (3.5-19.4)	9.8 (6.1-13.6)	0.82
Patients with dSSc, n (%)	7 (28)	2 (17)	0.46
Patients with ILD, n (%)	13 (52)	3 (25)	0.13
Systolic PAP, mmHg	30 (27-37)	33 (26.5-35.25)	0.76
TLC (% predicted)	101 (80-113)	99 (80-114)	0.96
TLC < 80% of predicted, n (%)	6 (24)	3 (25)	0.73
FVC (% predicted)	95 (75-113)	102 (90-120)	0.39
FVC < 80% of predicted, n (%)	8 (32)	2 (16.7)	0.55
DLCO (% predicted)	65 (43-77)	76 (62-86)	0.08
F _E NO, 50 ml/s, ppb	12.68 (9.97-21)	8.97 (5.59-15.62)	0.03
C _A NO, ppb	8.09 (5.71-11.07)	3.28 (2.2-3.88)	< 0.001
JawNO, ppb	11.71 (5.09-38.52)	16.76 (5.69-38.07)	0.85
R ²	0.98 (0.96-0.99)	0.98 (0.9-0.99)	0.88
PFP index (optical density)	1.1 (0.98-1.23)	0.93 (0.82-1.08)	0.01

Table 2. Characteristics of patients with SSc with high levels of alveolar concentration of exhaled nitric oxide ($C_ANO > 4.3$ ppb) compared to those with $C_ANO \le 4.3$ ppb. Results are given as median and range (first and third quartiles).

dSSc: diffuse SSc; ILD: interstitial lung disease; TLC: total lung capacity; FVC: forced vital capacity; DLCO: diffusing capacity of carbon monoxide; PAP: systolic pulmonary artery pressure estimated by echocardiogram; F_ENO , 50 ml/s: fractional exhaled NO concentration at 50 ml/s constant flow rate, exhaled fraction of nitric oxide; C_ANO : alveolar concentration of exhaled nitric oxide; JawNO: maximal bronchial flow rate of nitric oxide. * Calculated from first non-Raynaud's phenomenon clinical symptom of SSc to the date of enrollment into the study.



Figure 1. Comparison of pulmonary fibroblast proliferation index of healthy controls, patients with SSc with C_ANO \leq 4.3 ppb, and those with C_ANO > 4.3 ppb. C_ANO: alveolar concentration of exhaled nitric oxide; NS: not significant.

lished ILD, the serum proliferative capacity on lung fibroblasts was not significantly different (p > 0.05) between patients with high levels of C_ANO (> 4.3 ppb; n = 13, median 1.03, range 0.97-1.13) and those with $C_ANO \le 4.3$ ppb (n = 3, median 0.93, range 0.87-0.96). Lung fibroblast conversion into myofibroblasts induced by serum from patients with SSc and controls. PFP induced by serum from patients with SSc came with a conversion to myofibroblasts, characterized by the presence of α -SMA in the cytoplasm. Immunofluorescent staining showed that the expression of α -SMA was significantly higher in fibroblasts stimulated by serum from patients with SSc compared with that in fibroblasts stimulated by controls (p = 0.012). Similar to PFP index results, α -SMA levels were higher in fibroblasts cultured with serum from patients with C_ANO > 4.3 ppb compared to those stimulated by serum from patients with C_ANO ≤ 4.3 ppb (p < 0.001; Figure 2). The results of lung fibroblast transformation were also confirmed by Western blot analysis (Figure 3).

Relationship between the PFP index and C_ANO levels and skin score. Importantly, the serum proliferative capacity on lung fibroblasts was related to the lung inflammation reflected by levels of C_ANO (p = 0.48; p = 0.002) but not with the extent of skin fibrosis assessed by mRSS (p = 0.092, p = 0.6).

Followup. During the followup period, the PFT measurements of 10 patients worsened, defined as a decrease of > 10% in FVC or TLC (median followup 27 mo, range 15.3-36.8; Table 3). Twenty-seven patients had stable lung disease (median followup 24 mo, range 20-34.5). Seven out of 25 patients with $C_ANO > 4.3$ ppb, and 3 out of 12 patients with $C_ANO \le 4.3$ ppb, had worse PFT measurements. However, the PFP index of patients with worse subsequent lung function (median 1.11, range 0.93-1.24) was not sig-

Personal non-commercial use only. The Journal of Rheumatology Copyright © 2010. All rights reserved.

Hua-Huy, et al: CANO and fibroblasts in SSc

1683



Figure 2. Immunofluorescence staining of α -smooth muscle actin (α -SMA) in lung fibroblasts stimulated by serum from patients with SSc or healthy controls (A-D). Semiquantitative results were given as mean \pm SEM and compared by Student's 2-tailed test. Each group contained at least 5 samples in duplicate. NS: not significant; FBS: fetal bovine serum; SSc: systemic sclerosis; C_ANO : alveolar concentration of exhaled nitric oxide.

Personal non-commercial use only. The Journal of Rheumatology Copyright © 2010. All rights reserved.

1684

The Journal of Rheumatology 2010; 37:8; doi:10.3899/jrheum.090915



Figure 3. Western blot analysis of α -smooth muscle actin (α -SMA) levels in lung fibroblasts stimulated by serum from patients with systemic sclerosis (SSc) or healthy controls. Data were given as mean \pm SEM, compared by Student's 2-tailed test. Each group contained 6 samples. C_ANO: concentration of exhaled nitric oxide; FBS: fetal bovine serum.

nificantly higher than that of patients with stable lung function (median 0.99, range 0.87-1.22; p = 0.45). Similarly, there were no significant differences (p > 0.05) in PFT measurements (FVC, TLC, and DLCO) and radiologic results between these 2 groups of patients.

DISCUSSION

The main result of our study showed that alveolar NO production was related to serum-induced PFP and myofibroblast conversion, linking active alveolitis process to cell proliferation and lung fibrosis in patients with SSc. It was also found that serum-induced lung fibroblast proliferation and its conversion to myofibroblast phenotype was significantly greater in patients with SSc than in healthy controls. Among patients with SSc, PFP index and its myofibroblast conversion were significantly increased in patients with SSc at an early stage of the disease (≤ 4 years). However, this proliferative activity of the serum could be predicted only by the levels of C_ANO, and not by the form of the disease (limited vs diffuse), modified Rodnan skin score, or lung function impairment, reflecting the extent of fibrosis independent of the levels of lung inflammation.

The lung fibroblasts taken from the fibrotic lungs of patients with SSc have a constitutively activated myofibroblast-like phenotype⁴. Fibroblast activation is a key event in the development of fibrosis. However, it is difficult to noninvasively assess the activity of the lung fibrosis process in clinical management of SSc lung disease. It has been reported that several soluble molecules including cytokines²⁶, chemokines²⁷, autoantibody⁹, and low molecular weight peptides²⁸ are involved in various pathways leading to lung fibrosis. Indeed, studies have demonstrated the humoral mediated biological effect on mice fibroblasts or dermal fibroblast strains9,16. One of those studies showed that fibroblasts stimulated in vitro by cytokines such as interferon- γ , interleukin 1 β , and tumor necrosis factor- α increased proliferation rates, expressed highly inducible NOS, and therefore produced a great amount of NO¹⁰. Other reports using serum from patients with SSc to stimulate murine and human dermal fibroblasts implicated advanced oxidation protein products that triggered intracellular oxidative stress to increase fibroblast proliferation¹⁶. Recently, Baroni, et al discovered stimulatory antiplatelet-derived growth factor-receptor (PDGFR) antibody in serum from patients with SSc that could induce extracellular matrix production and cause phenotypic changes of normal fibroblasts⁹. Anti-PDGFR antibodies contained in the serum of some patients with SSc could induce fibroblast proliferation,

Table 3. Followup time, alveolar concentration of nitric oxide, fibroblast proliferation index, initial PFT, and radiologic results from patients with systemic sclerosis with decline in and stable lung function. Data at entry were given as median (first and third quartiles).

Clinical Data	SSc Patients with Decline in Lung Function, $n = 10$	SSc Patients with Stable Lung Function, n = 27	р
Followup, mo	27 (15.3–36.8)	24 (20-34.5)	0.54
C _A NO, ppb	5.4 (3.8–11.5)	6.6 (3.6-8.9)	0.67
PFP index (optical density)	1.11 (0.93-1.24)	0.99 (0.87-1.22)	0.45
TLC (% of predicted)*	106 (75-110)	95 (81-110)	0.77
FVC (% of predicted)*	113 (80-120)	94 (75-108)	0.09
DLCO (% of predicted)*	66 (42-80)	67 (53–77)	0.98
ILD, n	4	12	0.99

 C_ANO : alveolar concentration of exhaled nitric oxide; PFP: pulmonary fibroblast proliferation; TLC: total lung capacity; FVC: forced vital capacity; DLCO: diffusing capacity of carbon monoxide; PFT: pulmonary function tests; ILD: interstitial lung disease. * Significant if p < 0.05.

Personal non-commercial use only. The Journal of Rheumatology Copyright © 2010. All rights reserved.

Hua-Huy, et al: CANO and fibroblasts in SSc

1685

Table 4. Relationship between fibroblast proliferation index and C_ANO adjusted for age and duration of disease.

	Fibroblast Proliferation Index (Optical Density)		
	$\beta \pm SE$	р	
CANO (by increased ppb)	0.428 ± 0.006	0.007	
Age (by increased yr)	-0.255 ± 0.002	0.17	
Duration of disease (by increased yr)	-0.022 ± 0.002	0.90	

CANO: alveolar concentration of exhaled nitric oxide.

myofibroblast conversion, and an increased reactive oxygen species (ROS) output by the Ha-Ras-ERK1/2 transduction signal. These data indicate a plausible link between NO and ROS output from fibroblast and its ability to proliferate and to transform into myofibroblast. We showed that serum from patients with SSc, especially those with a high level of C_ANO (> 4.3 ppb), could convert normal human lung fibroblasts to a myofibroblast-like phenotype.

Several serum factors can be responsible for the observed capacity of serum from patients with SSc who have high levels of C_ANO to induce lung fibroblast proliferation. The factors causing proliferation of lung fibroblast and its conversion to myofibroblast have not yet been identified but the presence of these factors in the serum was likely related to increased NO synthesis in the lungs of patients with SSc.

Our 2007 report showed a relationship between PFT measurements and CANO14. However, this relationship, although reaching statistical significance, was loose, suggesting that CANO is more a marker of lung inflammation that is currently present rather than a reflection of impaired lung function that results from abnormal repair processes in response to inflammation. In our current study, we showed that high CANO reflected not only the alveolar NO output but also the increased level of mediators or cytokines involved in profibrotic pathways. The release of these substances into the bloodstream has probably rendered the serum from patients with SSc capable of inducing myofibroblast transition. Impairment of PFT could not be predicted by the PFP index. Patients with high CANO and in the early stage of disease had a stronger PFP index (Table 4). These results suggest that serum from patients with SSc who have high levels of CANO had high potential to induce fibrosis. Further, CANO, which assessed the biological pathways involved in inflammation, would provide additional information on PFT measurements in order to better characterize features of SSc lung disease.

However, our study was not initially designed to assess the predictive value of the PFP index. For that purpose, more patients and a longer disease followup period are required. Further studies with larger populations are needed to establish the evidence linking elevated values of C_ANO to disease progression and/or the presence of subclinical alveolitis, and to confirm the predictive value of the PFP index and C_ANO on the decline of lung function in SSc. The levels of increased fibroblast proliferation induced by serum from patients with SSc compared to controls in our study were relatively lower than those reported elsewhere¹⁵. This discrepancy resulted essentially from different fibroblast cell lines and methods used to assess lung fibroblast proliferation as well as other cell culture measurements.

Our study was limited by the lack of direct evidence of alveolitis that could be documented by an invasive means such as BAL in patients with high levels of CANO. For ethical reasons, it was not possible to perform BAL in all patients with SSc, especially when the practical value of BAL fluid cell counts has been questioned, and its lack of predictive value for the response to treatment for patients with SSc²⁹ has been highlighted. Moreover, BAL could be normal in patients with well documented ILD, as shown by abnormal lung HRCT30. The meaning of increased CANO, which we assumed to reflect active alveolitis, should be investigated further. The negative relationship between DLCO and CANO could be linked to either increased thickness of alveolar membrane, impeding NO diffusion, or alveolar inflammation in SSc lung disease. No data are currently available showing concomitant measurement of CANO and lung diffusion of NO (DLNO). In SSc-associated ILD, the ratio of DLNO/DLCO recently reported by van der Lee, et al31 was slightly higher than that from patients with chronic obstructive pulmonary disease, suggesting that reduced NO diffusion across the alveolar membrane was unlikely to account for increased NO concentration in the alveolar space. On the other hand, it has been reported that increased fractional concentration of exhaled NO was related to alveolitis documented by BAL cell counts7. These data are consistent with the hypothesis that alveolar inflammation is likely the main factor causing increased CANO in patients with SSc.

Our study demonstrated that alveolar production of NO, a surrogate cause of lung inflammation, was related to pulmonary fibroblast proliferation and myofibroblast conversion induced by serum from patients with SSc. The underlying mechanisms linking active alveolitis to lung fibroblast proliferation remain to be further investigated.

REFERENCES

- Steen VD, Medsger TA Jr. Severe organ involvement in systemic sclerosis with diffuse scleroderma. Arthritis Rheum 2000; 43:2437-44.
- Jimenez SA, Derk CT. Following the molecular pathways toward an understanding of the pathogenesis of systemic sclerosis. Ann Intern Med 2004;140:37-50.
- Steen VD, Medsger TA. Changes in causes of death in systemic sclerosis, 1972-2002. Ann Rheum Dis 2007;66:940-4.
- Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. J Clin Invest 2007;117:557-67.
- Bouros D, Wells AU, Nicholson AG, Colby TV, Polychronopoulos V, Pantelidis P, et al. Histopathologic subsets of fibrosing alveolitis in patients with systemic sclerosis and their relationship to outcome. Am J Respir Crit Care Med 2002;165:1581-6.

The Journal of Rheumatology 2010; 37:8; doi:10.3899/jrheum.090915

Personal non-commercial use only. The Journal of Rheumatology Copyright © 2010. All rights reserved.

- Dinh-Xuan AT. Endothelial modulation of pulmonary vascular tone. Eur Respir J 1992;5:757-62.
- Paredi P, Kharitonov SA, Loukides S, Pantelidis P, du Bois RM, Barnes PJ. Exhaled nitric oxide is increased in active fibrosing alveolitis. Chest 1999;115:1352-6.
- Bryckaert M, Fontenay M, Liote F, Bellucci S, Carriou R, Tobelem G. Increased mitogenic activity of scleroderma serum: inhibitory effect of human recombinant interferon-gamma. Ann Rheum Dis 1994;53:776-9.
- Baroni SS, Santillo M, Bevilacqua F, Luchetti M, Spadoni T, Mancini M, et al. Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. N Engl J Med 2006;354:2667-76.
- Romanska HM, Polak JM, Coleman RA, James RS, Harmer DW, Allen JC, et al. iNOS gene upregulation is associated with the early proliferative response of human lung fibroblasts to cytokine stimulation. J Pathol 2002;197:372-9.
- Tiev KP, Le-Dong NN, Duong-Quy S, Hua-Huy T, Cabane J, Dinh-Xuan AT. Exhaled nitric oxide, but not serum nitrite and nitrate, is a marker of interstitial lung disease in systemic sclerosis. Nitric Oxide 2009;20:200-6.
- Fajac I, Kahan A, Menkes CJ, Dessanges JF, Dall'Ava-Santucci J, Dinh-Xuan AT. Increased nitric oxide in exhaled air in patients with systemic sclerosis. Clin Exp Rheumatol 1998;16:547-52.
- Moodley YP, Lalloo UG. Exhaled nitric oxide is elevated in patients with progressive systemic sclerosis without interstitial lung disease. Chest 2001;119:1449-54.
- Tiev KP, Cabane J, Aubourg F, Kettaneh A, Ziani M, Mouthon L, et al. Severity of scleroderma lung disease is related to alveolar concentration of nitric oxide. Eur Respir J 2007;30:26-30.
- Girgis RE, Gugnani MK, Abrams J, Mayes MD. Partitioning of alveolar and conducting airway nitric oxide in scleroderma lung disease. Am J Respir Crit Care Med 2002;165:1587-91.
- Servettaz A, Guilpain P, Goulvestre C, Chéreau C, Hercend C, Nicco C, et al. Radical oxygen species production induced by advanced oxidation protein products predicts clinical evolution and response to treatment in systemic sclerosis. Ann Rheum Dis 2007;66:1202-9.
- Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Arthritis Rheum 1980;23:581-90.
- LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA Jr, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. J Rheumatol 1988:15:202-5.
- Rolla G, Colagrande P, Scappaticci E, Chiavassa G, Dutto L, Cannizzo S, et al. Exhaled nitric oxide in systemic sclerosis: relationships with lung involvement and pulmonary hypertension. J Rheumatol 2000;27:1693-8.

- ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. Am J Respir Crit Care Med 2005;171:912-30.
- George SC, Hogman M, Permutt S, Silkoff PE. Modeling pulmonary nitric oxide exchange. J Appl Physiol 2004;96:831-9.
- Tsoukias NM, George SC. A two-compartment model of pulmonary nitric oxide exchange dynamics. J Appl Physiol 1998;85:653-66.
- Tiev KP, Coste J, Ziani M, Aubourg F, Cabane J, Dinh-Xuan AT. Diagnostic value of exhaled nitric oxide to detect interstitial lung disease in systemic sclerosis. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis 2009;26:32-8.
- Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, et al. Standardisation of spirometry. Eur Respir J 2005;26:319-38.
- Mimura Y, Ihn H, Jinnin M, Asano Y, Yamane K, Tamaki K. Constitutive phosphorylation of focal adhesion kinase is involved in the myofibroblast differentiation of scleroderma fibroblasts. J Invest Dermatol 2005:124:886-92.
- Jinnin M, Ihn H, Mimura Y, Asano Y, Yamane K, Tamaki K. Effects of hepatocyte growth factor on the expression of type I collagen and matrix metalloproteinase-1 in normal and scleroderma dermal fibroblasts. J Invest Dermatol 2005;124:324-30.
- Wynn T. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. J Pathol 2008;214:199-210.
- Xiang Y, Matsui T, Matsuo K, Shimada K, Tohma S, Nakamura H, et al. Comprehensive investigation of disease-specific short peptides in sera from patients with systemic sclerosis: complement C3f-des-arginine, detected predominantly in systemic sclerosis sera, enhances proliferation of vascular endothelial cells. Arthritis Rheum 2007;56:2018-30.
- Strange C, Bolster MB, Roth MD, Silver RM, Theodore A, Goldin J, et al. Bronchoalveolar lavage and response to cyclophosphamide in scleroderma interstitial lung disease. Am J Respir Crit Care Med 2008;177:91-8.
- Clements PJ, Goldin JG, Kleerup EC, Furst DE, Elashoff RM, Tashkin DP, et al. Regional differences in bronchoalveolar lavage and thoracic high-resolution computed tomography results in dyspneic patients with systemic sclerosis. Arthritis Rheum 2004;50:1909-17.
- van der Lee I, Zanen P, Grutters JC, Snijder RJ, van den Bosch JM. Diffusing capacity for nitric oxide and carbon monoxide in patients with diffuse parenchymal lung disease and pulmonary arterial hypertension. Chest 2006;129:378-83.

Article 2

TIEV KP, **HUA-HUY T**, KETTANEH A, ALLANORE Y, LE-DONG NN, DUONG-QUY S, CABANE J, DINH-XUAN AT. Alveolar concentration of nitric oxide predicts the pulmonary function deterioration in scleroderma. **Thorax** 2011 Oct 24. [Epub ahead of print]. **PMID:22026971**

La C_ANO permet de prédire la détérioration de la fonction respiratoire des patients atteints de sclérodermie systémique

Etat de la question

La pneumopathie interstitielle diffuse (PID) est actuellement la principale cause de mortalité dans la sclérodermie systémique (ScS). La survenue de l'aggravation de la fibrose pulmonaire est un événement de mauvais pronostic, malheureusement imprévisible, qui marque un tournant dans l'évolution de la ScS. La perte des volumes pulmonaires entraîne une altération des échanges gazeux, augmente l'handicap fonctionnel lié à l'insuffisance respiratoire et conduit à moyen et long terme au décès. Notre hypothèse de travail est que la C_ANO , un marqueur non invasif de l'inflammation alvéolaire, pourrait estimer le risque de survenue d'une détérioration de la fonction pulmonaire et/ou de décès lié à la fibrose pulmonaire chez les patients atteints de ScS.

Matériels et méthodes

Nous avons inclus 105 patients atteints de ScS dans cette cohorte avec un suivi de plus de 3 ans. A l'inclusion, tous les patients ont eu une mesure de NO dans l'air expiré avec détermination de la concentration alvéolaire du NO (C_ANO), du débit bronchique maximal (J'_{aw}NO) et de la concentration fractionnaire du NO expiré à un débit de 50 ml/s ($F_ENO_{0,05}$). Les explorations fonctionnelles respiratoires, le scanner thoracique (TDM) et l'échocardiographie ont été réalisés tous les ans au cours des visites de suivi et à chaque fois que l'état clinique du patient justifiait cette mesure. Tous les patients ont été contactés par téléphone au bout de 3 mois pour vérifier la survie. L'évènement est un critère composite

défini soit par une diminution d'au moins 10% de la capacité pulmonaire totale (CPT) ou de la capacité vitale forcée (CVF) par rapport à la valeur de base, soit la survenue du décès.

Pour déterminer la capacité de prédiction de chacun des paramètres de la mesure du NO expiré, nous avons utilisé la méthode de la courbe ROC en considérant comme positif (cotation = 1) lorsque l'évènement est survenue dans les 3 ans de suivi. Nous avons donné une cotation = 0 dans le cas contraire. Pour déterminer le meilleur paramètre à prédire l'évènement à 3 ans, nous avons comparé les courbes ROC des différents paramètres entre elles (C_ANO , J'_{aw}NO et $F_ENO_{0,05}$) par la méthode de DeLong et coll. Par la même méthode, nous avons déterminé le seuil optimal en se basant sur l'index de Youden (somme maximale de sensibilité et spécificité). Nous avons utilisé la méthode de Kaplan Meier et Cox pour estimer le risque relatif du groupe des patients selon les seuils optimaux des différents paramètres de la mesure du NO expiré.

Résultats

L'aire sous la courbe de ROC (receiver operating curve) de la C_ANO pour la prédiction de la survenue d'évènements est de 0,84 (intervalle de confiance IC 95% : 0,76 – 0,92) qui est significativement plus élevée que celles du J'_{aw}NO et de la $F_ENO_{0,05}$ (p < 0,001). La valeur de C_ANO à 5,3 ppb correspond au seuil optimal (sensibilité: 88% et spécificité: 62%) pour la prédiction de la survenue de l'aggravation de la fibrose pulmonaire ou du décès pendant la période de suivi. Cette valeur « seuil », appliquée à une cohorte indépendante de 48 patients atteints de ScS, donne des résultats comparables, montrant la robustesse de la C_ANO dans la prédiction d'évènements au cours de l'évolution de la ScS. Les patients ayant une C_ANO supérieure à 5,3 ppb ont un risque élevé de voir survenir l'aggravation de la fibrose pulmonaire ou le décès par rapport à ceux qui ont une C_ANO inférieure ou égale à 5,3 ppb. Le Hazard ratio (HR) ajusté aux paramètres cliniques (âge, sexe, durée de la maladie), fonctionnelles (CVF, DLCO, hypertension pulmonaire) ou d'imagerie TDM thorax (présence de fibrose pulmonaire) était de 6,06 (IC 95% : 2,36 – 15,53; p<0.001).

La valeur de C_ANO à 8,5 ppb permet, quant à elle, de détecter les patients avec un risque de survenue d'évènement de 90% dans la population étudiée avec une sensibilité à 0,53

(IC 95% : 0,27 - 0,79) et une spécificité à 0,85 (IC 95% : 0,68 - 0,95). Les résultats similaires avec la valeur « seuil » de C_ANO à 8,5 ppb ont été retrouvés dans la cohorte indépendante testée de 48 patients.

Discussion

Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse selon laquelle l'inflammation alvéolaire joue un rôle primordial dans la progression de la fibrose pulmonaire liée à la ScS car le sérum de patients ayant une ScS avec une C_ANO élevée (\geq 4,3 ppb) est capable d'induire une prolifération et une activation des fibroblastes pulmonaires *in vitro*. La valeur prédictive de C_ANO est indépendante des autres paramètres cliniques (âge, sexe, durée de la maladie), fonctionnelles (CVF, DLCO, hypertension pulmonaire) ou d'imagerie (TDM avec scores de fibrose) comme attestée par l'analyse multivariée de Cox. Elle nous indique l'existence d'un (des) foyer(s) inflammatoire(s) actif(s) au niveau du poumon profond, dont l'accès par les examens invasifs habituels comme la fibroscopie bronchique avec lavage broncho-alvéolaire est difficile voire impossible.

Conclusion

L'augmentation de la C_ANO est un paramètre validé qui permet (1) d'identifier les patients atteints de ScS ayant un risque élevé de développer une aggravation ultérieure de la fonction respiratoire, et (2) d'instaurer plus précocement un traitement approprié.

ORIGINAL ARTICLE

Alveolar concentration of nitric oxide predicts pulmonary function deterioration in scleroderma

Kiet Phong Tiev,¹ Thong Hua-Huy,² Adrien Kettaneh,¹ Yannick Allanore,³ Nhat-Nam Le-Dong,² Sy Duong-Quy,² Jean Cabane,¹ Anh Tuan Dinh-Xuan²

ABSTRACT

¹Department of Internal Medicine, University Paris Pierre et Marie Curie, Saint Antoine Hospital, Paris, France ²Department of Physiology, University Paris Descartes, Cochin Hospital, Paris, France ³Department of Rheumatology A, University Paris Descartes, Cochin Hospital, Paris, France

Correspondence to

Professor Anh Tuan Dinh-Xuan, Department of Physiology, University Paris Descartes, Cochin Hospital, 27 rue du faubourg Saint-Jacques, 75679 Paris cedex 14, France; anh-tuan.dinh-xuan@cch.aphp. fr

Received 21 May 2011 Accepted 22 September 2011 **Background** Respiratory failure is a life-threatening and unpredictable complication of systemic sclerosis (SSc). A study was undertaken to assess the value of alveolar nitric oxide (NO) in predicting the risk of lung function deterioration leading to respiratory failure or death in patients with SSc.

Methods 105 patients with SSc were enrolled in this prospective cohort and were followed longitudinally over a 3-year period during which the risk of occurrence of deleterious events was analysed according to alveolar concentration (CANO), conducting airway output (J'awNO) and fractional concentration (FENO0.05) of exhaled NO measured at inclusion. Comparison was made between each NO parameter to predict the occurrence of deleterious events, defined as a 10% decrease in total lung capacity or forced vital capacity from baseline, or death. Results The area under the receiver operating characteristic curve of CANO to predict the occurrence of the combined events was 0.84 (95% CI 0.76 to 0.92; p<0.001), which was significantly higher than those of J'_{aw} No and $F_{E}NO_{0.05}$ (p<0.001). A cut-off of $C_{A}NO$ of 5.3 ppb had a sensitivity of 88% and a specificity of 62% for the prediction of the occurrence of combined events during follow-up, and was validated in an independent cohort of patients with SSc. Combined events occurred more frequently in patients whose C_{ANO} was >5.3 ppb. The adjusted HR for patients with $C_{ANO} > 5.3$ ppb was 6.06 (95% CI 2.36 to 15.53; p<0.001). CANO accurately predicted the occurrence of combined events irrespective of forced vital capacity values or the presence of interstitial lung disease at baseline.

Conclusions Increased C_{ANO} accurately identifies patients with SSc with a high risk of developing lung function deterioration and may help to initiate early appropriate treatment.

INTRODUCTION

Systemic sclerosis (SSc) is a connective tissue disease characterised by immune activation, vascular damage and fibrosis of various organs including the skin, gastrointestinal tract, kidneys and lungs.¹ Interstitial lung disease (ILD), an unpredictable and life-threatening condition that occurs in more than half of patients,² is the main cause of death in SSc.³ ILD related to SSc (SSc-ILD) gradually and irreversibly decreases lung volumes, impairs lung gas exchanges and reduces walking distance. As a result, quality of life and daily activities are markedly impaired in most patients, and death eventually

Key messages

What is the key question?

 Identification of progressive form of scleroderma lung disease by nitric oxide (NO) exhaled marker

What is the bottom line?

 Elevated Alveolar concentration of NO (C_ANO) is valuable marker in predicting the risk of subsequent lung function deterioration or death in patients with scleroderma.

Why read on?

 C_ANO cut-off is validated, as predictive marker of progressive form of scleroderma lung disease in an independent cohort, which allows clinician initiating appropriate treatment in early phase of disease.

occurs in those with the most severe form of the disease.² ⁴ Annual pulmonary function tests (PFTs) are recommended to detect lung function worsening, which is considered a critical turning point in the natural course of SSc-ILD.⁵

The current hypothesis regarding the pathogenesis of SSc-ILD suggests the occurrence(s) of pulmonary injuries initiated by unknown factor(s) followed by cryptic but sustained and incompletely resolved autoimmune alveolitis that eventually results in pulmonary fibrosis.6 Immunosuppressive agents only have minor beneficial effects to slow down the rate of lung function decline of patients with SSc in whom it is impossible to restore lung volumes to normal. There is an urgent need to find biomarkers capable of identifying patients whose lung function might deteriorate dramatically and rapidly and who will consequently benefit from timely and effective treatment.

Alveolar inflammation, which releases proinflammatory cytokines into the bloodstream and nitric oxide (NO) into the exhaled air, $^{9\,10}$ is the main monitoring option for ILD. NO, a key intercellular and intracellular mediator, is both a powerful endogenous vasodilator and a highly reactive biomarker of inflammation. In patients with SSc, inducible NO synthase is abundantly expressed in inflamed lung tissue, thus favouring excessive synthesis of NO and its resulting increased concentration in the exhaled air of patients with SSc-ILD.¹¹ Using a partitioned exhaled NO model¹² that splits

Exhaled markers

fractional exhaled NO (FENO) into airway conducting maximal NO output (J'awNO) and alveolar concentration of NO (CANO)reflecting the underlying bronchi and alveolar inflammation-we and others¹³ have previously shown that increased CANO levels are related to the importance of SSc-ILD in vivo¹⁴ and the ability of the serum from patients with SSc to induce fibrosis in vitro.¹ However, the relationship between exhaled NO output and subsequent occurrence of lung function deterioration or death has not yet been studied in patients with SSc. We hypothesised that partitioned measurement of exhaled NO, enabling assessment of fractioned exhaled NO at 50 ml/s of outflow ($F_{ENO_{0.05}}$) and calculation of J'_{aw} NO and C_A NO, might help to estimate the risk of developing subsequent lung function deterioration or death in patients with SSc. A prospective cohort study was therefore conducted to assess the predictive power of $F_{E}NO_{0.05}$, $J'_{aw}NO$ and CANO to predict lung function deterioration or death in patients with SSc.

METHODS

Study design

Enrolment was conducted from November 2004 to May 2007 in the Department of Internal Medicine, Hospital Saint Antoine, Paris, France, and the follow-up of this time to event driven study ended in May 2010.

Inclusion criteria

Patients were considered for inclusion if they were aged >18 years and had a diagnosis of $\rm SSc^{16}$ with diffuse or limited forms,17 the presence of ILD diagnosed by chest highresolution computed tomography (HRCT) and the presence of pulmonary hypertension (PH) ascertained by right heart catheterisation (RHC), irrespective of the level of forced vital capacity (FVC) and lung transfer factor for carbon monoxide (TLCO). Patients treated with corticosteroids and immunosuppressive agents were also eligible and recorded as presence of immunosuppressive therapy.

Exclusion criteria

Exclusion criteria were the presence of recent airway upper tract infection or pneumonia in the previous 3 months, the presence of lung cancer, asthma, allergic rhinitis, chronic obstructive pulmonary disease and treatment by NO donors. Patients who were unable to perform partitioned exhaled NO were also excluded.

Study design

At the start of the study, demographic data, duration of disease (delay between first symptom attributable to SSc and inclusion date), subset of SSc and history of smoking were recorded. All patients underwent extended NO analysis, PFTs, chest HRCT scanning and an echocardiogram. PFTs were routinely performed with a standard methodology and quality controls according to the American Thoracic Society and the European Respiratory Society (ATS/ERS) recommendations.18 ILD related to SSc was determined by the presence of reticular or ground glass changes extending at least to the venous confluence on the chest HRCT scan according to the ATS/ERS consensus¹⁹ and recorded as presence of ILD. Systolic pulmonary artery pressure was first estimated by echocardiography. All patients with >40 mm Hg subsequently underwent RHC. PH was confirmed as mean pulmonary artery $\ge 25 \text{ mm Hg}$ according to ATS/ERS consensus²⁰ and recorded as presence of PH.

Partitioned exhaled NO measurement

Briefly, fractional exhaled NO (FENO) was measured using a chemiluminescent analyser (EndoNO 8000, SERES, Aix-en-Provence, France) according to the ATS/ERS recommendations.²¹ After a full inspiration of room air, the subject exhaled against a positive pressure to generate exhalation flow rates (V'_E) of 50, 100, 150 and 200 ml/s. For each V'_E, the elimination rate of NO (V $_{\rm NO})$ was calculated as a function of V $_{\rm E}$ (V $_{\rm NO}$ = V $_{\rm E}$ \times F_{ENO}). At a flow rate of >50 ml/s, this relationship is linear and can be expressed as $V'_{NO} = V'_E \times F_{ENO} = C_{ANO} \times V'_E + J'_{awNO}$.¹²²² J'_{awNO} is the maximal conducting airway flux of NO.

Endpoint

The endpoint was the occurrence of combined deleterious events, defined as a 10% decrease in total lung capacity or FVC from baseline, or death.² Survival status was obtained from visits and telephone interviews. Patients not seen within 3 months were called to confirm their living status. Patients were evaluated by PFTs, chest HRCT and echocardiography annually (or earlier in an additional visit if symptoms required).

Confirmation study in an independent population

To validate the prediction power of extended NO analysis for lung function deterioration or death in SSc, we performed a confirmation study involving patients with SSc enrolled in the same inclusion protocol from September 2006 to September 2007 in the Department of Rheumatology (Cochin Hospital, Paris, France) and followed up over 3 years to determine the occurrence of combined events.

Statistical analysis

We first assessed the diagnostic performance of CANO, J'awNO and $F_{ENO_{0.05}}$ for identifying patients with SSc who were going to have subsequent worsening of their lung disease or were going to die within the 3 years after inclusion (positive if combined events occurred within 3 years of follow-up and negative if combined events did not occur) using receiver operating characteristic curves (ROC) analysis. We compared their performances with each other using the method described by DeLong et al.23

We next determined the threshold of the best parameter that was able to predict the subsequent occurrence of combined events in the 3 years after inclusion based on Youden's index (maximal sum of sensitivity + specificity). To ensure the relevance of the predicted cut-off of the extended NO analysis for subsequent lung function deterioration or death within 3 years after inclusion, a confirmation study was performed in an independent cohort of patients with SSc from Cochin Hospital (figure 1). Continuous and categorical variables were presented as mean±SD and percentages and were compared between groups by two-sample t tests and χ^2 tests, respectively.

We divided the studied population into two groups according to the best threshold to predict the subsequent occurrence of combined events of each exhaled NO parameter ($F_{ENO_{0.05}}$, J'_{awNO} and CANO) at baseline. To estimate the predictive value of exhaled NO parameters on lung function outcomes during the whole follow-up period, cumulative risks were computed by Kaplan-Meier analysis. ORs for lung function deterioration over time according to NO measurements were estimated by the Cox proportional hazard model. For all parameters, the conformity with the proportional hazards assumption was tested by linear regression of Schoenfeld residuals on the time variable in

Figure 1 Details of enrolment and flow of patients through study. C_{ANO} , alveolar concentration of nitric oxide.



observations with event=1. For categorical parameters, the conformity with the proportional hazards assumption was verified graphically in addition to construction of Kaplan–Meier curves. Only parameters fulfilling the proportional hazards assumption were used in the Cox analysis.

We first conducted unadjusted Cox analyses according to each baseline characteristic separately. In these models, NO variables were set as continuous variables. For any NO variable significant in this procedure, an additional unadjusted model was performed with a categorical two-level NO variable according to the corresponding optimal threshold in ROC curves. A multivariable Cox model further adjusted the categorical NO variable for age, FVC, TLCO and duration of disease as continuous variables and gender, smoking status, form of disease, the presence of ILD, PH diagnosed by RHC and immunosuppressive therapy as categorical variables.

We then assessed the relationship between change in FVC and variation of exhaled NO parameters between baseline and the last visit using a linear regression model. All tests were two-sided with a significance level of 5%. All analyses were performed with STATA Statistical Software Release 10 (Stata Corporation, College Station, Texas, USA).

RESULTS

Baseline characteristics of population

One hundred and nine patients with SSc were eligible for this prospective study. Four patients were excluded (two with pneumonia, one with bronchitis and one with sigmoiditis; figure 1). One hundred and five patients were therefore consecutively included in the study (table 1).

The mean age of the patients at inclusion was 54.8 ± 12.9 years and 13 (12.4%) were men. One-third of the patients had the diffuse form of SSc and half of the patients had ILD. Seventeen of the 105 patients (16.2%) took immunosuppressive agents (cyclophosphamide, n=1; mycophenolate mofetil, n=1; corticosteroids, n=15). After a mean follow-up of 36.3 ± 17.2 months, five patients with SSc died from end-stage lung fibrosis, 34 had lung function deterioration, 66 were censored and no patient was lost to follow-up. The composite events, defined as death or a decrease of 10% in total lung capacity or FVC, occurred in 39 patients (37%). Three new cases of ILD were diagnosed by chest HRCT during the follow-up period.

Table 1	Baseline ch	aracteristics	of studied	population	and	population
for externa	al validation	of CANO three	eshold			

	All SSc patients	SSc population for validation	
	(n=105)	(n=48)	p Value
Demographics			
Age, years	54.8±12.9	56.1±12.7	0.564
Men	13 (12.4)	10 (20.8)	0.174
Smoking status			
Never smoking	83 (79.0)	47 (97.9)	0.005
Ex-smoker	12 (10.5)	0 (0)	0.030
Current smoker	10 (9.5)	1 (2.1)	0.181
Systemic sclerosis			
Duration of disease (years)	11.4±11.6	7.9±5.8	0.014
Diffuse SSc	35 (33.3)	18 (37.5)	0.615
Lung disease			
Presence of ILD	51 (48.6)	23 (47.9)	0.940
FVC (%)*	97±23	98±22	0.809
TLCO (%)*	63±17	61±19	0.583
Pulmonary hypertension†	6 (5.7)	1 (2.1)	0.564
Treatment			
Immunosuppressive therapy	17 (16.2)	13 (27.1)	0.105
Partitioned exhaled nitric oxide			
CAND (ppb)	6.9 ± 5.5	7.2±5.7	0.814
J' _{aw} no (ml/min)	29.0±20.4	30.8±10.3	0.695
F _{EN00.05} (ppb)	16.6±12.1	17.4±10.3	0.663

Values are n (%) or mean±SD.

p Value significant if <0.05. *Proportion of predicted value.

+ Pulmonary hypertension measured by right heart catheterisation.

 \hat{C}_{AN0} , alveolar concentration of nitric oxide; TLCo, carbon monoxide transfer factor; $F_{EN0,005}$, fractioned exhaled nitric oxide at 50 ml/min of outflow; FVC, forced vital capacity; ILD, interstitial lung disease; J'_{aw} No, conducting airway maximal nitric oxide output; ppb, parts per billion; SSc, systemic sclerosis.

Exhaled markers

Figure 2 Performance of alveolar concentration of nitric oxide (CANO), conducting airways output of nitric oxide (J'awNO) and fractional exhaled concentration of nitric oxide at 50 ml/ min of outflow ($F_{ENO_{0.05}}$) for predicting lung function deterioration or death 3 years after inclusion in the study. The black line represents the receiver operating characteristic (ROC) curve of CANO with an area under the curve of 0.84 (95% CI 0.76 to 0.92; p<0.001), the grey line represents the ROC curve of FENO0.05 with an area under the curve of 0.64 (95% CI 0.53 to 0.75; p=0.007) and the dotted grey line represents J'_{awNO} with an area under the curve of 0.52 (95% CI 0.40 to 0.64; p=0.194). The difference between the three areas under the ROC curves was statistically significantly (p<0.001).



A comparison of the characteristics of the studied population and those of the population used for external validation is shown in table 1 and figure 1. At baseline the mean duration of disease and the rate of smokers were higher in the study group of patients than in the external validation group of patients with SSc.

Prediction power of FENO0.05, J'awNo and CANO for occurrence of combined events during 3 years after start of study

The area under the ROC curve (AUROC) of $F_{ENO_{0.057}} J^{'}_{\rm awNO}$ and CANO for prediction of occurrence of combined events during the 3 years after inclusion in the study were significantly different from one another (p<0.001, figure 2). The AUROC of C_{ANO} for predicting the occurrence of combined events was 0.84 (95% CI 0.76 to 0.92; p<0.001) while the AUROC of $F_{E}\text{NO}_{0.05}$ was significantly lower (0.64, 95% CI 0.53 to 0.75; p=0.007). In contrast, J'awNO had no value for predicting the occurrence of combined events (AUROC=0.52, 95% CI 0.40 to 0.64; p=0.194). Moreover, the AUROC curve of CANO for predicting the occurrence of combined events during the 3 years after inclusion in patients from Cochin Hospital (0.83 (95% CI 0.75 to 0.92); p<0.001) was comparable with that in patients from Saint Antoine Hospital. Among the exhaled NO parameters, CANO had the best performance power. We therefore determined the best cut-off of CANO for predicting the combined events during the 3 years after inclusion and compared the risk of developing worsening lung function or dying during the whole follow-up with patients with SSc with CANO higher than this latter cut-off and the remaining patients.

Threshold of CANO to identify patients with SSc at risk of deterioration of lung disease or death during the 3 years after inclusion

The best cut-off of CANO for identifying deterioration in lung disease within 3 years was 5.3 ppb (95% CI 3.4 to 7.4). The sensitivity (Se), specificity (Sp), positive and negative predictive

values (PPV and NPV) were 0.88 (95% CI 0.74 to 0.96), 0.62 (95% CI 0.49 to 0.74), 0.61 (95% CI 0.47 to 0.73) and 0.89 (95% CI 0.75 to 0.96), respectively compared with values of Se, Sp, PPV and NPV were 0.80 (95% CI 0.52 to 0.96), 0.61 (95% CI 0.42 to 0.77), 0.50 (95% CI 0.27 to 0.69) and 0.87 (95% CI 0.66 to 0.80), respectively, in the validation population. Se and Sp obtained in the validation study with 5.3 ppb as cut-off were very close to

Table 2	Unadjus	ted Cox	HRs for	deterioration	in lung	g function	over
time acco	rding to	each ba	seline c	haracteristic			

		n Volue
	(95% 61)	p value
Demographics		
Age (as continuous variable, per year)	1.02 (0.99 to 1.05)	0.142
Men*	1.96 (0.90 to 4.26)	0.089
History of smoking*	0.70 (0.27 to 1.79)	0.451
Systemic sclerosis		
Diffuse form of SSc*	2.56 (1.35 to 4.76)	0.011
Duration of disease (as continuous variable, per year)	1.00 (0.97 to 1.03)	0.843
Lung disease		
Presence of ILD*	3.52 (1.75 to 7.08)	0.001
TLCO (as continuous variable, per %†)	0.96 (0.94 to 0.98)	< 0.001
FVC (as continuous variable, per %†)	0.98 (0.96 to 0.99)	0.005
Presence of pulmonary hypertension*	1.32 (0.40 to 4.28)	0.651
Treatment		
Immunosuppressive treatment*	2.32 (1.15 to 4.67)	0.024
Exhaled nitric oxide		
F _{EN00.05} (as continuous variable, per ppb)	1.02 (1.00 to 1.03)	0.061
CAND (as continuous variable, per ppb)	1.06 (1.03 to 1.09)	< 0.001
SSc patients with $C_A NO > 5.3 \text{ ppb}^*$	6.80 (2.84 to 16.26)	< 0.001
J ['] awNO (as continuous variable, ml/min)	1.00 (0.99 to 1.01)	0.762

*As categorical variable

+ Proportion of predicted value

CANO, alveolar concentration of nitric oxide; TLCO, carbon monoxide transfer factor; FENODOR fractioned exhaled nitric oxide at 50 ml/min of outflow; FVC, forced vital capacity; ILD, interstitial lung disease; J'_{aw} No, conducting airways nitric oxide output; PAP, pulmonary artery pressure assessed by echocardiogrphy; ppb, parts per billion; SSc, systemic sclerosis.

those observed in the studied population, confirming the robustness of C_{ANO} as a predictor of deteriorating lung function or death occurring during the 3 years after inclusion. The C_{ANO} threshold with 90% specificity for identifying subsequent deterioration of lung disease within 3 years was 8.5 ppb. Se and Sp obtained in the validation study with 8.5 ppb (Se=0.53, 95% CI 0.27 to 0.79; Sp=0.85, 95% CI 0.68 to 0.95) were also very close to those observed in the studied population (Se=0.56, 95% CI 0.40 to 0.72; Sp=0.91, 95% CI 0.81 to 0.96).

Association between $C_{A^{N0}},\ F_{E^{N0}0.05}$ and $J^{'}_{aw^{N0}}$ at baseline and subsequent deterioration in lung function or death in patients with SSc

In an unadjusted Cox model, C_ANo had a predictive value for the occurrence of combined events (p<0.001) but $F_{ENO_{0.05}}$ (p=0.061) and $J^{'}_{\rm avv}$ NO (p=0.762) did not (table 2).

In the Cox proportional hazards model adjusted for age, gender, smoking status, form of disease, duration of disease, presence of ILD, FVC, TLCO, presence of PH diagnosed by RHC and immunosuppressive therapy, patients with $C_{ANO} > 5.3$ ppb had a higher risk of subsequent occurrence of combined events (HR 6.06, 95% CI 2.36 to 15.53; p<0.001). The adjusted HR for subsequent combined event occurrence in patients with $C_{ANO} > 8.5$ ppb was 3.06 (95% CI 1.43 to 6.55; p=0.004).

Although the level of TLCO might in theory affect C_ANO values, it had a low impact on the ability of C_ANO to predict lung function deterioration or death related to lung fibrosis. Indeed, C_ANO was still an accurate predictive factor for the combined event in both patients with TLCO <60% of the predicted value and those with TLCO <60% of the predicted value. In patients with SSc with TLCO <60% of the predicted value the HR was 17.35 (95% CI 2.25 to 113.96; p=0.006) compared with 4.06 (95% CI 1.44 to 11.43; p=0.008) in those with TLCO <60% of the predicted value. The difference between patients with TLCO <60% of the predicted value was not significantly different (p=0.074).

Relationship between variation in C_{ANO} level and change in FVC After adjustment for FVC at baseline, FVC at the follow-up visit was related to C_{ANO} at baseline ($\beta \pm SE - 0.022 \pm 0.007$, p=0.004) but not to its change (C_{ANO} at inclusion minus that at the follow-up visit; $\beta \pm SE - 0.003 \pm 0.004$, p=0.450).

DISCUSSION

In this prospective study which assessed various exhaled NO parameters, we found that C_{ANO} , a marker of alveolar inflammation, was able to predict subsequent lung function deterioration or death in patients with SSc (HR=6.06) with a C_{ANO} cut-off at 5.3 ppb. A C_{ANO} cut-off at 8.5 ppb allowed the identification (with 90% specificity) of patients at high risk of deteriorating lung function who subsequently developed SSc-related ILD. This prediction power of elevated C_{ANO} was then validated in an independent cohort population (figure 3 and 4).

The results of this study are consistent with the hypothesis that alveolar inflammation plays an important role in the progression of pulmonary fibrosis leading to SSc-related ILD. They provide strong evidence linking alveolar inflammation (as reflected by high levels of C_{ANO}) with losses in lung volumes due to progression of lung fibrosis during the natural course of the disease. Other prediction factors such as chest HRCT and FVC can also accurately detect or assess the extent of lung fibrosis in patients with SSc^{24} ²⁵ and have a relevant predictive value. Thus, a subgroup of patients with SSc with a history of progressive lung disease testified by a large area of ILD on HRCT scanning or lung volume restriction were more likely to have progression of lung disease during long-term follow-up.⁴ ²⁴ These morphological abnormalities of the lung and impaired pulmonary volumes resulted from initial alveolar inflammation that could not be currently measured by lung HRCT or PFTs. In this study, CANO added relevant information on the activity of lung disease, irrespective of the presence of ILD or a decreased level of FVC that are currently used as accurate predictive markers in SSc.²⁴

Figure 3 Kaplan-Meier survival analysis grouped by baseline alveolar concentration of nitric oxide (CANO) according to the best cut-off to predict deterioration in lung function or death 3 years after inclusion in the study. The survival curves are from two different populations. The black lines represent patients with systemic sclerosis (SSc) from Saint Antoine Hospital (n=105) and the grey lines represent patients with SSc from Cochin Hospital for external validation (n=48). The continuous lines show the survival curves for patients with SSc with CANO \leq 5.3 ppb and the broken lines represent patients with SSc with CANO >5.3 ppb. Patients with SSc with CANO >5.3 ppb were more likely to develop lung function deterioration or death than other patients (log rank, p<0.001).



Tiev KP, Hua-Huy T, Kettaneh A, et al. Thorax (2011). doi:10.1136/thoraxjnl-2011-200499

Exhaled markers

Figure 4 Exhaled flow rate (V.) and nitric oxide exhaled flow rate (V_{NO}) from patients with systemic sclerosis (SSc). Extended NO analysis may be less accurate in low exhaled flow rate <50 ml/s due to axial back diffusion. Eight of 105 patients with SSc had a first V_E measurement of \leq 50 ml/s; exclusion of these eight patients from the analysis did not affect the prediction power of baseline alveolar concentration of nitric oxide (CANO) for subsequent lung function deterioration or death (adjusted HR 2.98, p=0.0003). Each square represents one exhaled flow rate measurement. Each patient had three or more exhalations against positive different pressures that enabled calculation of C_{AND} according to the model described by Tsoukias *et al.*¹² The triangles represent the mean V_E for exhalation against 50 ml/s, 100 ml/s and 150 ml/s; the majority of patients with SSc cannot maintain a stable VE against 200 ml/s.



Athough increased fractional exhaled NO is seen in patients with active alveolitis, documented by bronchoalveolar lavage cells count,²⁶ and also in those without ILD-SSc,²⁷ fractional exhaled NO was related to the severity of scleroderma lung disease.¹⁴ Assessing the locoregional NO output enables us to measure more precisely deep lung inflammation. Previous cross-sectional studies by our group have shown that C_ANO is increased in patients with SSc compared with controls¹⁴ ²⁸ and is higher in SSc patients with ILD than in patients without ILD.¹⁴ Moreover, C_ANO is directly related to the presence of ILD on chest HRCT scanning,²⁹ probably due to as yet unknown biological mechanisms linking active alveolitis to cell proliferation and lung fibrosis in patients with SSc.¹⁵

Chest HRCT scanning and FVC are reliable tools for describing radiological abnormalities and lung volumes losses. Conversely, as increased NO synthesis directly results from inflammatory processes, C_{ANO} can accurately and specifically sense the presence of lung inflammation and quantify its importance, irrespective of the presence of lung fibrosis and its severity. It is therefore conceivable that high levels of C_{ANO} occur in some patients with lung inflammation but without ILD—for example, during the early course of their disease. Conversely, a patient with a long history of ILD can have normal levels of C_{ANO} during a quiescent phase of the disease when inflammatory processes are controlled or absent.

In this study the rate of progression in our patients was consistent with that reported in previous large cohort studies.⁴ The greater power of C_ANO to predict deteriorating lung function compared with F_ENO_{0.05} and J'_{aw}NO is probably due to the fact that alveolar inflammation (as measured by C_ANO) rather than inflammation of the proximal airways (as measured by F_ENO_{0.05} and J'_{aw}NO),^{30 31} plays an important role in the pathogenesis of pulmonary fibrosis in patients with SSc.

The optimal threshold of C_ANO allows us to demonstrate the relevance and the validation of C_ANO as an accurate predictor of subsequent deterioration in lung function or death in the course of SSc. The threshold of C_ANO , presently set at 8.5 ppb, might be useful to initiate treatments to prevent lung volume loss in

future randomised clinical trials or to treat alveolar inflammation in the hope of delaying the development of lung fibrosis. We have previously reported in cross-sectional studies that high CANO levels were associated with the presence of ILD on lung HRCT scans or the ability of the serum to induce myofibroblast transition.¹⁴ ²⁸ ²⁹ Indeed, ILD can be ruled out in patients with $C_A NO < 3.8 \text{ ppb}^{29}$ and increased $C_A NO$ is associated with a severe form of ILD in SSc.¹⁴ Moreover, the serum from patients with C_{ANO} >4.3 ppb was able to induce lung fibroblast proliferation and myofibroblast conversion. 15 These cut-offs were still relevant and added functional information on scleroderma lung disease at the time extended NO analysis was performed. In contrast to these previous thresholds, the present prospective cohort study reinforces the clinical usefulness of this measurement as CANO levels >8.5 ppb are strongly associated with the subsequent risk of lung function deterioration or death. External validation in an independent cohort of patients with SSc further reinforced the validity of this cut-off value.

In conclusion, our findings show that increased C_{ANO} is a noninvasive and valuable means of identifying patients with SSc at high risk of developing subsequent lung function deterioration or death, irrespective of the FVC level and the presence of ILD. This should allow clinicians to follow closely patients with progressive form and to initiate appropriate treatments in an early phase of disease.

Competing interests None.

Patient consent Obtained.

Ethics approval Ethics approval was provided by CPP IIe de France.

Contributors KPT, TH-H, AK, YA, N-NL-D, SD-Q, JC and ATD-X were responsible for data collection, data interpretation and preparation of the report. KPT and AK were responsible for data analysis. All authors contributed to critical revision of the report.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

REFERENCES

- Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. Scleroderma. N Engl J Med 2009;360:1989–2003.
- Steen VD, Corte C, Owens GR, et al. Severe restrictive lung disease in systemic sclerosis. Arthritis Rheum 1994;37:1283–9.

- Steen VD, Medsger TA. Changes in causes of death in systemic sclerosis, 3 1972-2002. Ann Rheum Dis 2007:66:940-4
- Assassi S, Sharif R, Lasky RE, et al; GENISOS Study Group. Predictors of interstitial 4 lung disease in early systemic sclerosis: a prospective longitudinal study of the GENISOS cohort. Arthritis Res Ther 2010;12:R166.
- 5. Wells AU, Behr J, Silver R. Outcome measures in the lung. Rheumatology 2008; 47:v48-50
- 6. Harrison NK, Myers AR, Corrin B, et al. Structural features of interstitial lung isease in systemic sclerosis. Am Rev Respir Dis 1991;144:706-13.
- Tashkin DP, Elashoff R, Clements PJ, et al; Scleroderma Lung Study Research 7 Group. Cyclophosphamide versus placebo in scleroderma lung disease. N Engl J Med 2006;354:2655-66.
- Tashkin DP. Elashoff R. Clements PJ, et al; Scleroderma Lung Study Research 8 Group. Effects of 1-year treatment with cyclophosphamide on outcomes at 2 years in scleroderma lung disease. Am J Respir Crit Care Med 2007;176:1026-34.
- Thannickal VJ, Toews GB, White ES, et al. Mechanisms of pulmonary fibrosis. Ann 9 Rev Med 2004;55:395-417.
- Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, et al. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev* 2004;84:731-65. 10.
- Fajac I, Kahan A, Menkes CJ, et al. Increased nitric oxide in exhaled air in patients 11.
- with systemic sclerosis. Clin Exp Rheumatol 1998; 6:547–52. Tsoukias NM, George SC. A two-compartment model of pulmonary nitric oxide exchange dynamics. J Appl Physiol 1998; 85:653–66. 12.
- Girgis RE, Gugnani MK, Abrams J, et al. Partitioning of alveolar and conducting airway nitric oxide in scleroderma lung disease. Am J Respir Crit Care Med 13. 2002:165:1587-91
- Tiev KP, Cabane J, Aubourg F, et al. Severity of scleroderma lung disease is related 14. to alveolar concentration of nitric oxide. Eur Respir J 2007;30:26-30.
- Hua-Huy T, Tiev KP, Chereau C, et al. Increased alveolar concentration of nitric oxide 15. is related to serum-induced lung fibroblast proliferation in patients with systemic sclerosis. J Rheumatol 2010;37:1680-7.
- Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association 16. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Arthritis Rheum 1980;23:581-90.
- 17 LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. J Rheumatol 1988;15:202-5.
- Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, et al; ATS/ERS Task Force. Standardisation of spirometry. Eur Respir J 2005;26:319–38.
 American Thoracic Society, European Respiratory Society. American 18. 19
- Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary

Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001. Am J Respir Crit Care Med 2002;165: 277-304.

- 20. McLaughlin VV, Archer SL, Badesch DB, et al. ACCF/AHA. ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension: a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association: developed in collaboration with the American College of Chest Physicians, American Thoracic Society, Inc., and the Pulmonary Hypertension Association. Circulation 2009;119:2250-94.
- 21. American Thoracic Society, European Respiratory Society. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. Am J Respir Crit Care Med 2005;171:912-30.
- George SC, Hogman M, Permutt S, et al. Modeling pulmonary nitric oxide exchange. 22 J Appl Physiol 2004;96:831-9.
- DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. 23. Biometrics 1988;44:837-45.
- Goh NS, Desai SR, Veeraraghavan S, et al. Interstitial lung disease in systemic sclerosis: a simple staging system. Am J Respir Crit Care Med 2008;177:1248-54. 24.
- Bouros D, Wells AU, Nicholson AG, et al. Histopathologic subsets of fibrosing 25 alveolitis in patients with systemic sclerosis and their relationship to outcome. Am J Respir Crit Care Med 2002;165:1581-6.
- Paredi P, Kharitonov SA, Loukides S, et al. Exhaled nitric oxide is increased in active 26. fibrosing alveolitis. Chest 1999:115:1352-6.
- 27. Moodley YP, Lalloo UG. Exhaled nitric oxide is elevated in patients with progressive systemic sclerosis without interstitial lung disease. Chest 2001;119:1449-54. Tiev KP, Le-Dong NN, Duong-Quy S, et al. Exhaled nitric oxide, but not serum nitrite
- 28. and nitrate, is a marker of interstitial lung disease in systemic sclerosis. Nitric Oxide 2009:20:200-6.
- Tiev KP, Coste J, Ziani M, et al. Diagnostic value of exhaled nitric oxide to detect 29. interstitial lung disease in systemic sclerosis. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis 2009:26:32-8
- Smith AD, Cowan JO, Brassett KP, et al. Use of exhaled nitric oxide measurements 30. to guide treatment in chronic asthma. N Engl J Med 2005;352:2163-73. Lehtimäki L, Kankaanranta H, Saarelainen S, et al. Extended exhaled NO
- 31 measurement differentiates between alveolar and bronchial inflammation. Am J Respir Crit Care Med 2001;163:1557-61.

Article 3

HUA-HUY T, LE-DONG NN, DUONG-QUY S, BEI Y, RIVIÈRE S, TIEV KP, NICCO C, DINH-XUAN AT. Increased exhaled nitric oxide as a biomarker of inflammation during the formation of lung fibrosis in a murine model of systemic sclerosis. **En cours de soumission.**

Cinétique de l'augmentation du NO expiré dans un modèle murin de sclérodermie systémique induite par l'acide hypochloreux (HOCl)

Etat de la question

La fibrose pulmonaire est une complication fréquente de la sclérodermie systémique (ScS) et représente la principale cause de morbidité de cette maladie. L'association entre l'augmentation du NO dans l'air expiré (F_ENO) et la sévérité de la fibrose pulmonaire au cours de la ScS est connue depuis plus de 15 ans. L'augmentation du NO expiré, marqueur non invasif de l'inflammation pulmonaire, peut être soit un phénomène concomitant, sans relation directe avec la fibrose, soit le reflet d'une inflammation alvéolaire, facteur favorisant et annonciateur de la fibrose pulmonaire. Pour mieux cerner la signification précise du NO expiré dans l'évolution de la fibrose pulmonaire, il est important de déterminer la relation entre l'évolution quotidienne de la production du NO et l'apparition de la fibrose pulmonaire ou cutanée.

Matériels et méthodes

Nous avons induit une fibrose pulmonaire expérimentale en faisant une injection quotidienne sous-cutanée de bléomycine et de l'acide hypochloreux (HOCl) à des lots de 20 souris. Les souris ayant reçu une injection sous-cutanée de PBS servent de groupe témoin. Suivant la première injection, nous procédons aux sacrifices de 5 souris par groupe tous les 15 jours. Avant sacrifice des souris, la F_ENO est évaluée chez chaque animal respirant de l'air dépourvu de NO dans une chambre de mesure individuelle par la méthode de

chimiluminescence. Après sacrifice, la quantité de collagène et l'expression des NOS sont évaluées dans les biopsies cutanées et pulmonaires. Le collagène est mesuré par colorimétrie quantitative. L'expression de NOS-2 et de NOS-3 est évaluée au niveau de l'épithélium bronchique, de l'endothélium vasculaire et du parenchyme alvéolaire par immuno-histochimie et Western-Blot. L'infiltration pulmonaire des polynucléaires neutrophiles (sc-71674) et l'expression de CD68, marquage spécifique de monocytes/macro-phages est révélée par immuno-histochimie.

Résultats

L'accumulation progressive du collagène dans les tissus pulmonaires et cutanés est significativement plus élevée chez les souris intoxiquées par l'HOCl ou la bléomycine par rapport au groupe d'animaux témoins (souris ayant reçu du PBS).

La fibrose pulmonaire commence à être visible 6 semaines après le début des injections avec la bléomycine et l'HOCl, et devient beaucoup plus nette à la 8^{ème} semaine dans les 2 modèles. La concentration élevée de NO dans l'air expiré des souris précède l'apparition de la fibrose pulmonaire. En effet, il existe une augmentation précoce du NO expiré dès la 2^{ème} semaine après le début des injections. L'augmentation du NO expiré est maximale à la 4^{ème} semaine et commence à décliner à partir de la 6^{ème} semaine. La NOS-2 est surexprimée dans les bronches et dans les alvéoles. Le pic de la concentration du NO expiré coïncide avec celui de l'expression alvéolaire de la NOS-2 à la 4^{ème} semaine après le début des injections et correspond à l'accumulation transitoire et fugace des polynucléaires neutrophiles dans les alvéoles. Cet infiltrat inflammatoire s'accompagne de la surexpression de la NOS-2 dans les alvéoles alors que les signes histologiques de la fibrose pulmonaire ne sont pas encore présents. En revanche, Il existe une diminution de l'expression de la NOS-3 au niveau des artérioles et capillaire pulmonaire au fur et à mesure que la fibrose pulmonaire progresse. La production de NO dans l'air expiré s'accompagne d'une accumulation de 3-nitrotyrosines dans le parenchyme pulmonaire.

Conclusion

Notre étude a permis l'évaluation concomitante du NO dans l'air expiré et l'expression tissulaire pulmonaire des NOS-2 et NOS-3, dans un modèle expérimental de fibrose pulmonaire. Nos résultats montrent que l'augmentation de la F_ENO est liée à l'augmentation de l'activité de la NOS-2 aussi bien au niveau des bronches qu'au niveau des alvéoles. Surtout, nos résultats montrent pour la première fois avec des données expérimentales tangibles que l'inflammation pulmonaire, quantifiée par la mesure non-invasive de la F_ENO , précède la fibrose pulmonaire. Enfin, la forte production de NO constatée provoque un effet délétère direct sur le tissu pulmonaire attesté par la présence de 3-nitrotyrosines, marqueurs du stress nitrosatif.

ARTICLE 3

Increased exhaled nitric oxide as a biomarker of inflammation during the formation of lung fibrosis in a murine model of systemic sclerosis

Nhat-Nam Le-Dong, MD MSc (1), Thong Hua-Huy, MD MSc (1), Sy Duong-Quy, MD PhD (1), Yi-Hua Bei , MD MSc (1), Sébastien Rivière, MD MSc (1), Kiet Phong Tiev, MD PhD (2), Carole Nicco, PhD (3), Anh Tuan Dinh-Xuan, MD PhD (1).

(1) Paris Descartes University, Department of Physiology, Cochin Hospital, 27 rue du Faubourg Saint-Jacques, 75679 Paris Cedex 14, France.

(2) University Paris Pierre et Marie Curie, Department of Internal Medicine, Saint Antoine Hospital, 184 rue du faubourg Saint Atoine, 75571 Paris Cedex 12, France

(3) Paris Descartes University, Laboratory of Immunology, Cochin Hospital, Paris, France.

ABSTRACT

Background: Exhaled nitric oxide (eNO) increased in patients with systemic sclerosis (SSc) and interstitial lung disease. Reactive oxygen species (ROS) and bleomycin induced skin and lung fibrosis in mice, mimicking the SSc in humans.

Objectives: This study aimed to validate eNO measurement method in mice and to study the evolution of lung inflammatory and fibrotic processes in mice injected with HOCI or bleomycin.

Methods: C57BL/6 mice were randomized into 3 groups receiving subcutaneous injections of HOCI, bleomycin, or PBS for 2, 4, or 6 weeks. Exhaled NO was measured at the end of each injection period and after 2 resting weeks without injection (8-week group). Mice were then sacrificed to obtain skin and lung tissues for NO synthases (NOS) expression analysis.

Results: Increased eNO, inducible NOS and 3-nitrotyrosine expression in bronchial epithelium, lung neutrophils and macrophages were observed at early phases in HOCI and bleomycin mice. Inversely, lung vascular endothelial NOS expression decreased significantly at 6th and 8th week. Skin fibrosis was significantly increased from the 4th week and lung fibrosis from 6th week.

Conclusions: Exhaled NO can be used as a sensitive biomarker of lung inflammation in these murine models in which inflammation precede fibrotic processes in skin and lungs. Mechanisms linking inflammation and fibrosis remain to be clarified.

KEYWORDS: Systemic sclerosis, interstitial lung disease, exhaled nitric oxide, Oxidative stress.

Correspondence: Anh Tuan Dinh-Xuan, MD, PhD: Phone and Fax: 33 (1) 49 28 21 48

e-mail: anh-tuan.dinh-xuan@cch.aphp.fr

Introduction

Systemic sclerosis is a connective tissue disease characterized by vascular injuries, immunologic abnormalities and overproduction of collagens leading to dysfunction of internal organs. Despite the advanced findings on the cellular and molecular mechanisms of SSc in recent years, a complete understanding about physiopathology of SSc has not yet been reached (1). Studying of SSc pathology in human is usually limited by the heterogeneity and overlapping events, while the cell culture could only focus on some isolated factors but not satisfactory to bring out a clear information about the relation and hierarchy of them. Alternative approaches using animal models could help to study the disease at integrated and systemic levels. Several studies reported that reactive oxygen species (ROS) might be implicated in the pathogenesis of SSc (2-9).

Repeated injections of hypochlorous acid, a product of neutrophil burst, in mouse induced skin and lung fibrosis as well as anti-DNA topoisomerase 1 antibody secretion, mimicking the diffuse form of SSc in humans. This animal model, recently developed by Batteux et al. (9,10) provided strong evidences about the triggering role of ROS in SSc. However, pulmonary inflammation and nitrosative stress burdens have not yet been studied in this model.

Nitric oxide (NO) is an active and dynamic mediator, endogenously produced by enzymes NO synthases (NOS) which exists in 3 isoforms (11). The constitutive NOS (neuronal and endothelial NOS) are calcium-dependent and produce a basic level of NO while the inducible NOS is calcium-insensitive and activated by pro-inflammatory cytokines to secret a large amount of NO that can be highly toxic to the tissues. Although the role of NO in physiopathology of SSc has not yet been fully known, the exhaled NO has been suggested to be a surrogate marker that reflects the severity of lung inflammation with increased iNOS expression, and endothelial dysfunction with decreased eNOS expression during the early phase of the disease (12). However, this biomarker has never been examined in these animal models of SSc, lacking evidence about the possible link between the immunological events and the abnormalities in collagen production.

In this study, we measured the exhaled NO in two models of SSc induced by bleomycin and HOCl, as previously described, to determine the presence of pulmonary inflammation and possible relations in different time points between the NOS expressions, especially inducible isoform, and the excessive production of collagens in the lung.

Methods

Animals: Pathogen-free, 6-week old, female C57BL/6 mice (17-20 grams) were purchased from Harlan (Gannat, France). Mice were housed in autoclaved cages in isolated environment with ad libitum access to food and water and 12-hour dark/light cycles. They were given human cares according to the guidelines of our institution.

Antibodies and chemicals: All chemicals were from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France) except bleomycin (Bellon Laboratories), rabbit anti-nNOS, anti-iNOS and anti-eNOS antibodies (BD Transduction Laboratories), rabbit anti-α-SMA, anti-β-actin, anti-neutrophil, anti-macrophage antibodies, goat anti-rabbit IgG -HRP (Santa Cruz), and biotinylated goat anti-rabbit IgG antibody (Vector Laboratories Inc., Burlingham, USA).

Experimental protocol: Mice were randomly divided into 3 groups (n = 20 mice/group) and were submitted to daily subcutaneous injections of PBS (P), HOCI (H), or bleomycin (B) into the shaved back, using 27-gauge needles and 1-mL syringes.

HOCl generating solution and bleomycin (100µg/ml) were prepared extemporaneously as previously described (9). Control groups received injections of 100µL of sterilized PBS.

In order to assess the kinetics of inflammation and fibrosis, we injected three groups of mice for 2, 4, and 6 weeks. Mice were sacrificed at 2 weeks (2w), 4 weeks (4w), 6 weeks (6w), and 2 weeks after 6 weeks of injection (8w) as presented in the figure 1.

On the day of sacrifice, exhaled NO was measured and mice were then euthanized with Avertin (2, 2, 2-Tribromoethanol, 250mg/kg IP). After a median sternotomy and blood removing by right ventricular puncture, lungs were resected in a whole block. Lung tissues were frozen immediately in liquid nitrogen and then stored at -80°C. Left lungs were used for collagen content measurement, right lungs for protein and mRNA extraction (n = 5) or fixed in 10% neutral buffered formalin for paraffin-embedded blocks (n = 5). Skin biopsy was taken in the shaved back (sites of injection) by 8-mm diameter cutter, and submitted to digestion for collagen determination.

Exhaled nitric oxide measurement: Exhaled nitric oxide in mice was measured using a chemiluminescence NO analyzer (Sievers 280 NOATM, Sievers Instruments Inc., Boulder, CO, USA) with an online measurement method as previously described 1,2. The detection limit of the NO analyzer was 0.1 parts per billion (ppb) with linear relationship over the range from 0.1 ppb to 500 ppb. The sampling rate was set at 200 ml/min and the response time was 0.25 sec. We used a 300-mL Plexiglass chamber connected to a 2 unidirectional valves system (Figure) that could be flushed with NO-free air from filter according to the manufacturer's recommendations (Analytix Ltd, Boldon, UK).

The analyzer was daily calibrated with 2-point calibration protocol using this NO-free filtered air and a standard 100-ppb NO tank certified by Air Liquide Santé (France).



Figure 1: Chronologic schema of experimental procedure in mice

Exhaled NO: exhaled nitric oxide (ppb), measured by chemiluminescence after spontaneous respiration of individual mouse in an airtight chamber (300mL) during 10 minutes. Mice were randomised into 3 groups injected with PBS, HOCI, or bleomycin. W: week .



Figure 2: The schematic system of exhaled NO measurement in mice

The animal was placed in the Chamber of Measurement (1) continuously flushed with NO-free air by a two unidirectional valves system (2) to set baseline NO levels in the chamber (< 0.2 ppb). Exhaled NO produced by the mouse was then recorded through the sampling system connecting the top of the chamber to the NO analyzer (3).

Briefly, these 4 steps were strictly followed for every measurement of murine exhaled NO:

 The mouse was placed individually into the Plexiglas chamber and was allowed to rest for 5 minutes to accommodate with the chamber's environment.

2) The chamber with the mouse in it was then flushed with NOfree air via a rodent ventilator (Harvard, USA) set to a flow rate of 800mL/min (Vt: 5mL; respiratory rate 160/min) until the level of NO concentration in the chamber reached zero (NO < 0.2 ppb) to set the baseline NO level.

3) The chamber with the mouse was then closed for 10 minutes during this time exhaled NO production from the mouse was accumulated inside the airtight chamber. To make sure that mice were not exposed to hypoxia and/or hypercapnia, we conducted an experiment with the same time period and measured O2 and CO2 concentrations in the chamber by an offline method using blood gas analyzer (Radiometer S.A.S., France). We found that CO2 fraction was consistently less than 47 mmHg (37.7 \pm 3.7) and O2 fraction more than 86 mmHg (100.5 \pm 6.9) (data from 6 control mice).

4) After 10 minutes, exhaled NO recording was started and continuously maintained for 20 seconds, until a stable plateau of NO was obtained for at least 5 seconds. Values of this plateau were then recorded to calculate mean value of exhaled NO (ppb). We noted a relatively small range (max – min) of exhaled NO used as an internal control quality (≤ 0.5 ppb and < 10% of the mean). Finally, the mean of two measurement values was reported.

Measurement of dermal thickness

Before the first injection and at the day of sacrifice (at 2, 4, 6, and 8 weeks), skin thickness at injection zone was measured with a calliper and expressed in millimetres by the same investigator.

Histopathologic analysis

Right lungs (n = 5/group) in paraffin-embedded blocks were cut into 5 μ m-sections and stained with haematoxylin eosin, Picro-Sirius red and Masson's trichrom methods. Slides were examined by a light microscope (Leica DC300, LeicaMicrosystems, Wetzlar, Germany).

Collagen content determination in skin and lung

Skin taken from injection sites and left lung were thawed, diced using a sharp scalpel, put into aseptic tubes, and mixed with pepsin (1:10 weight ratio) and 0.5 M acetic acid at room temperature under stirring for one week until total digestion of small pieces. Collagen content assay was based on the quantitative dye -binding Sircol method (Biocolor, Belfast, Ireland) as previously described (9). Briefly, the solutions were centrifuged at 1,200g for 10 minutes at 4°C. Then, 20 µL (for skin) or 200 µL (for lung) of each sample were added to 1.0 mL of Sirius red reagent in a microtube. Tubes were rocked at room temperature for 30 minutes and centrifuged at 20,000g for 30 minutes at 4°C. Supernatants were discarded and 1.0 mL of NaOH 0.5M was added to collagen pellets, then shacked until complete dilution. Concentration values were read at 540 nm on a microreader versus a standard range of bovine collagen type I concentrations. Results were presented as µg of collagen/mg of fresh tissues (skin or lung).

Western Blot

Frozen lung samples (50-60mg/animal) were homogenized in icecold RIPA buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na2EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β glycerophosphate, 1 mM Na3VO4, 1 µg/ml leupeptin, 1 mM PMSF, and a protease inhibitors cocktail tablet (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Lung homogenates were then centrifuged at 15,000rpm at 4°C for 20 minutes and supernatants were aliquoted into aseptic microtubes. Protein concentrations were measured using a BCA Protein assay kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA).

For nNOS, iNOS and eNOS Western Blot, equal amounts of lysates (50mg of total protein) were subjected to electrophoresis on 4%-7.5% SDS-PAGE gels, then transferred to PVDF membranes (Immobilon-P, Millipore, MA, USA). For alpha-SMA, 15µg of total protein was used for each sample and electrophoresis was conducted on 5%-10% SDS-PAGE gels. Membranes were blocked in 5% non-fat milk, in PBS-T (0.1% Tween-20) for 1 hour at room temperature (RT). Membranes were cut at the level of 80kDa: upper membranes for NOSs detection (nNOS: 160 kDa, iNOS: 130 kDa, and eNOS: 140 kDa) and lower membranes for β -actin (42 kDa). Membranes were then hybridized overnight at 4° C with rabbit anti-nNOS, anti-iNOS, and anti-eNOS diluted at 1:500 or with rabbit anti-β-actin (1:10.000) in blocking solution. On the next day, membranes were washed 3 times with PBS-T and then incubated with HRP-linked goat anti-rabbit, diluted at 1:20.000 at RT. Protein bands were developed on Hyperfilm (Amersham) using ECL Plus reagent (Amersham) and quantified using Image Software System (Genius 2). Equal amounts of proteins loaded per well were normalised by β-actin. Results were expressed as ratios of NO synthases/β-actin.

Immunohistochemistry

For localization of NO synthases isoforms, lung sections were deparaffinised and rehydrated by serial immersions in xylene, decreasing concentrations of ethanol solutions, and distilled water. Endogenous peroxidase activity was reduced by immersion slides in 0.3% hydrogen peroxide in methanol for 30 minutes. Antigen epitopes were unmasked using 10 mM sodium citrate (pH 6.0) heated at 100°C for 10 minutes, followed by washing with PBS-Tween 20 0.05% (PBS-T) at RT. Sections were then covered in blocking solution (2% BSA in PBS-T) for 60 minutes and then incubated with primary antibody (rabbit anti-iNOS, antieNOS, anti-nitrotyrosine antibodies) diluted at 1:50 in PBS-T overnight at 4°C. On the next day, sections were washed in PBS-T and incubated with secondary antibody diluted at 1:200 in PBS-T for 60 minutes, followed by washing and incubation with Biotin-Streptavidin enzymes using the Vectastain Elite ABC Kit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) for 30 minutes. After washing with PBS-T, sections were developed with diaminobenzidine (DAB) tetrahydrochloride peroxidase substrate and dehydrated by sequential immersions in ethanol and xylene after counterstained with haematoxylin (Vector Laboratory). Inducible NOS was semi-quantitatively assessed in bronchial and bronchiolar epithelium by coding each magnified (20x) bronchial and bronchiolar section. The grades were assigned as no staining (0), focal staining (1), diffuse weak staining (2), diffuse moderate staining (3) and diffuse strong staining (4). Endothelial NOS was similarly assessed in lung vessels including arteries and veins.

To assess leucocytes infiltration into the lungs, we performed immunohistochemical staining on the same pulmonary sections with anti-neutrophil (sc-71674) and anti-macrophage (sc-9139) antibodies as primary antibodies. Other steps were performed exactly as previously described except for unmasking procedure using protease method (30 minutes at RT).

Neutrophils was counted in 20x-magnification fields then converted to number/mm². Monocytes/macrophages were principally expressed in bronchial and bronchiolar epithelia and were coded as previously described for iNOS expression.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using SPSS 16.0 (Chicago, IL, USA). Data were expressed as mean \pm SEM. Comparisons were performed using Kruskal-Wallis test for all 3 groups (PBS, HOCl, and bleomycin). In case of significant difference from Kruskal-Wallis test, Mann-Whitney test was applied for any 2-group comparison including HOCl versus PBS, bleomycin versus PBS, and HOCl versus bleomycin. Statistical threshold was set at 0.05 in 2-tailed tests.

Results

Increased exhaled NO (FeNO) in HOCI and bleomycin mice versus PBS mice at early time points:

We measured FeNO in mice before treatment, called "baseline" group, and found a relatively low value (2.24 ± 0.11 ppb). There was no significant difference in FeNO between "baseline" and all PBS groups (p=0.16).

There was a significant difference (p<0.01) in FeNO among 3 groups of mice at 2, 4, and 6 weeks but not in 8-week groups (p=0.088). In HOCI groups, FeNO was significantly increased (p<0.05) as compared to PBS groups at 2, 4, and 6 weeks (38%, 68%, and 55%, respectively) whilst in bleomycin groups, FeNO was only significantly higher to that from PBS groups at 2 and 4 weeks (47% and 59%), and then returned to the FeNO level from PBS group at 6 weeks (p=0.55).



Figure 3: Concentration of nitric oxide in the exhaled

Exhaled nitric oxide (part per billion, ppb) was measured in mice (n = 5/group) as described in method section. Results were expressed as mean \pm SEM.

**: p < 0.01 versus PBS group at the same time point.

!: p < 0.05 versus bleomycin group at the same time point.

There was no significant difference in FeNO between HOCl and bleomycin groups at 2 and 4 weeks. However, at 6 weeks, FeNO from HOCl mice was still increased and was significantly higher than that from bleomycin mice (p=0.008) (Figure 3). Increased inducible NOS and 3-nitrotyrosine expressions in HOCI and bleomycin mice associated to neutrophil and macrophage recruitment into lung tissues:

Inducible NOS expression was significantly higher in HOCl and bleomycin groups than in PBS group at 2 and 4 and 6 weeks as assessed by Western Blot performed in whole lung homogenates (Figure 4A). However, at 6 weeks, iNOS expression from bleomycin mice had tendency to decrease and was significantly lower than that from HOCl mice (p = 0.021). Immunohistochemical staining showed that iNOS expression increased notably in bronchial epithelium in HOCl mice at 2 and 4 week as well as in mononuclear cells in lung parenchyma (Figures 4B, 4C, and 4D).



Figure 4A: Inducible NOS expression by Western Blot in the lungs

Representative Western Blot analysis of iNOS and β -actin in whole lung homogenates.

iNOS: inducible nitric oxide synthase; P: PBS mice; H: HOCl mice; B: bleomycin mice.

*: p < 0.05 versus PBS group at the same time point;

#: p < 0.01 versus bleomycin group at the same time point.

Nitrotyrosine used as a marker of nitrosative stress was found significantly increased in HOCl and bleomycin mice at 2 and 4 weeks as compared to PBS mice (p<0.05) and returned to be comparable to control group at 6 and 8 weeks (p>0.05) (Figure 4E and 4F).

Parenchymal neutrophil number significantly increased in HOCI mice at 2 weeks (76 ± 10 /mm²; p=0.014) and at 4 weeks (73 ± 8 /mm²; p=0.021) as compared to that from PBS mice (16 ± 2 /mm² and 17 ± 3 /mm²; respectively). The result was similar in bleomycin group (41 ± 4 /mm²; p=0.021 and 40 ± 6 /mm²; p=0.02; respectively). This increased lung neutrophil recruitment continued to be significant in mice at 6 and 8 weeks but at a lower level compared to those at earlier phases.

We used CD68 as a marker of pulmonary macrophages and found that CD68 expression was significantly stronger in bronchial epithelium in HOCI and bleomycin mice at 2 (p=0.008) and 4 weeks (p=0.01) than in PBS mice at the same periods (Data not shown).



Figure 4B: Inducible NOS expression by immunohistochemistry in bronchial epithelium



Figure 4C: Semi-quantitative assessment of bronchial iNOS expression by immunohistochemistry

Immunohistochemical staining in lung sections of 3 groups of mice (4-5/group) with specific anti-iNOS antibody.

Scoring: no staining (0), focal staining (1), diffuse weak staining (2), diffuse moderate staining (3) and diffuse strong staining (4).

*: p < 0.05 versus PBS group at the same time point; #: p < 0.05 versus bleomycin group at the same time point.

Decreased endothelial NOS expression at late phases:

Endothelial NOS expression semi-quantitatively assessed by Western Blot was comparable among 3 groups of mice at 2 weeks (p=0.26) and at 4 weeks (p=0.27). At 6 weeks, eNOS expression tended to decrease in HOCI and bleomycin mice (p=0.05) versus PBS mice. At 8 weeks, decreased eNOS was statistically significant in HOCI and bleomycin mice (p=0.034 for both groups) as compared to PBS group (Figure 5A).



Figure 4D: Inducible NOS expression by immunohistochemistry in lung parenchyma

Immunohistochemical staining of iNOS on lung sections of 4-week mice. A: negative control IgG sections; B: PBS mice; C: HOCl mice; D: bleomycin mice. 1: 20x magnification and 2: 40x magnification.

Immunohistochemical staining showed strong expression of eNOS in vascular endothelium, especially in pulmonary arteries and arterioles. Semi-quantitative assessment by immunohistochemistry confirmed a significantly lower expression of eNOS in vascular endothelium of HOCI and bleomycin mice at 6 and 8 weeks (p=0.02 and p=0.005, respectively) (Figure 5B and 5C). Endothelial NOS staining was also present in bronchial epithelium but there was no significant difference among 3 groups of mice at any time point (p>0.05; Kruskal-Wallis test; data not shown).

Skin and lung fibrosis in HOCI and bleomycin mice, accompanied with fibroblast activation into myofibroblasts at later phases:

Skin thickness increased progressively from 2 weeks to 8 weeks in HOCI and bleomycin mice as compared to PBS mice (Figure A, Online Supplement Data) but it was only significantly higher in these two groups at 6 and 8 weeks (p<0.01). We measured acidsoluble collagen contents in injection-sited skin (Figure B, Online Supplement Data) and found that skin collagen concentrations were significantly increased in HOCI and bleomycin mice at 4, 6, and 8 weeks (p<0.01). Between these two groups, skin collagen was significantly higher in HOCI than bleomycin mice at 6 and 8 weeks (p=0.009 and 0.004, respectively). Between 6-week and 8 -weeek mice, skin collagen was significantly higher in HOCI mice (p=0.01) but not in bleomycin mice (p=0.2).

Lung collagen concentrations were significantly more elevated in HOCl and bleomycin mice than PBS mice at 6 and 8 weeks (p=0.009 and 0.004 for HOCl and p=0.016 and 0.004 for bleomycin, respectively) (Figure 6A). There was a tendency for higher lung collagen contents in HOCl than bleomycin mice at 6 and 8 weeks (p=0.11 and 0.1, respectively). Between 6-week and 8weeek mice, lung collagen was significantly higher in HOCl mice (p=0.011) but not in bleomycin mice (p=0.2). We evaluated the fibroblast transformation into myofibroblasts with a-actine by Western Blot and found that this transformation was significantly increased in HOCl and bleomycin mice at 6 and 8 weeks as compared to PBS groups (Figure 6B). Finally, lung fibrosis was visualized by histological stainings in different methods including haematoxylin and eosin, Sirius Red, or Masson's Trichrome stains. Pulmonary fibrosis was mostly localized in sub-epithelial compartments (Figure 6C).

Discussion

Several murine models have been widely used to study the pathophysiology of systemic sclerosis, especially spontaneous (or genetically modified) models such as tight-skin mice (Tsk-1) and induced models such as bleomycin-induced mice. Presenting sclerotic skin, lung fibrosis, and inflammation, these two models are useful for pathological study in SSc but fail to reproduce exactly all the features of SSc in humans (13). Oxydative stress has been suggested to be involved in the pathogenesis of systemic sclerosis (2-9) and we used HOCI generator (chosen among other ROS including OH*, O²⁻, and peroxynitrite) in our study as the most appropriate substance to induce SSc-like animals as concluded by Servettaz et al. (9).

Nitric oxide is one of the free radicals implicated in inflammatory process as the activation of inducible NOS has been usually seen in some murine models of allergen challenges or infectious disease (14-19). In Tsk-1 scleroderma model, Dooley et al. found a decreased endothelial NOS expression, in association with skin fibrosis. The fact that plasma NOx level in Tsk-1 mice was comparable to that from control animals could be explained by a compensative augmentation of inducible NOS which, unfortunately, has not been studied in this report (20).

To the best of our knowledge, our study is the first to measure exhaled nitric oxide in scleroderma murine models. Our results showed that both HOCI and bleomycin mice presented an increased pulmonary NO production at the early phases (2nd and 4th weeks), followed by structural changes in skin and lung tissues caused by an overproduction of collagens.

Simultaneously increased iNOS expression and 3-nitrotyrosine formation in bronchial epithelium and inflammatory cells gave evidence for important lung injuries at the early phases after chemical introduction.



Figure 4E: 3-nitrotyrosine expression by immunohistochemistry in bronchial epithelium



Figure 4F: Semi-quantitative assessment of bronchial 3 -nitrotyrosine by immunohistochemistry

Immunohistochemical staining of lung sections in 3 groups of mice (4-5/group) with anti-nitrotyrosine antibody.

Scoring: no staining (0), focal staining (1), diffuse weak staining (2), diffuse moderate staining (3) and diffuse strong staining (4).

*: p < 0.05 versus PBS group at the same time point; #: p < 0.05 versus bleomycin group at the same time point.

The cytotoxic effects of NO are believed to imply peroxynitrite, produced from a rapid reaction of NO and superoxide. Peroxynitrite reacts with proteins to form the stable nitrotyrosine products, found in acute lung injury such as adult respiratory distress syndrome (21) and in chronic inflammatory diseases such as idiopathic pulmonary fibrosis (22). It seemed that lungs were also a sensitive target for the systemic effects of both HOCI and bleomycin in our study, probably since they were one of metabolic organs of these substances or theirs metabolic by-products.



Figure 5A: Endothelial NOS expression by Western Blot in whole lung homogenates

Representative Western Blot analysis of eNOS and β -actin in whole lung homogenates.

eNOS: endothelial nitric oxide synthase; P: PBS mice; H: HOCl mice; B: bleomycin mice.

*: p < 0.05 versus PBS group at the same time point;

Differently to other allergic murine models (23), an increased exhaled NO levels in our study was induced by a systemic administration of stimulator rather than a local stimulation by inhaled allergens. As the lung is the only organ that allows a direct measuring of NO in gas phase, exhaled NO is a useful marker to investigate the lung injuries in a sclerodermic animal model.

At the time of initiating our study, exhaled NO measurement in laboratory animals has been already performed by several research groups (14-19). Measuring exhaled NO in mice was practically a challenge due to the animal's size.



Figure 5B: Endothelial NOS expression by immunohistochemistry in lung vessels



Figure 5C: Semi-quantitative assessment of vascular eNOS expression by immunohistochemistry

Immunohistochemical staining in lung sections of 3 groups of mice (4-5/group) with specific anti-eNOS antibody.

Scoring: no staining (0), focal staining (1), diffuse weak staining (2), diffuse moderate staining (3) and diffuse strong staining (4).

Our non-invasive online method was adapted to those proposed by Steudel (19) and Weicker (16). Steudel was the first author who introduced a non-invasive technique of measuring exhaled NO in mice. A group of 5 animals was kept in a closed chamber (400 mL) for 4 minutes, then air for NO and CO2 measurement was sampled from the chamber. Before isolation, the chamber was flushed with purified oxygen at 1 L/min during 3 minutes to remove basal NO.



Figure 6A: Lung collagen contents in mice

Acid-soluble collagens were measured by ELISA as described in method section.

Results were expressed as mean ± SEM.

*: p < 0.05; **: p< 0.01 versus PBS mice; ##: p < 0.01 ver-

However, there was no information about the aspiratory flow rate of the analyser and the use of several animals for every measurement excluded the individual variation in exhaled NO production (19). Weicker proposed a single animal measurement of exhaled NO by an offline-method. Different from Steudel's method, the chamber with mouse was continuously ventilated at one side by highly controlled medical air (21% FiO2) and NO calibration air and at the other side; air from the chamber was sampled during 2 minutes into a Mylar collection balloon before it was aspirated to NO analyser (16). In our experiment, air from the chamber was sampled directly to NO analyzer to avoid any contamination of NO from the environment.



Figure 6B: Lung fibroblast activation assessed by $\ensuremath{\mathtt{a}}$ sMA

*: p < 0.05 and **: p < 0.01 versus PBS Representative Western Blot analysis of a-smooth muscle actin (a-SMA) and βactin in whole lung homogenates. mice. NO-free air filter recommended by Analytix, connected to the 2 unidirectional valve system pumped by a rodent ventilator assured the baseline NO-zero level inside the chamber before isolation of the mouse. We also used medical purified oxygen (Air Liquide Santé) from time to time to verify NO-zero level during the measurement procedure.

Our chamber-closing time was in accordance with previous method (14) and our pilot experiments confirmed the absence of hypoxic and/or hypercapnic conditions to occur after 10-minute closing period. For analysing the result, we defined a plateau section on the curve just after opening the chamber for air sampling so that the NO variation range was minimal (< 10% of the mean and/or < 0.5 ppb). Other study took into account all the area under curve. These different points in exhaled NO measurement method could explain the relatively low value of exhaled NO in our study as compared to others (14, 16-17, 23-24).

In human, the status of NO production in patients with SSc was controversial: most authors reported an elevation (25-31) whereas others observed a reduction (32-34). Those discrepancies could be explained by the heterogeneity and overlapping processes in patients.

In our study, the elevation of exhaled NO was detectable in 2nd week and the highest level of FeNO was noted at 4th week, followed by a minor reduction to the end of the protocol.



Figure 6C: Histological staining of paraffin-embedded lung sections in 8-week mice



Supplement Data - Figure A: Skin thickness in mice

Skin thickness at injection zone was measured with a calliper at 2nd, 4th, 6th, and before animal sacrifice day.

*P: PBS mice; H: HOCl mice; B: bleomycin mice; w: week; ***:* p < 0.001 versus PBS mice at the same time point; ****:* p < 0.001 versus bleomycin mice at the same time point.

The abundance of collagen contents has only been noted from the 6th week (for lung) and 4th week (for skin). Thus, the increased NO production was prior to collagen overproduction within the same tissue but the FeNO was only significantly elevated in early stages. To our knowledge, this is the first evidence about the chronological relation between the immune -inflammatory process and the fibrosis in a murine model of systemic sclerosis. Similar results have been observed in humans by Kharitonov (33) and Rolla (34). Both studies found that FeNO was increased in SSc patients with ILD but decreased in chronic patients with pulmonary arterial hypertension (PAH). The presence of PAH has not been yet determined in our study although we found at the late phases (6th and 8th weeks) the findings of endothelial dysfunction with decreased expression of endothelial NOS, especially in pulmonary vascular beds. This could result from inhibitory effects of long and high NO production induced by iNOS over-expression. Since NO production from each NO synthase isoform couldn't be quantified separately, we can only argue on NOS expression. Hence, the decreased NO production from eNOS might have counterbalanced the increased NO production from iNOS at the late phases and exhaled NO became comparable among the three groups of mice.

A number of reports tried to identify the NOS isoforms that could contribute to exhaled NO in normal mice by using NOS knockout (-/-) mice. Increased exhaled NO in nNOS-/- and eNOS-/- mice whilst normal or reduced exhaled NO in iNOS-/- mice implied the key role of inducible NOS for NO fraction in the exhaled air (18-19). Using mice carrying a homozygous targeted disruption of nNOS, De Sanctis et al. showed that nNOS was responsible for approximately 40% of NO production in the exhaled air (35). Previous studies demonstrated that both inducible and endothelial NOS were involved in bleomycin-induced animal models.



Figure B: Skin collagen contents in mice Acid-soluble collagens were measured by ELISA as described in method section. Results were expressed as mean ± SEM.

Inducible NOS-/- mice or treatment with aminoguanidine, a selective inhibitor of iNOS, could attenuate bleomycin-induced lung fibrosis (36-37) while gene-targeted overexpression of endothelial NOS prevented bleomycin-induced pulmonary arterial hypertension in mice (38).

However, exhaled nitric oxide has never been evaluated in this animal model. We found that increased exhaled NO occurred at early phases simultaneously to elevated iNOS and nitrotyrosine expression in bronchiolar epithelium and inflammatory cells such as neutrophils and macrophages in our bleomycin group. Serum nitrite/nitrate measurement (NOx) can also provide information about NO production status in these mouse models. However, serum NOx levels are not specific to lung NO production and can be influenced by alimentary diets and drinking water in animals (39) as well as in humans (40).

In mice, the NOS-2 has been isolated not only from most of inflammatory leucocytes such as the neutrophils, macrophages and lymphocytes, but also in endothelial cells and fibroblasts – two major targets affected by bleomycin. Previous studies suggested that the inducible production of NO might be involved in the pulmonary fibrosis induced by bleomycin (41-43). This could be explained by the formation of peroxynitrite and tyrosine nitration when NO is overproduced and stimulatory effects of NO itself on fibroblasts. A selective inhibitor of NOS-2 has a protective role in the lung fibrosis, renal ischemia/reperfusion injury and collageninduced arthritis (41-46). Taken together, these finding indicate the important role of NO in bleomycin induced SSc murine model that has been investigated in previous studies.

The increasing level of inducible NOS expression in early phase might explain the high concentration of exhaled NO in those animals. Bleomycin is known to raise the production of proinflammatory cytokines which are susceptible to activate the inducible NOS via transcription factors such as NF-kB, AP-1,...(47)

Increased number of macrophages and neutrophils in enflamed tissue in our model could explain how bleomycin regulates the NO production. Similar inflammatory process was observed in HOCI mice. Servettaz et al. reported the inflammatory infiltration in this group of mice consisting in essentially Tlymphocytes as stained by B220 and CD3 antibodies (9). In our study, neutrophils and macrophages lung parenchyma infiltrations were considerably augmented. Immunostaining with specific anti-iNOS antibody showed a strong expression of iNOS in these infiltrating cells and bronchiolar epithelium, a finding that was consistent with interstitial pneumonia (22, 48).

In our study, despite an attenuated expression of NOS-2 from 6th to 8th week as compared to that at 2nd and 4th week in HOCI mice, the exhaled NO concentrations remain slightly higher than the levels from control mice, suggesting that increased FeNO cannot be satisfactorily explained uniquely by NOS2 overexpression. Contributions of two other specific isoforms to FeNO are uncertain according to some surprising observations in several allergic inflammation models. Ten Broeke RT (49) and De Sanctis (50) have indicated that NOS-2 is not the only factor that modulates the NO levels, because there was also an overexpression of NOS-3 in mice lung after an allergen challenge. In another study on NOS-2 KO mice (17), the authors have demonstrated that the NO increased significantly despite the missing of the inducible NOS enzyme. The high levels of exhaled NO could also be explained by an upregulation of both neuronal isoforms (NOS-1) (18) and/or endothelial isoform (NOS-3) (51).

Finally, decreased NO production at the same time of the beginning of a high collagens production raises the question whether NO would have protective or harmful effects on those processes. Decreased nitric oxide from endothelial NOS has usually been known to lose its protective role while the reduction of inducible NOS expression conveyed positive effect. However, as the level of nitrosylated proteins increased so early, we could expect that a high concentration of peroxynitrite has already been formed immediately after increased NO production induced by iNOS. This could induce the proliferative effects on fibroblasts as evidenced by in vitro studies reported previously (44, 52) and then trigger the tissue disrepair with structural disorganisation as in human diseases (22).

Even though the underlying mechanisms of the crosstalk between NO pathway, oxydative stress and collagen production need to be clarified in HOCI mice, our results suggest that exhaled NO can be used as a sensitive and non-invasive biomarker in this murine model as well as in bleomycin one. The early inflammatory and proliferative stages were similar in both models, characterized by increased exhaled NO. Pulmonary fibrosis significantly increased from the 6th week and continued to aggravate to 8th in mice injected with HOCI more than in mice injected with bleomycin. HOCI generator induced a higher and more fibrosing effects than did bleomycin. Effects of both bleomycin and HOCI on NOS expression differed between inducible and endothelial NOS. Further studies using iNOS knockout mice and/or eNOS overexpression mice are necessary to clarify the role of each NOS isoform in the pulmonary fibrogenesis in this murine induced by oxidative stress.

References

- Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. Scleroderma. N Engl J Med. 2009;360(19):1989-2003.
- Sambo P, Jannino L, Candela M, Salvi A, Donini M, Dusi S, Luchetti MM, Gabrielli A. Monocytes of patients with systemic sclerosis (scleroderma) spontaneously release in vitro increased amounts of superoxide anion. J Invest Dermatol 1999; 112:78-84.
- Sambo P, Baroni SS, Luchetti M, Paroncini P, Dusi S, Orlandini G, Gabrielli A. Oxidative stress in scleroderma: Maintenance of scleroderma fibroblast phenotype by the constitutive upregulation of reactive oxygen species generation through the NADPH oxidase complex pathway. Arthritis Rheum 2001; 44:2653-64.
- Herrick AL, Matucci Cerinic M. The emerging problem of oxidative stress and the role of antioxidants in systemic sclerosis. Clin Exp Rheumatol. 2001;19(1):4-8.
- Allanore Y, Borderie D, Lemarechal H, Ekindjian OG, Kahan A. Acute and sustained effects of dihydropyridine-type calcium channel antagonists on oxidative stress in systemic sclerosis. Am. J. Med. 2004;116: 595–600.
- Ogawa F, Shimizu K, Muroi E, Hara T, Hasegawa M, Takehara K, Sato S. Serum levels of 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, are elevated in patients with systemic sclerosis. Rheumatology 2006;45: 815–818.
- Servettaz A, Guilpain P, Goulvestre C, Chéreau C, Hercend C, Nicco C, Guillevin L, Weill B, Mouthon L, Batteux F. Radical oxygen species production induced by advanced oxidation protein products predicts clinical evolution and response to treatment in systemic sclerosis. Ann. Rheum. Dis. 2007;66: 1202–1209.
- Gabrielli A, Svegliati S, Moroncini G, Pomponio G, Santillo M, Avvedimento E. Oxidative stress and the pathogenesis of scleroderma: the Murrell's hypothesis revisited. Semin. Immunopathol. 2008;30: 329–337.
- Servettaz A, Goulvestre C, Kavian N, Nicco C, Guilpain P, Chéreau C, Vuiblet V, Guillevin L, Mouthon L, Weill B, Batteux F. Selective oxidation of DNA topoisomerase 1 induces systemic sclerosis in the mouse. J Immunol. 2009;182(9):5855-5864.
- Servettaz A, Kavian N, Nicco C, Deveaux V, Chéreau C, Wang A, Zimmer A, Lotersztajn S, Weill B, Batteux F. Targeting the cannabinoid pathway limits the development of fibrosis and autoimmunity in a mouse model of systemic sclerosis. Am J Pathol. 2010;177(1):187-196.
- Ricciardolo FL. Multiple roles of nitric oxide in the airways. Thorax 2003;58(2):175-182.
- Matucci Cerinic M, Kahaleh MB. Beauty and the beast. The nitric oxide paradox in systemic sclerosis. Rheumatology (Oxford). 2002;41(8):843-847.
- Yamamoto T. Animal model of systemic sclerosis. J Dermatol. 2010;37(1):26-41.

- Ahmad T, Mabalirajan U, Joseph DA, Makhija L, Singh VP, Ghosh B, Agrawal A. Exhaled nitric oxide estimation by a simple and efficient noninvasive technique and its utility as a marker of airway inflammation in mice. J Appl Physiol. 2009;107(1):295-301.
- Kenyon NJ, Last MS, Eiserich JP, Morrissey BM, Temple LM, Last JA. Differentiation of the roles of NO from airway epithelium and inflammatory cells in ozone-induced lung inflammation. Toxicol Appl Pharmacol. 2006;215(3):250-259.
- Weicker S, Karachi TA, Scott JA, McCormack DG, Mehta S. Noninvasive measurement of exhaled nitric oxide in a spontaneously breathing mouse. Am J Respir Crit Care Med. 2001;163(5):1113-1116.
- Sethi JM, Choi AM, Calhoun WJ, Ameredes BT. Non-invasive measurements of exhaled NO and CO associated with methacholine responses in mice. Respir Res. 2008;9:45.
- Cook S, Vollenweider P, Ménard B, Egli M, Nicod P, Scherrer U. Increased eNO and pulmonary iNOS expression in eNOS null mice. Eur Respir J. 2003;21(5):770-773.
- Steudel W, Kirmse M, Weimann J, Ullrich R, Hromi J, Zapol WM. Exhaled nitric oxide production by nitric oxide synthase -deficient mice. Am J Respir Crit Care Med. 2000;162(4 Pt 1):1262-1267.
- Dooley A, Low SY, Holmes A, Kidane AG, Abraham DJ, Black CM, Bruckdorfer KR. Nitric oxide synthase expression and activity in the tight-skin mouse model of fibrosis. Rheumatology (Oxford). 2008;47(3):272-280.
- Haddad IY, Pataki G, Hu P, Galliani C, Beckman JS, Matalon S. Quantitation of nitrotyrosine levels in lung sections of patients and animals with acute lung injury. J Clin Invest. 1994;94(6):2407-2413.
- Saleh D, Barnes PJ, Giaid A. Increased production of the potent oxidant peroxynitrite in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 1997;155(5):1763-1769.
- Bratt JM, Williams K, Rabowsky MF, Last MS, Franzi LM, Last JA, Kenyon NJ. Nitric oxide synthase enzymes in the airways of mice exposed to ovalbumin: NOS2 expression is NOS3 dependent. Mediators Inflamm. 2010;2010. pii: 321061.
- Hjoberg J, Shore S, Kobzik L, Okinaga S, Hallock A, Vallone J, Subramaniam V, De Sanctis GT, Elias JA, Drazen JM, Silverman ES. Expression of nitric oxide synthase-2 in the lungs decreases airway resistance and responsiveness. J Appl Physiol. 2004;97(1):249-259.
- Yamamoto T, Katayama I, Nishioka K. Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in systemic sclerosis. J Rheumatol. 1998;25(2):314-317.
- Mazzone A, Cusa C, Bucci L, Vezzoli M, Ghio S, Buggia I, Regazzi MB, Fossati G, Mazzucchelli I, Gritti D. The effects of iloprost infusion on microcirculation is independent of nitric oxide metabolites and endothelin-1 in chronic peripheral ischaemia. Eur J Clin Invest. 1999;29(1):1-5.

- 27. Andersen GN, Caidahl K, Kazzam E, Petersson AS, Waldenström A, Mincheva-Nilsson L, Rantapää-Dahlqvist S. Correlation between increased nitric oxide production and markers of endothelial activation in systemic sclerosis: findings with the soluble adhesion molecules E-selectin, intercellular adhesion molecule 1, and vascular cell adhesion molecule 1. Arthritis Rheum. 2000;43(5):1085-1093.
- Sud A, Khullar M, Wanchu A, Bambery P. Increased nitric oxide production in patients with systemic sclerosis. Nitric Oxide. 2000;4(6):615-619.
- Fajac I, Kahan A, Menkès CJ, Dessanges JF, Dall'Ava-Santucci J, Dinh-Xuan AT. Increased nitric oxide in exhaled air in patients with systemic sclerosis. Clin Exp Rheumatol. 1998;16(5):547-552.
- Paredi P, Kharitonov SA, Loukides S, Pantelidis P, du Bois RM, Barnes PJ. Exhaled nitric oxide is increased in active fibrosing alveolitis. Chest. 1999;115(5):1352-1356.
- Moodley YP, Lalloo UG. Exhaled nitric oxide is elevated in patients with progressive systemic sclerosis without interstitial lung disease. Chest. 2001;119(5):1449-1454.
- Allanore Y, Borderie D, Hilliquin P, Hernvann A, Levacher M, Lemaréchal H, Ekindjian OG, Kahan A. Low levels of nitric oxide (NO) in systemic sclerosis: inducible NO synthase production is decreased in cultured peripheral blood monocyte/macrophage cells. Rheumatology (Oxford). 2001;40 (10):1089-1096.
- haritonov SA, Cailes JB, Black CM, du Bois RM, Barnes PJ. Decreased nitric oxide in the exhaled air of patients with systemic sclerosis with pulmonary hypertension. Thorax. 1997;52(12):1051-1055.
- Rolla G, Colagrande P, Scappaticci E, Chiavassa G, Dutto L, Cannizzo S, Bucca C, Morello M, Bergerone S, Bardini D, Zaccagna A, Puiatti P, Fava C, Cortese G. Exhaled nitric oxide in systemic sclerosis: relationships with lung involvement and pulmonary hypertension. J Rheumatol. 2000;27 (7):1693-1698.
- 35. De Sanctis GT, Mehta S, Kobzik L, Yandava C, Jiao A, Huang PL, Drazen JM: Contribution of type I NOS to expired gas NO and bronchial responsiveness in mice. The American journal of physiology 1997;273(4 Pt 1):L883-L888.
- Genovese T, Cuzzocrea S, Di Paola R, Failla M, Mazzon E, Sortino MA, Frasca G, Gili E, Crimi N, Caputi AP, Vancheri C. Inhibition or knock out of inducible nitric oxide synthase result in resistance to bleomycin-induced lung injury. Respir Res. 2005;6:58.
- Giri SN, Biring I, Nguyen T, Wang Q, Hyde DM. Abrogation of bleomycin-induced lung fibrosis by nitric oxide synthase inhibitor, aminoguanidine in mice. Nitric Oxide. 2002;7 (2):109-118.
- Champion HC, Bivalacqua TJ, D'Souza FM, Ortiz LA, Jeter JR, Toyoda K, Heistad DD, Hyman AL, Kadowitz PJ. Gene transfer of endothelial nitric oxide synthase to the lung of the mouse in vivo. Effect on agonist-induced and flowmediated vascular responses. Circ Res. 1999;84(12):1422-1432.

- 39. Samb A, Pretolani M, Dinh-Xuan AT, Ouksel H, Callebert J, Lisdero C, Aubier M, Boczkowski J. Decreased pulmonary and tracheal smooth muscle expression and activity of type 1 nitric oxide synthase (nNOS) after ovalbumin immunization and multiple aerosol challenge in guinea pigs. Am J Respir Crit Care Med. 2001;164(1):149-154.
- Tiev KP, Le-Dong NN, Duong-Quy S, Hua-Huy T, Cabane J, Dinh-Xuan AT. Exhaled nitric oxide, but not serum nitrite and nitrate, is a marker of interstitial lung disease in systemic sclerosis. Nitric Oxide. 2009;20(3):200-206.
- Davis DW, Weidner DA, Holian A, McConkey DJ. Nitric oxidedependent activation of p53 suppresses bleomycin-induced apoptosis in the lung. J Exp Med. 2000;192(6):857-869.
- Yamamoto T, Katayama I, Nishioka K. Nitrite production in mouse 3T3 fibroblasts by bleomycin-stimulated peripheral blood mononuclear cell factors. Clin Exp Rheumatol. 1999;17 (3):343-346.
- Yamazaki C, Hoshino J, Sekiguchi T, Hori Y, Miyauchi S, Mizuno S, Horie K. Production of superoxide and nitric oxide by alveolar macrophages in the bleomycin-induced interstitial pneumonia mice model. Jpn J Pharmacol. 1998;78(1):69-73.
- Romanska HM, Polak JM, Coleman RA, James RS, Harmer DW, Allen JC, Bishop AE. iNOS gene upregulation is associated with the early proliferative response of human lung fibroblasts to cytokine stimulation. J Pathol. 2002;197(3):372-379.
- Ersoz N, Guven A, Cayci T, Uysal B, Turk E, Oztas E, Akgul EO, Korkmaz A,Cetiner S. Comparison of the efficacy of melatonin and 1400W on renalischemia/reperfusion injury: a role for inhibiting iNOS. Ren Fail. 2009;31(8):704-710.
- Sakaguchi Y, Shirahase H, Ichikawa A, Kanda M, Nozaki Y, Uehara Y. Effects of selective iNOS inhibition on type II collagen-induced arthritis in mice. Life Sci. 2004;75(19):2257-2267.
- Pautz A, Art J, Hahn S, Nowag S, Voss C, Kleinert H. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. Nitric Oxide. 2010;23(2):75-93.
- akari E, Soini Y, Säily M, Koistinen P, Pääkkö P, Kinnula VL. Inducible nitric oxide synthase, but not xanthine oxidase, is highly expressed in interstitial pneumonias and granulomatous diseases of human lung. Am J Clin Pathol. 2002;117 (1):132-142.
- 49. Ten Broeke R, De Crom R, Van Haperen R, Verweij V, Leusink-Muis T, Van Ark I, De Clerck F, Nijkamp FP, Folkerts G. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase suppresses features of allergic asthma in mice. Respir Res. 2006;7:58.
- De Sanctis GT, MacLean JA, Hamada K, Mehta S, Scott JA, Jiao A, Yandava CN, Kobzik L, Wolyniec WW, Fabian AJ, Venugopal CS, Grasemann H, Huang PL, Drazen JM. Contribution of nitric oxide synthases 1, 2, and 3 to airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of asthma. J Exp Med. 1999;189(10):1621-1630.
- Feletou M, Lonchampt M, Coge F, Galizzi JP, Bassoullet C, Merial C, Robineau P, Boutin JA, Huang PL, Vanhoutte PM, Canet E: Regulation of murine airway responsiveness by endothelial nitric oxide synthase. American journal of physiol-

 Hua-Huy T, Tiev KP, Chéreau C, Duong-Quy S, Cabane J, Dinh-Xuan AT. Increased alveolar concentration of nitric oxide is related to serum-induced lung fibroblast proliferation in patients with systemic sclerosis. J Rheumatol. 2010;37(8):1680-1687.

DISCUSSION

1. Relation entre la C_ANO et l'effet profibrosant du sérum des patients atteints de sclérodermie systémique

L'hypothèse selon laquelle la fibrose pulmonaire résulte de réparations tissulaires répétées et mal contrôlées en réponse aux agressions chroniques est un concept classique connu depuis plusieurs décennies [292, 293]. Les poumons ont une très grande surface exposée à l'environnement, qui représente plusieurs fois la surface corporelle (cutanée). Ceci explique la fréquence des pneumopathies dues aux agressions externes, infectieuses et/ou environnementales [294]. Bien que les stimuli agresseurs soient de nature diverse, la réponse pulmonaire locale et la réponse systémique à ces stimuli partagent des points communs. Notamment, l'inflammation résultant de ces agressions est liée à l'activation du l'immunité innée et adaptative avec la participation de l'immunité tant cellulaire qu'humorale. La réparation tissulaire assurée par les fibroblastes se traduit par l'augmentation de sa capacité de production des protéines de la matrice extracellulaire dont le collagène. Dans les conditions physiologiques, cette réparation tissulaire est autorégulée par l'induction de l'apoptose des myofibroblastes [88, 295]. Les voies biologiques ciblant le contrôle de la prolifération des fibroblastes sont étudiées en priorité dans le but d'obtenir des molécules spécifiques inhibant la fibrose [296].

Plusieurs études ont mis en évidence les modifications phénotypiques des fibroblastes induites par les liquides biologiques comme le sérum ou le liquide de LBA des patients atteints de ScS. Ces études mettent en lumière la capacité du sérum à induire une fibrose des tissus situés à distance du lieu de synthèse supposé de la (ou des) molécule(s) responsables de l'induction de la fibrose. Cette capacité d'induire une fibrose systémique explique l'atteinte multi-organe des connectivites comme la ScS. Dans le sérum ou le plasma des patients atteints de ScS, plusieurs cytokines comme le TGF- β [297-299], le CTGF [88, 300] ou l'endothéline 1 [301, 302] ont été incriminées. Mais ces facteurs ne sont pas les seuls coupables. Les auto-anticorps anti-PDGFR [134], les molécules de faible poids moléculaire [303], les produits avancés d'oxydation des protéines [179], l'interleukine-1 (IL-1) [304, 305], l'IL-4 [306, 307], et l'IL-17 [308] sont d'autant de candidats potentiels. Cependant, aucune

étude n'a examiné la relation entre la concentration sérique de ces molécules et la sévérité de l'inflammation alvéolaire chez les patients atteints de ScS. Notre premier article a ainsi établi l'existence d'une corrélation entre l'augmentation de la C_ANO chez un patient donné et la capacité du sérum de ce même patient à induire la prolifération des fibroblastes pulmonaires et la transformation de ceux-ci en myofibroblastes [309]. L'évaluation de l'alvéolite active peut s'effectuer par une méthode directe comme le lavage broncho-alvéolaire (LBA) avec ou sans biopsie trans-bronchique [6, 7, 56] ou par le scanner thoracique [6, 310, 311]. Elle peut également être réalisée par la mesure du NO dans l'air expiré.

L'évaluation de la PID par la mesure du NO expiré en utilisant la méthode de deux compartiments présente de nets avantages par rapport aux autres méthodes. Il s'agit d'une technique non-invasive, de réalisation facile et standardisée. Elle permet de préciser l'origine bronchique ou alvéolaire de la production du NO. Les résultats sont fiables, reproductibles et comparables entre les différentes équipes, permettant le suivi longitudinal et les méta-analyses multicentriques [9]. La première étude publiée par Girgis et coll. a montré l'augmentation de la C_ANO chez des patients atteints de ScS avec une PID [11]. Nous avons ensuite confirmé ce résultat chez un plus grand nombre de patients [10]. Ces deux études ont montré l'existence d'une corrélation entre la CANO et la sévérité de la PID, attestée par la diminution de la DLCO [10, 11] et de la capacité vitale forcée [10]. D'autres études ont mis en évidence une élévation du NO expiré [12] et de la C_ANO [13] chez des patients atteints de ScS sans PID, suggérant une élévation précoce de l'activité de la NOS inductible, probablement durant la phase initiale de l'inflammation, bien avant l'apparition de la fibrose pulmonaire. Notre résultat est en accord avec celui de Wuttge et coll. [13] montrant que l'inflammation alvéolaire évaluée par la CANO est fortement liée à l'étendu des opacités réticulées et en verre dépoli observées sur le scanner thoracique

En dehors de l'inflammation alvéolaire qui stimule l'expression et l'activité de la NOS inductible, il existe deux éléments pouvant contribuer à une augmentation artéfactuelle de la C_ANO. Le premier élément est lié au modèle théorique de la mesure du NO à 2 compartiments qui assimile l'arbre bronchique à un tube rigide de diamètre constant. Ce modèle néglige l'aspect arborisé des voies aériennes et la diffusion rétrograde du NO issu des bronches vers les alvéoles lors de l'expiration. Les corrections apportées par le modèle de la « trompette » [312] prennent en compte ces deux facteurs négligés dans le modèle précédent

même si elles donnent des valeurs de C_ANO légèrement inférieures à celles obtenues avec le modèle à 2 compartiments. Quel que soit le modèle utilisé, les valeurs de la C_ANO restent élevées chez les patients atteints de ScS par rapport aux sujets témoins [86]. Le deuxième élément potentiellement artéfactuel est l'accumulation passive de NO dans les alvéoles liée à la fibrose pulmonaire, attestée par la diminution de la DLCO. Cette diminution de la DLCO est liée soit à une diminution de la conductance membranaire, soit à une diminution du volume capillaire sanguin, soit à la conjonction de ces deux phénomènes. Bien qu'impossible à quantifier de façon précise, il semble que ce facteur soit négligeable et ne contribue pas de façon significative à l'augmentation de la C_ANO. En effet, il est possible de calculer le débit massique de NO produit par les alvéoles (V'_ANO) en tenant compte de la C_ANO et de la capacité de diffusion alvéolo-capillaire de NO (DLNO) [313]. Nous avons ainsi mesuré de façon concomitante la C_ANO et la DLNO chez les patients atteints de ScS. Les premiers résultats portant sur 78 patients ont mis en évidence une augmentation de la production alvéolo-capillaire (résultats non présentés).

D'autres arguments indirects sont en faveur d'une augmentation de la production du NO au niveau des régions pulmonaires lésées. Les macrophages isolés du LBA des patients atteints de ScS avec PID expriment en permanence la NOS inductible et produisent de grandes quantités d'anions superoxydes, dont l'association avec le NO forme l'anion peroxynitrite, hautement toxique [314]. Il existe également une hyper-expression de la NOS inductible associée à la présence en excès de la 3-nitrotyrosine dans les macrophages, les polynucléaires neutrophiles et l'épithélium alvéolaire des patients atteints de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine [316] ou l'irradiation pulmonaire [317]. L'invalidation du gène codant la NOS inductible confère un effet protecteur contre la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine [318].

En résumé, il existe des preuves directes et indirectes en faveur (1) de l'augmentation de la C_ANO chez les patients atteints de ScS, et (2) d'une relation étroite entre l'importance de cette augmentation et la sévérité de l'inflammation alvéolaire. Notre étude *in vitro* sur les fibroblastes pulmonaires humains a confirmé la liaison entre cette inflammation alvéolaire et l'effet fibrosant du sérum des patients sclérodermiques.

2. Valeur prédictive de la CANO sur l'aggravation de la PID liée à la sclérodermie systémique

La corrélation entre l'inflammation alvéolaire et la fibrose pulmonaire est également retrouvée dans notre deuxième étude évaluant le pouvoir prédictif de la CANO par rapport à l'éventuelle détérioration de la fonction respiratoire ou les risques de décès chez les patients atteints de ScS [319]. Dans cette étude, nous avons utilisé les critères usuels d'évaluation de la sévérité de la PID que sont la diminution des volumes pulmonaires (CPT et/ou CVF) de plus de 10% par rapport aux valeurs mesurées à l'inclusion dans l'étude. Le risque de décès, qui représente la complication la plus grave de la maladie [37], est également évalué en fonction de la CANO. Plusieurs études ont utilisé ces paramètres pour identifier un marqueur fiable pouvant prédire l'aggravation de la PID liée à la ScS [6, 20, 320]. La plupart de ces études repose sur les résultats du scanner thoracique ou la diminution des volumes pulmonaires mobilisables (CVF) pour objectiver l'extension des lésions de fibrose irréversible. Gibson et coll. ont montré que la présence (1) d'auto-anticorps anti-ARN polymérase, (2) de la forme cutanée diffuse de ScS (dcScS) et (3) d'une CVF inférieure à 70% peuvent prédire l'aggravation de la PID liée à la ScS, mais seule la forme cutanée (dcScS) subsiste comme facteur prédictif après une analyse multivariée. De plus, le faible nombre de patients avant une CVF < 70% (7 patients sur 105) représente indiscutablement un point faible de cette étude, dont le grand nombre de patients ayant une maladie modérée et peu évolutive rend peu représentative de la ScS évoluée [320]. Il n'existe à notre connaissance aucune étude longitudinale sur le rôle prédictif des biomarqueurs de l'inflammation dans la ScS. Nos résultats confirment qu'une valeur élevée de CANO (> 5,3 ppb) est prédictive d'une aggravation possible de la PID avec un risque élevé (HR à 6,06). Nous avons également déterminé la valeur « seuil » de la CANO à 8,5 ppb, au-delà de laquelle le risque de développer une PID est réel (avec une spécificité de 90%). La validation de ces résultats est renforcée par l'étude d'une cohorte indépendante de patients atteints de ScS de durée et de gravité comparables [319].

Ainsi, l'augmentation de la C_ANO chez l'homme confirme l'existence d'une inflammation alvéolaire, pouvant précéder la survenue d'une PID chez les patients atteints de ScS. Pour d'évidentes raisons éthiques, les tissus pulmonaires humains ne sont pas accessibles à l'investigation physiopathologique et aux études moléculaires et cellulaires nécessaires pour établir le lien entre l'inflammation alvéolaire et la fibrose interstitielle de la ScS. Nous avons donc utilisé des modèles murins de fibrose pulmonaire, en mettant au point la méthode de mesure du NO expiré chez la souris afin de combiner mesures *in vivo* et expérimentations *in vitro* chez le même animal porteur d'atteintes cutanées et systémiques semblables à celles observées au cours de la ScS chez l'homme.

3. Signification des variations du NO expiré dans les modèles de fibrose pulmonaire induite par l'HOCl et la bléomycine

En étudiant la cinétique de l'augmentation du NO expiré chez les souris ayant reçu la bléomycine ou l'acide hypochloreux (HOCl) nous avons pu relier l'augmentation du NO expiré aux modifications histologiques pulmonaires ainsi qu'à l'expression tissulaire de la NOS inductible chez les mêmes animaux. Nous avons réussi à quantifier le NO expiré chez la souris par une méthode non-invasive en respiration spontanée. Bien que les valeurs mesurées soient comparativement plus faibles que celles observées chez l'homme, les mesures effectuées chez la souris sont néanmoins suffisamment élevées pour clairement différencier le groupe des animaux traités par l'HOCl et/ou la bléomycine du groupe des animaux témoins, traités par le PBS. Les variations de la concentration du NO dans l'air expiré s'accompagnent d'une modification dans le même sens de l'expression protéique de la NOS inductible et de la présence tissulaire des nitrotyrosines. Nous avons également trouvé que la production accrue de NO chez les souris exposées au stress oxydatif est associée à la fois à un recrutement de cellules inflammatoires (macrophages et polynucléaires neutrophiles), à un stress nitrosatif et à la fibrose pulmonaire.

La fibrose est la conséquence d'une réparation mal-contrôlée du tissu affecté, suite à une lésion inflammatoire ou endothéliale [321]. Le NO est un médiateur ubiquitaire assurant la communication intercellulaire entre les cellules endothéliales, les cellules immunitaires et les fibroblastes. La relation entre une augmentation de la synthèse du NO et la fibrose pulmonaire n'est pas totalement établie et certaines études ont même donné des résultats contradictoires, les unes montrant une augmentation [10, 11, 83-86, 309] les autres une diminution [82, 322] de la production pulmonaire du NO chez les patients sclérodermiques. Il est cependant important de noter que ces résultats contradictoires ne portent que sur la valeur de la F_ENO . Certains auteurs suggèrent que le NO expiré n'est augmenté que pendant la phase
initiale de la maladie [13], pour diminuer ensuite de façon significative, lorsque que la ScS est déjà installée chez les patients souffrant de la PID et/ou de l'HTAP [322].

Nous avons montré dans notre troisième étude que l'augmentation progressive de la F_ENO chez les souris après injection de HOCl ou de bléomycine est corrélée à une augmentation concomitante de l'expression protéique de la NOS inductible. Les observations similaires ont été rapportées dans d'autres modèles murins des maladies allergiques, confortant l'idée d'une relation directe entre l'inflammation tissulaire et l'augmentation du NO expiré [232, 323, 324]. Cette étude est à notre connaissance la première à apporter des preuves directes, combinant les mesures *in vivo* avec les études *in vitro* dans un modèle expérimental, d'un lien chronologique étroit entre la biosynthèse du NO et le développement de la fibrose pulmonaire. D'autres auteurs ont évoqué cette hypothèse dans les études cliniques [322] sans pour autant pouvoir adosser leurs hypothèses sur des faits expérimentaux tangibles. Dans notre étude, la synthèse de collagène tant au niveau pulmonaire que cutané augmente 2 semaines après le début de l'élévation du NO, et reste élevée pendant les 4 semaines suivantes.

De nombreuses études ont essayé, sans succès, de déterminer la contribution respective de chacune des 3 isoformes de la NOS dans la quantité totale de NO mesurée dans l'air expiré chez les souris. La NOS inductible est considérée comme la source principale du NO expiré, selon Steudel et coll. [239] et Cook et coll. [241]. Cependant, De Sanctis et coll. ont montré que la NOS neuronale peut contribuer jusqu'à 40% à la production du NO dans l'air expiré [231]. Dans le modèle génétique des souris Tsk-1, Dooley et coll. [228] ont trouvé une diminution de l'expression de la NOS endothéliale associée à une fibrose cutanée. Cependant, les NOx sériques de ces animaux sont comparables à ceux des souris témoins. Cette discordance peut être expliquée soit par le manque de fiabilité méthodologique de la mesure des NOx, soit par une augmentation compensatrice du NO provenant de l'activité des NOS inductibles, malheureusement non étudiée par Dooley et coll [228]. Chez les souris, les NOS inductibles sont exprimées non seulement par des leucocytes mais aussi des cellules endothéliales, des pneumocytes de type II et des fibroblastes, qui sont d'autant de cibles cellulaires potentielles de la bléomycine. Cette dernière est connue par sa capacité de stimuler la production de cytokines pro-inflammatoires capables d'activer la NOS inductible par l'intermédiaire des facteurs de transcription tels que le NF-kB ou l'AP-1 [249].

Notre étude montre qu'il existe une infiltration importante de macrophages et de neutrophiles dans le tissu pulmonaire des souris. Ce recrutement de cellules inflammatoires peut être est une simple réponse systémique induite par des mécanismes immunitaires contre l'agression par un produit toxique. Ces cellules inflammatoires sécrètent des cytokines proinflammatoires dont certaines sont capables d'induire la transcription du gène de la NOS inductible. A long terme, ces cytokines peuvent aussi être considérées comme des molécules pro-fibrosantes capables de stimuler les fibroblastes, et favoriser l'accumulation tissulaire de collagène [88]. L'augmentation du NO expiré peut, dans ce contexte, être considérée comme un marqueur précoce de la fibrogénèse pulmonaire.

Six semaines après l'injection d'HOCl, la concentration de NO expiré reste élevée malgré l'amorce d'une diminution de l'expression protéique de la NOS inductible, suggérant l'intervention d'une autre source de NO. Ten Broeke et coll. [325] et De Sanctis et coll. [323] ont suggéré que la NOS inductible ne soit pas le seul facteur contribuant à l'augmentation du NO expiré. En fait, la biodisponibilité du NO est contrôlée par plusieurs mécanismes. Un excès de NO pourrait inhiber sa propre synthèse par les trois isoformes de la NOS. La présence de NO peut aussi diminuer non pas à cause d'un défaut de production mais par une consommation accrue, notamment par l'anion superoxyde qui inactive le NO en le transformant en peroxynitrite [184]. La présence de fortes quantités de peroxynitrite dans les tissus pulmonaires de souris précédant l'apparition de la fibrose pulmonaire plaide en faveur du rôle délétère de NO synthétisé en excès et se retrouvant dans un milieu riche en radicaux libres dérivés de l'oxygène. Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par Saleh et coll. [315], qui ont aussi trouvé une déposition accrue de nitrotyrosine et une expression élevée de la NOS inductible dans les macrophages, les neutrophiles et les cellules épithéliales des patients ayant une PID dans la phase initiale de la maladie.

4. Interaction possible entre le NO et l'HOCl

A la différence de la bléomycine, les mécanismes expliquant l'augmentation de la production pulmonaire du NO par l'HOCl restent inconnus. Par rapport aux autres ERO (radical hydroxyle OH*, anion superoxyde $O_2^{\circ-}$ et peroxynitrite ONOO^{o-}), l'HOCl semble le composé le plus efficace pour provoquer une fibrose pulmonaire expérimentale chez la souris [179]. Dans notre troisième article, l'administration systémique de l'HOCl a séquentiellement

provoqué une activation de la NOS inductible, une augmentation du NO expiré et une fibrose pulmonaire.

Malgré sa nature oxygénée et nitrogénée, le NO lui-même est relativement peu réactif mais il est capable de réagir avec d'autres radicaux libres oxydants pour donner naissance aux produits complexes dont la réactivité est plus puissante que celle du NO. En se combinant avec l'anion superoxyde (O2°), le NO forme le peroxynitrite qui est une molécule fortement cytotoxique. Par ailleurs, le NO est aussi considéré comme un agent antioxydant et joue un rôle bénéfique dans des conditions physiologiques. Il y a une compétition quasi permanente entre le NO et l' $O_2^{\circ-}$ pour maintenir un équilibre physiologique. Une faible concentration de NO peut protéger la cellule contre le stress oxydatif apporté par l'anion superoxyde. Dans les cellules musculaires lisses, le NO a aussi un effet opposé à celui de l'anion superoxyde. L'anion superoxyde induit une contraction des cellules musculaires lisses en facilitant le flux d'entrée du calcium cytosolique [326] tandis que le NO est un des plus puissants vasodilatateurs endogènes. L'anion superoxyde inhibe aussi l'expression et l'activité de la guanylate cyclase soluble, cible moléculaire préférentielle du NO dont l'activation par celui-ci entraîne la synthèse du GMPc, second messager nucléotidique ayant un rôle clé dans la relaxation vasculaire [327]. Une augmentation de la production de l'anion superoxyde peut inhiber l'effet vasodilatateur du NO soit par un effet direct de l'anion superoxyde, soit en diminuant la biodisponibilité du NO et la formation du peroxynitrite résultant. Le peroxynitrite peut entrer en compétition directe avec l'action protectrice de l'enzyme superoxyde dismutase. Le peroxynitrite hérite à la fois de la puissance oxydative de l'anion superoxyde et du NO. Le peroxynitrite est impliqué dans les lésions aigues du poumon ainsi que dans la fibrose pulmonaire idiopathique [315]. Nos résultats montrent que les poumons sont un organe cible pour le stress oxydant au cours de la ScS, probablement parce que le milieu aérobique dans le poumon favorise des interactions oxydatives des ERO, y compris le NO. Par ailleurs, les dérivés hydroxylés H₂O₂ et HOCl sont aussi capables de stimuler l'expression de la NOS inductible, par activation du complexe NF-kB [328]. L'activité cytotoxique d'HOCl, devient encore plus importante lorsque ce dernier se combine avec le nitrite (NO₂), un métabolite principal du NO pour former son arme ultime : le NO₂Cl dont l'effet cytotoxique et bactéricide est trois fois plus puissant que ceux du NO et de l'HOCl. Les NOS sont également une source potentielle des ERO, en particulier de l'anion superoxyde. La production de l'anion superoxyde par les NOS survient lorsque celles-ci se font en mode

« découplé », en d'autres termes, lorsqu'il existe une déficience en substrat (L-arginine) ou en cofacteurs (BH₄), déréglant la synergie entre les deux domaines réductase et oxygénase [329]. Dans ce cas, les NOS produisent des anions superoxydes au lieu du NO. Le NO peut aussi stimuler la production spontanée de superoxyde dans la mitochondrie, en se fixant sur le cytochrome oxydase et en bloquant le flux d'électrons normal vers le complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale [330].

En conclusion, le NO joue un rôle important dans le développement de la fibrose, surtout en présence d'un stress oxydatif chez les patients sclérodermiques. D'une part, le NO lui-même est aussi un radical libre possédant un faible pouvoir oxydatif et appartenant à la famille des ERO. D'autre part, le NO fonctionne en synergie avec d'autres types d'ERO pour amplifier l'effet cytotoxique de ces molécules. Les interactions entre la voie du NO et celles des autres radicaux libres sont complexes et peuvent se produire à différents niveaux, de la biosynthèse au métabolisme chimique, avec des possibilités de régulations, soit par compétition soit en collaboration, entre ces différentes voies du stress oxydatif.

CONCLUSION

Notre travail de thèse a permis de confirmer la valeur prédictive de la C_ANO sur la progression de la PID chez les patients porteurs de ScS et de valider la mesure de NO expiré comme marqueur de l'inflammation pulmonaire chez les souris sclérodermiques. Les résultats de notre travail peuvent être ainsi résumés :

- L'augmentation de la C_ANO chez les patients atteints de ScS, reflétant une alvéolite active, est corrélée à la capacité du sérum des malades à transformer les fibroblastes pulmonaires normaux en myofibroblastes pathologiques, première étape de la fibrose pulmonaire.
- 2. La C_ANO est un biomarqueur non-invasif, sensible et fiable, permettant la prédiction de l'aggravation de la PID liée à la ScS. Les patients ayant une C_ANO supérieure à 5,3 ppb ont un risque élevé (d'environ 6 fois) d'aggravation de la fonction respiratoire ou de survenue de décès par rapport à ceux ayant une C_ANO inférieure à 5,3 ppb. La valeur de C_ANO > 8,5 ppb pourrait être un argument fort préconisant un traitement précoce de la PID liée à la ScS.
- 3. L'inflammation alvéolaire, avec activation de la NOS inductible et augmentation du NO expiré, précède la fibrose pulmonaire dans un modèle expérimental de souris sclérodermique induit par un stress oxydatif. La valeur maximale de la concentration fractionnaire de NO expiré est observée à la 4^{ème} semaine et correspond à la co-existence d'infiltrats inflammatoires, transitoires et fugaces, de polynucléaires et de monocytes/macrophages au niveau des alvéoles. Cet infiltrat inflammatoire s'accompagne d'une surexpression transitoire de la NOS inductible alvéolaire alors que la fibrose pulmonaire histologique n'est pas encore installée. De plus, la forte production de NO provoque un effet délétère direct sur le tissu pulmonaire, attesté par la présence de 3-nitrotyrosines, témoins du stress nitrosatif.

PERSPECTIVES

L'étude *in vitro* sur les fibroblastes pulmonaires exposés au sérum des patients atteints de ScS sera poursuivie par l'exploration des voies NO/GMPc et RhoA/Rho-kinases concernant l'effet pro-prolifératif et activateur des fibroblastes.

L'étude *in vivo* sur le modèle de souris sclérodermiques sera reconduite avec l'utilisation des souris déficientes du gène codant pour la NOS inductible, permettant de préciser la contribution de cette enzyme (1) dans la concentration totale du NO expiré et (2) à la survenue de la fibrose pulmonaire. Nous projetons également d'étudier l'effet du traitement anti-inflammatoire (corticostéroïdes) sur le NO expiré et la fibrose pulmonaire dans ce modèle expérimental.

BIBLIOGRAPHIE

1) Jimenez SA, Derk CT. Following the molecular pathways toward an understanding of the pathogenesis of systemic sclerosis. **Ann Intern Med** 2004; 140: 37-50.

2) Steen VD, Medsger TA. Changes in causes of death in systemic sclerosis, 1972-2002. Ann Rheum Dis 2007; 66: 940-4.

3) Tyndall AJ, Bannert B, Vonk M, Airò P, Cozzi F, Carreira PE, Bancel DF, Allanore Y, Müller-Ladner U, Distler O, Iannone F, Pellerito R, Pileckyte M, Miniati I, Ananieva L, Gurman AB, Damjanov N, Mueller A, Valentini G, Riemekasten G, Tikly M, Hummers L, Henriques MJ, Caramaschi P, Scheja A, Rozman B, Ton E, Kumánovics G, Coleiro B, Feierl E, Szucs G, Von Mühlen CA, Riccieri V, Novak S, Chizzolini C, Kotulska A, Denton C, Coelho PC, Kötter I, Simsek I, de la Pena Lefebvre PG, Hachulla E, Seibold JR, Rednic S, Stork J, Morovic-Vergles J, Walker UA. Causes and risk factors for death in systemic sclerosis: a study from the EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) database. **Ann Rheum Dis** 2010; 69: 1809-15.

4) Allanore Y, Avouac J, Kahan A. Systemic sclerosis: an update in 2008. Joint Bone Spine 2008; 75: 650-5.

5) Mouthon L, Bérezné A, Guillevin L, Valeyre D. Therapeutic options for systemic sclerosis related interstitial lung diseases. **Respir Med** 2010; 104 Suppl 1: S59-69.

6) Goh NS, Desai SR, Veeraraghavan S, Hansell DM, Copley SJ, Maher TM, Corte TJ, Sander CR, Ratoff J, Devaraj A, Bozovic G, Denton CP, Black CM, du Bois RM, Wells AU. Interstitial lung disease in systemic sclerosis: a simple staging system. **Am J Respir Crit Care Med** 2008; 177: 1248-54.

7) Kowal-Bielecka O, Kowal K, Highland KB, Silver RM. Bronchoalveolar lavage fluid in scleroderma interstitial lung disease: technical aspects and clinical correlations: review of the literature. **Semin Arthritis Rheum** 2010; 40: 73-88.

8) Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. **Physiol Rev** 2004; 84: 731-65.

9) American Thoracic Society; European Respiratory Society. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide. **Am J Respir Crit Care Med** 2005; 171: 912-30.

10) Tiev KP, Cabane J, Aubourg F, Kettaneh A, Ziani M, Mouthon L, Duong-Quy S, Fajac I, Guillevin L, Dinh-Xuan AT. Severity of scleroderma lung disease is related to alveolar concentration of nitric oxide. **Eur Respir J** 2007; 30: 26-30.

11) Girgis RE, Gugnani MK, Abrams J, Mayes MD. Partitioning of alveolar and conducting airway nitric oxide in scleroderma lung disease. **Am J Respir Crit Care Med** 2002; 165: 1587-91.

12) Malerba M, Radaeli A, Ragnoli B, Airo' P, Corradi M, Ponticiello A, Zambruni A, Grassi V. Exhaled nitric oxide levels in systemic sclerosis with and without pulmonary involvement. **Chest** 2007; 132: 575-80.

13) Wuttge DM, Bozovic G, Hesselstrand R, Aronsson D, Bjermer L, Scheja A, Tufvesson E. Increased alveolar nitric oxide in early systemic sclerosis. **Clin Exp Rheumatol** 2010; 28 (5 Suppl 62): S5-9.

14) Owens GR, Fino GJ, Herbert DL, Steen VD, Medsger TA Jr, Pennock BE, Cottrell JJ, Rodnan GP, Rogers RM. Pulmonary function in progressive systemic sclerosis. Comparison of CREST syndrome variant with diffuse scleroderma. **Chest** 1983; 84: 546-50.

15) Schurawitzki H, Stiglbauer R, Graninger W, Herold C, Pölzleitner D, Burghuber OC, Tscholakoff D. Interstitial lung disease in progressive systemic sclerosis: high-resolution CT versus radiography. **Radiology** 1990; 176: 755-9.

16) Tamaki T, Mori S, Takehara K. Epidemiological study of patients with systemic sclerosis in Tokyo. Arch Dermatol Res 1991; 283: 366-71.

17) Vonk MC, Broers B, Heijdra YF, Ton E, Snijder R, van Dijk AP, van Laar JM, Bootsma H, van Hal PT, van den Hoogen FH, van Daele PL. Systemic sclerosis and its pulmonary complications in The Netherlands: an epidemiological study. **Ann Rheum Dis** 2009; 68: 961-5.

18) Garber SJ, Wells AU, duBois RM, Hansell DM. Enlarged mediastinal lymph nodes in the fibrosing alveolitis of systemic sclerosis. **Br J Radiol** 1992; 65: 983-6.

19) Ooi GC, Mok MY, Tsang KW, Wong Y, Khong PL, Fung PC, Chan S, Tse HF, Wong RW, Lam WK, Lau CS. Interstitial lung disease in systemic sclerosis. **Acta Radiol** 2003; 44: 258-64.

20) Goldin JG, Lynch DA, Strollo DC, Suh RD, Schraufnagel DE, Clements PJ, Elashoff RM, Furst DE, Vasunilashorn S, McNitt-Gray MF, Brown MS, Roth MD, Tashkin DP; Scleroderma Lung Study Research Group. High-resolution CT scan findings in patients with symptomatic scleroderma-related interstitial lung disease. **Chest** 2008; 134: 358-67.

21) D'Angelo WA, Fries JF, Masi AT, Shulman LE. Pathologic observations in systemic sclerosis (scleroderma). A study of fifty-eight autopsy cases and fifty-eight matched controls. **Am J Med** 1969; 46: 428-40.

22) Weaver AL, Divertie MB, Titus JL. Pulmonary scleroderma. Dis Chest 1968; 54: 490-8.

23) Steen VD, Medsger TA Jr. Severe organ involvement in systemic sclerosis with diffuse scleroderma. Arthritis Rheum 2000; 43: 2437-44.

24) Sahhar J, Littlejohn G, Conron M. Fibrosing alveolitis in systemic sclerosis: the need for early screening and treatment. Intern Med J 2004; 34: 626-38.

25) Wells AU, Steen V, Valentini G. Pulmonary complications: one of the most challenging complications of systemic sclerosis. **Rheumatology (Oxford)** 2009; 48 Suppl 3: iii40-4.

26) Steen VD, Conte C, Owens GR, Medsger TA Jr. Severe restrictive lung disease in systemic sclerosis. Arthritis Rheum 1994; 37: 1283-9.

27) Steen VD, Lanz JK Jr, Conte C, Owens GR, Medsger TA Jr. Therapy for severe interstitial lung disease in systemic sclerosis. A retrospective study. **Arthritis Rheum** 1994; 37: 1290-6.

28) Harrison NK, Glanville AR, Strickland B, Haslam PL, Corrin B, Addis BJ, Lawrence R, Millar AB, Black CM, Turner-Warwick M. Pulmonary involvement in systemic sclerosis: the detection of early changes by thin section CT scan, bronchoalveolar lavage and 99mTc-DTPA clearance. **Respir Med** 1989; 83: 403-14.

29) Arroliga AC, Podell DN, Matthay RA. Pulmonary manifestations of scleroderma. J Thorac Imaging 1992; 7: 30-45.

30) Remy-Jardin M, Remy J, Wallaert B, Bataille D, Hatron PY. Pulmonary involvement in progressive systemic sclerosis: sequential evaluation with CT, pulmonary function tests, and bronchoalveolar lavage. **Radiology** 1993; 188: 499-506.

31) Austin JH, Muller NL, Friedman P Hansell DM, Naidich DP, Remy-Jardin M, Webb WR, Zerhouni EA. Glossary of terms for CT of the lungs: recommendations of the Nomenclature committee of the Fleischner Society. **Radiology** 1996; 200: 327-31.

32) Desai SR, Veeraraghavan S, Hansell DM, Nikolakopolou A, Goh NS, Nicholson AG, Colby TV, Denton CP, Black CM, du Bois RM, Wells AU. CT features of lung disease in patients with systemic sclerosis: comparison with idiopathic pulmonary fibrosis and nonspecific interstitial pneumonia. **Radiology** 2004; 232: 560-7.

33) Wells AU, Hansell DM, Corrin B, Harrison NK, Goldstraw P, Black CM, du Bois RM. High resolution computed tomography as a predictor of lung histology in systemic sclerosis. **Thorax** 1992; 47: 738-42.

34) Kazerooni EA, Martinez FJ, Flint A, Jamadar DA, Gross BH, Spizarny DL, Cascade PN, Whyte RI, Lynch JP 3rd, Toews G. Thin-section CT obtained at 10-mm increments versus limited three-level thin-section CT for idiopathic pulmonary fibrosis: correlation with pathologic scoring. AJR **Am J Roentgenol** 1997;169: 977-83.

35) Launay D, Remy-Jardin M, Michon-Pasturel U, Mastora I, Hachulla E, Lambert M, Delannoy V, Queyrel V, Duhamel A, Matran R, De Groote P, Hatron PY. High resolution computed tomography in fibrosing alveolitis associated with systemic sclerosis. **J Rheumatol** 2006; 33: 1789-801.

36) Highland KB, Silver RM. New developments in scleroderma interstitial lung disease. **Curr Opin Rheumatol** 2005; 17: 737-45.

37) Wells AU. High-resolution computed tomography and scleroderma lung disease. **Rheumatology (Oxford)** 2008; 47 Suppl 5: v59-61.

38) Tashkin DP, Elashoff R, Clements PJ, Goldin J, Roth MD, Furst DE, Arriola E, Silver R, Strange C, Bolster M, Seibold JR, Riley DJ, Hsu VM, Varga J, Schraufnagel DE, Theodore A, Simms R, Wise R, Wigley F, White B, Steen V, Read C, Mayes M, Parsley E, Mubarak K, Connolly MK, Golden J, Olman M, Fessler B, Rothfield N, Metersky M; Scleroderma Lung Study Research Group. Cyclophosphamide versus placebo in scleroderma lung disease. **N** Engl J Med 2006; 354: 2655-66.

39) King TE Jr, Safrin S, Starko KM, Brown KK, Noble PW, Raghu G, Schwartz DA. Analyses of efficacy end points in a controlled trial of interferon-gamma1b for idiopathic pulmonary fibrosis. **Chest** 2005; 127: 171-7.

40) Plastiras SC, Karadimitrakis SP, Ziakas PD, Vlachoyiannopoulos PG, Moutsopoulos HM, Tzelepis GE. Scleroderma lung: initial forced vital capacity as predictor of pulmonary function decline. **Arthritis Rheum** 2006; 55: 598-602.

41) Khanna D, Seibold JR, Wells A, Distler O, Allanore Y, Denton C, Furst DE. Systemic Sclerosis-Associated Interstitial Lung Disease: Lessons from Clinical Trials, Outcome Measures, and Future Study Design. **Curr Rheumatol Rev** 2010; 6: 138-44.

42) Roughton FJ, Forster RE. Relative importance of diffusion and chemical reaction rates in determining rate of exchange of gases in the human lung, with special reference to true diffusing capacity of pulmonary membrane and volume of blood in the lung capillaries. **J Appl Physiol** 1957; 11: 290-302.

43) Steen VD, Graham G, Conte C, Owens G, Medsger TA Jr. Isolated diffusing capacity reduction in systemic sclerosis. Arthritis Rheum 1992; 35: 765-70.

44) Steen V. Predictors of end stage lung disease in systemic sclerosis. Ann Rheum Dis 2003; 62: 97-9.

45) Steen V, Medsger TA Jr. Predictors of isolated pulmonary hypertension in patients with systemic sclerosis and limited cutaneous involvement. **Arthritis Rheum** 2003; 48: 516-22.

46) Chetta A, Aiello M, Foresi A, Marangio E, D'Ippolito R, Castagnaro A, Olivieri D. Relationship between outcome measures of six-minute walk test and baseline lung function in patients with interstitial lung disease. **Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis** 2001; 18: 170-5.

47) Villalba WO, Sampaio-Barros PD, Pereira MC, Cerqueira EM, Leme CA Jr, Marques-Neto JF, Paschoal IA. Sixminute walk test for the evaluation of pulmonary disease severity in scleroderma patients. **Chest** 2007; 131: 217-22.

48) Garin MC, Highland KB, Silver RM, Strange C. Limitations to the 6-minute walk test in interstitial lung disease and pulmonary hypertension in scleroderma. **J Rheumatol** 2009; 36: 330-6.

49) Buch MH, Denton CP, Furst DE, Guillevin L, Rubin LJ, Wells AU, Matucci-Cerinic M, Riemekasten G, Emery P, Chadha-Boreham H, Charef P, Roux S, Black CM, Seibold JR. Submaximal exercise testing in the assessment of interstitial lung disease secondary to systemic sclerosis: reproducibility and correlations of the 6-min walk test. **Ann Rheum Dis** 2007; 66: 169-73.

50) Avouac J, Kowal-Bielecka O, Pittrow D, Huscher D, Behrens F, Denton CP, Foeldvari I, Humbert M, Matucci-Cerinic M, Nash P, Opitz CF, Rubin LJ, Seibold JR, Distler O, Furst DE; EPOSS Group. Validation of the 6 min walk test according to the OMERACT filter: a systematic literature review by the EPOSS-OMERACT group. **Ann Rheum Dis** 2010; 69: 1360-3.

51) Silver RM, Miller KS, Kinsella MB, Smith EA, Schabel SI. Evaluation and management of scleroderma lung disease using bronchoalveolar lavage. **Am J Med**1990; 88: 470-6.

52) Warrick JH, Bhalla M, Schabel SI, Silver RM. High resolution computed tomography in early scleroderma lung disease. J Rheumatol 1991; 18: 1520-8.

53) Wells AU, Hansell DM, Rubens MB, Cullinan P, Haslam PL, Black CM, Du Bois RM. Fibrosing alveolitis in systemic sclerosis. Bronchoalveolar lavage findings in relation to computed tomographic appearance. **Am J Respir Crit Care Med** 1994; 150: 462-8.

54) Behr J, Vogelmeier C, Beinert T, Meurer M, Krombach F, König G, Fruhmann G. Bronchoalveolar lavage for evaluation and management of scleroderma disease of the lung. **Am J Respir Crit Care Med** 1996; 154: 400-6.

55) Witt C, Borges AC, John M, Fietze I, Baumann G, Krause A. Pulmonary involvement in diffuse cutaneous systemic sclerosis: broncheoalveolar fluid granulocytosis predicts progression of fibrosing alveolitis. **Ann Rheum Dis** 1999; 58: 635-40.

56) Strange C, Bolster MB, Roth MD, Silver RM, Theodore A, Goldin J, Clements P, Chung J, Elashoff RM, Suh R, Smith EA, Furst DE, Tashkin DP; Scleroderma Lung Study Research Group. Bronchoalveolar lavage and response to cyclophosphamide in scleroderma interstitial lung disease. **Am J Respir Crit Care Med** 2008; 177: 91-8.

57) Gustafsson R, Fredens K, Nettelbladt O, Hällgren R. Eosinophil activation in systemic sclerosis. Arthritis Rheum 1991; 34: 414-22.

58) Wells AU, Hansell DM, Haslam PL, Rubens MB, Cailes J, Black CM, du Bois RM. Bronchoalveolar lavage cellularity: lone cryptogenic fibrosing alveolitis compared with the fibrosing alveolitis of systemic sclerosis. **Am J Respir Crit Care Med** 1998; 157: 1474-82.

59) White B, Moore WC, Wigley FM, Xiao HQ, Wise RA. Cyclophosphamide is associated with pulmonary function and survival benefit in patients with scleroderma and alveolitis. **Ann Intern Med** 2000; 132: 947-54.

60) Schmidt K, Martinez-Gamboa L, Meier S, Witt C, Meisel C, Hanitsch LG, Becker MO, Huscher D, Burmester GR, Riemekasten G. Bronchoalveoloar lavage fluid cytokines and chemokines as markers and predictors for the outcome of interstitial lung disease in systemic sclerosis patients. **Arthritis Res Ther** 2009; 11: R111.

61) Rossi GA, Bitterman PB, Rennard SI, Ferrans VJ, Crystal RG. Evidence for chronic inflammation as a component of the interstitial lung disease associated with progressive systemic sclerosis. **Am Rev Respir Dis** 1985; 131: 612-7.

62) White B. Interstitial lung disease in scleroderma. Rheum Dis Clin North Am 2003; 29: 371-90.

63) Harrison NK, Myers AR, Corrin B, Soosay G, Dewar A, Black CM, Du Bois RM, Turner-Warwick M. Structural features of interstitial lung disease in systemic sclerosis. **Am Rev Respir Dis** 1991; 144: 706-13.

64) American Thoracic Society; European Respiratory Society. American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. Am J Respir Crit Care Med 2002; 165: 277-304.

65) Fujita J, Yoshinouchi T, Ohtsuki Y, Tokuda M, Yang Y, Yamadori I, Bandoh S, Ishida T, Takahara J, Ueda R. Non-specific interstitial pneumonia as pulmonary involvement of systemic sclerosis. **Ann Rheum Dis** 2001; 60: 281-3.

66) Kim DS, Yoo B, Lee JS, Kim EK, Lim CM, Lee SD, Koh Y, Kim WS, Kim WD, Colby TV, Kitiaichi M. The major histopathologic pattern of pulmonary fibrosis in scleroderma is nonspecific interstitial pneumonia. **Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis** 2002; 19: 121-7.

67) Bouros D, Wells AU, Nicholson AG, Colby TV, Polychronopoulos V, Pantelidis P, Haslam PL, Vassilakis DA, Black CM, du Bois RM. Histopathologic subsets of fibrosing alveolitis in patients with systemic sclerosis and their relationship to outcome. **Am J Respir Crit Care Med** 2002; 165: 1581-6.

68) Takahashi H, Kuroki Y, Tanaka H, Saito T, Kurokawa K, Chiba H, Sagawa A, Nagae H, Abe S. Serum levels of surfactant proteins A and D are useful biomarkers for interstitial lung disease in patients with progressive systemic sclerosis. **Am J Respir Crit Care Med** 2000; 162: 258-63.

69) Hant FN, Ludwicka-Bradley A, Wang HJ, Li N, Elashoff R, Tashkin DP, Silver RM; Scleroderma Lung Study Research Group. Surfactant protein D and KL-6 as serum biomarkers of interstitial lung disease in patients with scleroderma. **J Rheumatol** 2009; 36: 773-80.

70) Asano Y, Ihn H, Yamane K, Yazawa N, Kubo M, Fujimoto M, Tamaki K. Clinical significance of surfactant protein D as a serum marker for evaluating pulmonary fibrosis in patients with systemic sclerosis. **Arthritis Rheum** 2001; 44: 1363-9.

71) Maeda M, Ichiki Y, Aoyama Y, Kitajima Y. Surfactant protein D (SP-D) and systemic scleroderma (SSc). J Dermatol 2001; 28: 467-74.

72) Yanaba K, Hasegawa M, Hamaguchi Y, Fujimoto M, Takehara K, Sato S. Longitudinal analysis of serum KL-6 levels in patients with systemic sclerosis: association with the activity of pulmonary fibrosis. **Clin Exp Rheumatol** 2003; 21: 429-36.

73) Meyer O. Prognostic markers for systemic sclerosis. Joint Bone Spine 2006; 73: 490-4.

74) Castro SV, Jimenez SA. Biomarkers in systemic sclerosis. Biomark Med 2010; 4: 133-47.

75) Kodera M, Hasegawa M, Komura K, Yanaba K, Takehara K, Sato S. Serum pulmonary and activationregulated chemokine/CCL18 levels in patients with systemic sclerosis: a sensitive indicator of active pulmonary fibrosis. **Arthritis Rheum** 2005; 52: 2889-96.

76) Prasse A, Pechkovsky DV, Toews GB, Schäfer M, Eggeling S, Ludwig C, Germann M, Kollert F, Zissel G, Müller-Quernheim J. CCL18 as an indicator of pulmonary fibrotic activity in idiopathic interstitial pneumonias and systemic sclerosis. Arthritis Rheum 2007; 56: 1685-93.

77) Tiev KP, Hua-Huy T, Kettaneh A, Gain M, Duong-Quy S, Tolédano C, Cabane J, Dinh-Xuan AT. Serum CC chemokine ligand-18 predicts lung disease worsening in systemic sclerosis. **Eur Respir J** 2011 Jul 20. [Epub ahead of print].

78) Kuryliszyn-Moskal A, Klimiuk PA, Sierakowski S. Soluble adhesion molecules (sVCAM-1, sE-selectin), vascular endothelial growth factor (VEGF) and endothelin-1 in patients with systemic sclerosis: relationship to organ systemic involvement. **Clin Rheumatol** 2005; 24: 111-6.

79) Vancheeswaran R, Magoulas T, Efrat G, Wheeler-Jones C, Olsen I, Penny R, Black CM. Circulating endothelin-1 levels in systemic sclerosis subsets--a marker of fibrosis or vascular dysfunction? **J Rheumatol** 1994; 21: 1838-44.

80) Kumánovics G, Minier T, Radics J, Pálinkás L, Berki T, Czirják L. Comprehensive investigation of novel serum markers of pulmonary fibrosis associated with systemic sclerosis and dermato/polymyositis. **Clin Exp Rheumatol** 2008; 26: 414-20.

81) Wells AU, Rubens MB, du Bois RM, Hansell DM. Functional impairment in fibrosing alveolitis: relationship to reversible disease on thin section computed tomography. **Eur Respir J** 1997; 10: 280-5.

82) Kharitonov SA, Cailes JB, Black CM, du Bois RM, Barnes PJ. Decreased nitric oxide in the exhaled air of patients with systemic sclerosis with pulmonary hypertension. **Thorax** 1997; 52: 1051-5.

83) Fajac I, Kahan A, Menkès CJ, Dessanges JF, Dall'Ava-Santucci J, Dinh-Xuan AT. Increased nitric oxide in exhaled air in patients with systemic sclerosis. **Clin Exp Rheumatol** 1998; 16: 547-52.

84) Paredi P, Kharitonov SA, Loukides S, Pantelidis P, du Bois RM, Barnes PJ. Exhaled nitric oxide is increased in active fibrosing alveolitis. **Chest** 1999; 115: 1352-6.

85) Moodley YP, Lalloo UG. Exhaled nitric oxide is elevated in patients with progressive systemic sclerosis without interstitial lung disease. **Chest** 2001; 119: 1449-54.

86) Tiev KP, Le-Dong NN, Duong-Quy S, Hua-Huy T, Cabane J, Dinh-Xuan AT. Exhaled nitric oxide, but not serum nitrite and nitrate, is a marker of interstitial lung disease in systemic sclerosis. **Nitric Oxide** 2009; 20: 200-6.

87) Abraham D, Distler O. How does endothelial cell injury start? The role of endothelin in systemic sclerosis. Arthritis Res Ther 2007; 9 Suppl 2: S2.

88) Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. J Clin Invest 2007; 117: 524-9.

89) Sakkas LI, Xu B, Artlett CM and al. Oligoclonal T cell expansion in the skin of patients with systemic sclerosis. J Immunol 2002; 168: 3649-59.

90) Dooley, B. Gao, N. Bradley, D.J. Abraham, C.M. Black, M. Jacobs, K.R. Bruckdorfer, Abnormal nitric oxide metabolism in systemic sclerosis: increased levels of nitrated proteins and asymmetric dimethylarginine. **Rheumatology (Oxford)** 2006: 45; 676-84.

91) Distler JH, Strapatsas T, Huscher D, Dees C, Akhmetshina A, Kiener HP, Tarner IH, Maurer B, Walder M, Michel B, Gay S, Smolen JS, Müller-Ladner U, Schett G, Distler O. Dysbalance of angiogenic and angiostatic mediators in patients with mixed connective tissue disease. **Ann Rheum Dis** 2011; 70: 1197-202.

92) Cambrey AD, Harrison NK, Dawes KE, Southcott AM, Black CM, du Bois RM, Laurent GJ, McAnulty RJ. Increased levels of endothelin-1 in bronchoalveolar lavage fluid from patients with systemic sclerosis contribute to fibroblast mitogenic activity in vitro. **Am J Respir Cell Mol Biol** 1994; 11: 439-45.

93) Shi-Wen X, Denton CP, Dashwood MR, Holmes AM, Bou-Gharios G, Pearson JD, Black CM, Abraham DJ. Fibroblast matrix gene expression and connective tissue remodeling: role of endothelin-1. J Invest Dermatol 2001; 116: 417-25.

94) Horstmeyer A, Licht C, Scherr G, Eckes B, Krieg T. Signalling and regulation of collagen I synthesis by ET-1 and TGF-beta1. **FEBS J** 2005; 272: 6297-309.

95) Park SH, Saleh D, Giaid A, Michel RP. Increased endothelin-1 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis and the effect of an endothelin receptor antagonist. **Am J Respir Crit Care Med** 1997; 156: 600-8.

96) Seibold JR, Denton CP, Furst DE, Guillevin L, Rubin LJ, Wells A, Matucci Cerinic M, Riemekasten G, Emery P, Chadha-Boreham H, Charef P, Roux S, Black CM. Randomized, prospective, placebo-controlled trial of bosentan in interstitial lung disease secondary to systemic sclerosis. **Arthritis Rheum** 2010; 62: 2101-8.

97) Ames PR, Lupoli S, Alves J, Atsumi T, Edwards C, Iannaccone L, Khamashta MA, Hughes GR, Brancaccio V. The coagulation/fibrinolysis balance in systemic sclerosis: evidence for a haematological stress syndrome. **Br J Rheumatol** 1997; 36: 1045-50.

98) Ohba T, McDonald JK, Silver RM, Strange C, LeRoy EC, Ludwicka A. Scleroderma bronchoalveolar lavage fluid contains thrombin, a mediator of human lung fibroblast proliferation via induction of platelet-derived growth factor alpha-receptor. **Am J Respir Cell Mol Biol** 1994; 10: 405-12.

99) Bogatkevich GS, Tourkina E, Silver RM, Ludwicka-Bradley A. Thrombin differentiates normal lung fibroblasts to a myofibroblast phenotype via the proteolytically activated receptor-1 and a protein kinase C-dependent pathway. J Biol Chem 2001; 276: 45184-92.

100) Bogatkevich GS, Tourkina E, Abrams CS, Harley RA, Silver RM, Ludwicka-Bradley A. Contractile activity and smooth muscle alpha-actin organization in thrombin-induced human lung myofibroblasts. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** 2003; 285: L334-43.

101) Bogatkevich GS, Ludwicka-Bradley A, Nietert PJ, Akter T, van Ryn J, Silver RM. Antiinflammatory and antifibrotic effects of the oral direct thrombin inhibitor dabigatran etexilate in a murine model of interstitial lung disease. **Arthritis Rheum** 2011; 63: 1416-25.

102) Zuber JP, Spertini F. Immunological basis of systemic sclerosis. **Rheumatology (Oxford)** 2006; 45 Suppl 3: iii23-5.

103) Geyer M, Müller-Ladner U. The pathogenesis of systemic sclerosis revisited. **Clin Rev Allergy Immunol** 2011; 40: 92-103.

104) Bolster MB, Ludwicka A, Sutherland SE, Strange C, Silver RM. Cytokine concentrations in bronchoalveolar lavage fluid of patients with systemic sclerosis. **Arthritis Rheum** 1997; 40: 743-51.

105) Atamas SP, White B. The role of chemokines in the pathogenesis of scleroderma. **Curr Opin Rheumatol** 2003; 15: 772-7.

106) Atamas SP, White B. Cytokine regulation of pulmonary fibrosis in scleroderma. Cytokine Growth Factor Rev 2003; 14: 537-50.

107) Atamas SP, Yurovsky VV, Wise R, Wigley FM, Goter Robinson CJ, Henry P, Alms WJ, White B. Production of type 2 cytokines by CD8+ lung cells is associated with greater decline in pulmonary function in patients with systemic sclerosis. **Arthritis Rheum** 1999; 42: 1168-78.

108) Postlethwaite AE, Seyer JM. Fibroblast chemotaxis induction by human recombinant interleukin-4. Identification by synthetic peptide analysis of two chemotactic domains residing in amino acid sequences 70-88 and 89-122. J Clin Invest 1991; 87: 2147-52.

109) Atamas SP, White B. Interleukin 4 in systemic sclerosis: not just an increase. **Clin Diagn Lab Immunol** 1999; 6: 658-9.

110) Rankin JA, Picarella DE, Geba GP, Temann UA, Prasad B, DiCosmo B, Tarallo A, Stripp B, Whitsett J, Flavell RA. Phenotypic and physiologic characterization of transgenic mice expressing interleukin 4 in the lung: lymphocytic and eosinophilic inflammation without airway hyperreactivity. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1996; 93: 7821-5.

111) Majumdar S, Li D, Ansari T, Pantelidis P, Black CM, Gizycki M, du Bois RM, Jeffery PK. Different cytokine profiles in cryptogenic fibrosing alveolitis and fibrosing alveolitis associated with systemic sclerosis: a quantitative study of open lung biopsies. **Eur Respir J** 1999; 14: 251-7.

112) Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. J Pathol 2008; 214: 199-210.

113) Kräling BM, Maul GG, Jimenez SA. Mononuclear cellular infiltrates in clinically involved skin from patients with systemic sclerosis of recent onset predominantly consist of monocytes/macrophages. **Pathobiology** 1995; 63: 48-56.

114) Higashi-Kuwata N, Jinnin M, Makino T, Fukushima S, Inoue Y, Muchemwa FC, Yonemura Y, Komohara Y, Takeya M, Mitsuya H, Ihn H. Characterization of monocyte/macrophage subsets in the skin and peripheral blood derived from patients with systemic sclerosis. **Arthritis Res Ther** 2010; 12: R128.

115) Zhang Y, McCormick LL, Desai SR, Wu C, Gilliam AC. Murine sclerodermatous graft-versus-host disease, a model for human scleroderma: cutaneous cytokines, chemokines, and immune cell activation. J Immunol 2002; 168: 3088-98.

116) Chiaramonte MG, Donaldson DD, Cheever AW, Wynn TA. An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response. J Clin Invest 1999; 104: 777-85.

117) Wangoo A, Sparer T, Brown IN, Snewin VA, Janssen R, Thole J, Cook HT, Shaw RJ, Young DB. Contribution of Th1 and Th2 cells to protection and pathology in experimental models of granulomatous lung disease. J Immunol 2001; 166: 3432-9.

118) Lakos G, Melichian D, Wu M, Varga J. Increased bleomycin-induced skin fibrosis in mice lacking the Th1-specific transcription factor T-bet. **Pathobiology** 2006; 73: 224-37.

119) Tan FK, Zhou X, Mayes MD, Gourh P, Guo X, Marcum C, Jin L, Arnett FC Jr. Signatures of differentially regulated interferon gene expression and vasculotrophism in the peripheral blood cells of systemic sclerosis patients. **Rheumatology (Oxford)** 2006; 45: 694-702.

120) Mavalia C, Scaletti C, Romagnani P, Carossino AM, Pignone A, Emmi L, Pupilli C, Pizzolo G, Maggi E, Romagnani S. Type 2 helper T-cell predominance and high CD30 expression in systemic sclerosis. **Am J Pathol** 1997; 151: 1751-8.

121) Silver RM. Interstitial lung disease of systemic sclerosis. Int Rev Immunol 1995; 12: 281-91.

122) Hasegawa M, Fujimoto M, Kikuchi K, Takehara K. Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4), IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis. J Rheumatol 1997; 24: 328-32.

123) Sato S, Hasegawa M, Takehara K. Serum levels of interleukin-6 and interleukin-10 correlate with total skin thickness score in patients with systemic sclerosis. J Dermatol Sci 2001; 27: 140-6.

124) Spadaro A, Rinaldi T, Riccieri V, Taccari E, Valesini G. Interleukin-13 in autoimmune rheumatic diseases: relationship with the autoantibody profile. **Clin Exp Rheumatol** 2002; 20: 213-6.

125) Riccieri V, Rinaldi T, Spadaro A, Scrivo R, Ceccarelli F, Franco MD, Taccari E, Valesini G. Interleukin-13 in systemic sclerosis: relationship to nailfold capillaroscopy abnormalities. **Clin Rheumatol** 2003; 22: 102-6.

126) Romano C, Sellitto A, De Fanis U, Rossiello R, Rossiello L, Giunta R, Lucivero G. A scleroderma-like cutaneous syndrome associated with a marked Th2-type immune response occurring after a prosthetic joint implant. J Clin Rheumatol 2009; 15: 133-7.

127) Needleman BW, Wigley FM, Stair RW. Interleukin-1, interleukin-2, interleukin-4, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha, and interferon-gamma levels in sera from patients with scleroderma. **Arthritis Rheum** 1992; 35: 67-72.

128) Sato S, Hanakawa H, Hasegawa M, Nagaoka T, Hamaguchi Y, Nishijima C, Komatsu K, Hirata A, Takehara K. Levels of interleukin 12, a cytokine of type 1 helper T cells, are elevated in sera from patients with systemic sclerosis. J Rheumatol 2000; 27: 2838-42.

129) Yanaba K, Yoshizaki A, Muroi E, Hara T, Ogawa F, Shimizu K, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K, Sato S. CCL13 is a promising diagnostic marker for systemic sclerosis. **Br J Dermatol** 2010; 162: 332-6.

130) Abraham DJ, Krieg T, Distler J, Distler O. Overview of pathogenesis of systemic sclerosis. **Rheumatology** (Oxford) 2009; 48 Suppl 3: iii3-7.

131) Baraut J, Michel L, Verrecchia F, Farge D. Relationship between cytokine profiles and clinical outcomes in patients with systemic sclerosis. **Autoimmun Rev** 2010; 10: 65-73.

132) Derk CT, Jimenez SA. Systemic sclerosis: current views of its pathogenesis. Autoimmun Rev 2003; 2: 181-91.

133) Hasegawa M. B lymphocytes: shedding new light on the pathogenesis of systemic sclerosis. J Dermatol 2010; 37: 3-10.

134) Baroni SS, Santillo M, Bevilacqua F, Luchetti M, Spadoni T, Mancini M, Fraticelli P, Sambo P, Funaro A, Kazlauskas A, Avvedimento EV, Gabrielli A. Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. **N Engl J Med** 2006; 354: 2667-76.

135) Carvalho D, Savage CO, Black CM, Pearson JD. IgG antiendothelial cell autoantibodies from scleroderma patients induce leukocyte adhesion to human vascular endothelial cells in vitro. Induction of adhesion molecule expression and involvement of endothelium-derived cytokines. J Clin Invest 1996; 97: 111-9.

136) Del Papa N, Quirici N, Scavullo C, Gianelli U, Corti L, Vitali C, Ferri C, Giuggioli D, Manfredi A, Maglione W, Onida F, Colaci M, Bosari S, Lambertenghi Deliliers G. Antiendothelial cell antibodies induce apoptosis of bone marrow endothelial progenitors in systemic sclerosis. J Rheumatol 2010; 37: 2053-63.

137) Ronda N, Raschi E, Testoni C, Borghi MO, Gatti R, Dayer JM, Orlandini G, Chizzolini C, Meroni PL. Antifibroblast antibodies in systemic sclerosis. Isr Med Assoc J 2002; 4 (11 Suppl): 858-64.

138) Hasegawa M, Hamaguchi Y, Yanaba K, Bouaziz JD, Uchida J, Fujimoto M, Matsushita T, Matsushita Y, Horikawa M, Komura K, Takehara K, Sato S, Tedder TF. B-lymphocyte depletion reduces skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse model for systemic sclerosis. **Am J Pathol** 2006; 169: 954-66.

139) Matsushita T, Hasegawa M, Yanaba K, Kodera M, Takehara K, Sato S. Elevated serum BAFF levels in patients with systemic sclerosis: enhanced BAFF signaling in systemic sclerosis B lymphocytes. **Arthritis Rheum** 2006; 54:192-201.

140) LeRoy EC. Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblasts in vitro: a possible defect in the regulation or activation of the scleroderma fibroblast. **J Clin Invest** 1974; 54: 880-9.

141) Kikuchi K, Yamakage A, Smith EA, LeRoy EC, Trojanowska M. Differential modulation of bFGF receptors by TGF-beta in adult skin, scleroderma skin, and newborn foreskin fibroblasts. **J Invest Dermatol** 1992; 99: 201-5.

142) Yamakage A, Kikuchi K, Smith EA, LeRoy EC, Trojanowska M. Selective upregulation of platelet-derived growth factor alpha receptors by transforming growth factor beta in scleroderma fibroblasts. **J Exp Med** 1992; 175: 1227-34.

143) Kawakami T, Ihn H, Xu W, Smith E, LeRoy C, Trojanowska M. Increased expression of TGF-beta receptors by scleroderma fibroblasts: evidence for contribution of autocrine TGF-beta signaling to scleroderma phenotype. J Invest Dermatol 1998; 110: 47-51.

144) Jinnin M, Ihn H, Mimura Y, Asano Y, Tamaki K. Potential regulatory elements of the constitutive upregulated alpha2(I) collagen gene in scleroderma dermal fibroblasts. **Biochem Biophys Res Commun** 2006; 343: 904-9.

145) Ihn H. Autocrine TGF-beta signaling in the pathogenesis of systemic sclerosis. J Dermatol Sci 2008; 49: 103-13.

146) Denton CP, Shi-Wen X, Sutton A, Abraham DJ, Black CM, Pearson JD. Scleroderma fibroblasts promote migration of mononuclear leucocytes across endothelial cell monolayers. **Clin Exp Immunol** 1998; 114: 293-300.

147) Galindo M, Santiago B, Rivero M, Rullas J, Alcami J, Pablos JL. Chemokine expression by systemic sclerosis fibroblasts: abnormal regulation of monocyte chemoattractant protein 1 expression. Arthritis Rheum 2001; 44: 1382-6.

148) Jelaska A, Korn JH. Role of apoptosis and transforming growth factor beta1 in fibroblast selection and activation in systemic sclerosis. **Arthritis Rheum** 2000; 43: 2230-9.

149) Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan M, Cerami A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. **Mol Med** 1994; 1: 71-81.

150) Rajkumar VS, Howell K, Csiszar K, Denton CP, Black CM, Abraham DJ. Shared expression of phenotypic markers in systemic sclerosis indicates a convergence of pericytes and fibroblasts to a myofibroblast lineage in fibrosis. **Arthritis Res Ther** 2005; 7: R1113-23.

151) Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. J Clin Invest 2003; 112: 1776-84.

152) Manetti M, Guiducci S, Matucci-Cerinic M. The origin of the myofibroblast in fibroproliferative vasculopathy: does the endothelial cell steer the pathophysiology of systemic sclerosis? **Arthritis Rheum** 2011; 63: 2164-7.

153) Cipriani P, Franca Milia A, Liakouli V, Pacini A, Manetti M, Marrelli A, Toscano A, Pingiotti E, Fulminis A, Guiducci S, Perricone R, Kahaleh B, Matucci-Cerinic M, Ibba-Manneschi L, Giacomelli R. Differential expression of stromal cell-derived factor 1 and its receptor CXCR4 in the skin and endothelial cells of systemic sclerosis patients: Pathogenetic implications. **Arthritis Rheum** 2006; 54: 3022-33.

154) Phillips RJ, Burdick MD, Hong K, Lutz MA, Murray LA, Xue YY, Belperio JA, Keane MP, Strieter RM. Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. J Clin Invest 2004; 114: 438-46.

155) Guarino M, Tosoni A, Nebuloni M. Direct contribution of epithelium to organ fibrosis: epithelial-mesenchymal transition. **Hum Pathol** 2009; 40: 1365-76.

156) Varga J. Scleroderma and Smads: dysfunctional Smad family dynamics culminating in fibrosis. Arthritis Rheum 2002; 46: 1703-13.

157) Rudnicka L, Varga J, Christiano AM, Iozzo RV, Jimenez SA, Uitto J. Elevated expression of type VII collagen in the skin of patients with systemic sclerosis. Regulation by transforming growth factor-beta. J Clin Invest 1994; 93: 1709-15.

158) Shi-wen X, Pennington D, Holmes A, Leask A, Bradham D, Beauchamp JR, Fonseca C, du Bois RM, Martin GR, Black CM, Abraham DJ. Autocrine overexpression of CTGF maintains fibrosis: RDA analysis of fibrosis genes in systemic sclerosis. **Exp Cell Res** 2000; 259: 213-24.

159) Ihn H, Yamane K, Kubo M, Tamaki K. Blockade of endogenous transforming growth factor beta signaling prevents up-regulated collagen synthesis in scleroderma fibroblasts: association with increased expression of transforming growth factor beta receptors. **Arthritis Rheum** 2001; 44: 474-80.

160) Ihn H, Yamane K, Asano Y, Jinnin M, Tamaki K. Constitutively phosphorylated Smad3 interacts with Sp1 and p300 in scleroderma fibroblasts. **Rheumatology (Oxford)** 2006; 45: 157-65.

161) Mori Y, Chen SJ, Varga J. Expression and regulation of intracellular SMAD signaling in scleroderma skin fibroblasts. Arthritis Rheum 2003; 48: 1964-78.

162) Takagawa S, Lakos G, Mori Y, Yamamoto T, Nishioka K, Varga J. Sustained activation of fibroblast transforming growth factor-beta/Smad signaling in a murine model of scleroderma. J Invest Dermatol 2003; 121: 41-50.

163) Trojanowska M. Role of PDGF in fibrotic diseases and systemic sclerosis. **Rheumatology (Oxford)** 2008; 47 Suppl 5: v2-4.

164) Sakkas LI, Chikanza IC, Platsoucas CD. Mechanisms of Disease: the role of immune cells in the pathogenesis of systemic sclerosis. **Nat Clin Pract Rheumatol** 2006; 2: 679-85.

165) Yamamoto T. Scleroderma--pathophysiology. Eur J Dermatol 2009; 19: 14-24.

166) Yamamoto T. Chemokines and chemokine receptors in scleroderma. **Int Arch Allergy Immunol** 2006; 140: 345-56.

167) Gharaee-Kermani M, Denholm EM, Phan SH. Costimulation of fibroblast collagen and transforming growth factor beta1 gene expression by monocyte chemoattractant protein-1 via specific receptors. **J Biol Chem** 1996; 271: 17779-84.

168) Yamamoto T, Eckes B, Mauch C, Hartmann K, Krieg T. Monocyte chemoattractant protein-1 enhances gene expression and synthesis of matrix metalloproteinase-1 in human fibroblasts by an autocrine IL-1 alpha loop. J Immunol 2000;164: 6174-9.

169) Hasegawa M, Sato S, Takehara K. Augmented production of chemokines (monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1alpha(MIP-1alpha) and MIP-1beta) in patients with systemic sclerosis: MCP-1 and MIP-1alpha may be involved in the development of pulmonary fibrosis. **Clin Exp Immunol** 1999; 117: 159-65.

170) Yamamoto T, Eckes B, Krieg T. High expression and autoinduction of monocytes chemoattractant protein-1 in scleroderma fibroblasts. **Eur J Immunol** 2001; 31: 2936-41.

171) Carulli MT, Ong VH, Ponticos M, Shiwen X, Abraham DJ, Black CM, Denton CP. Chemokine receptor CCR2 expression by systemic sclerosis fibroblasts: evidence for autocrine regulation of myofibroblast differentiation. **Arthritis Rheum** 2005; 52: 3772-82.

172) Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev 2002; 82: 47-95.

173) Kinnula VL, Myllärniemi M. Oxidant-antioxidant imbalance as a potential contributor to the progression of human pulmonary fibrosis. **Antioxid Redox Signal** 2008; 10: 727-38.

174) Sambo P, Baroni SS, Luchetti M, Paroncini P, Dusi S, Orlandini G, Gabrielli A.Oxidative stress in scleroderma: maintenance of scleroderma fibroblast phenotype by the constitutive up-regulation of reactive oxygen species generation through the NADPH oxidase complex pathway. **Arthritis Rheum** 2001; 44: 2653-64.

175) Murrell DF. A radical proposal for the pathogenesis of scleroderma. J Am Acad Dermatol 1993; 28: 78-85.

176) Svegliati S, Cancello R, Sambo P, Luchetti M, Paroncini P, Orlandini G, Discepoli G, Paterno R, Santillo M, Cuozzo C, Cassano S, Avvedimento EV, Gabrielli A. Platelet-derived growth factor and reactive oxygen species (ROS)regulate Ras protein levels in primary human fibroblasts via ERK1/2. Amplification of ROS and Ras in systemic sclerosis fibroblasts. J Biol Chem 2005; 280: 36474-82.

177) Dooley A, Shi-Wen X, Aden N, Tranah T, Desai N, Denton CP, Abraham DJ, Bruckdorfer R. Modulation of collagen type I, fibronectin and dermal fibroblast function and activity, in systemic sclerosis by the antioxidant epigallocatechin-3-gallate. **Rheumatology (Oxford)** 2010; 49: 2024-36.

178) Yoshizaki A, Yanaba K, Ogawa A, Iwata Y, Ogawa F, Takenaka M, Shimizu K, Asano Y, Kadono T, Sato S. The specific free radical scavenger edaravone suppresses fibrosis in the bleomycin-induced and tight skin mouse models of systemic sclerosis. **Arthritis Rheum** 2011; 63: 3086-97.

179) Servettaz A, Goulvestre C, Kavian N, Nicco C, Guilpain P, Chéreau C, Vuiblet V, Guillevin L, Mouthon L, Weill B, Batteux F. Selective oxidation of DNA topoisomerase 1 induces systemic sclerosis in the mouse. J Immunol 2009; 182: 5855-64.

180) Batteux F, Kavian N, Servettaz A. New insights on chemically induced animal models of systemic sclerosis. **Curr Opin Rheumatol**; 23: 511-8.

181) Servettaz A, Kavian N, Nicco C, Deveaux V, Chéreau C, Wang A, Zimmer A, Lotersztajn S, Weill B, Batteux F. Targeting the cannabinoid pathway limits the development of fibrosis and autoimmunity in a mouse model of systemic sclerosis. **Am J Pathol** 2010; 177: 187-96.

182) Kavian N, Servettaz A, Mongaret C, Wang A, Nicco C, Chéreau C, Grange P, Vuiblet V, Birembaut P, Diebold MD, Weill B, Dupin N, Batteux F. Targeting ADAM-17/notch signaling abrogates the development of systemic sclerosis in a murine model. **Arthritis Rheum** 2010; 62:3477-87.

183) Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature** 1980; 288: 373-6.

184) Bove PF, van der Vliet A. Nitric oxide and reactive nitrogen species in airway epithelial signaling and inflammation. Free Radic Biol Med 2006; 41: 515-27.

185) Lee, J.; Ryu, H.; Ferrante, R. J.; Morris, S. M. Jr.; Ratan, R. R. Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 2003; 100: 4843-8.

186) Pullamsetti SS, Savai R, Dumitrascu R, Dahal BK, Wilhelm J, Konigshoff M, Zakrzewicz D, Ghofrani HA, Weissmann N, Eickelberg O, Guenther A, Leiper J, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT. The role of dimethylarginine dimethylaminohydrolase in idiopathic pulmonary fibrosis. **Sci Transl Med** 2011; 3: 87ra53.

187) Förstermann U, Li H. Therapeutic effect of enhancing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling. **Br J Pharmacol** 2011; 164: 213-23.

188) Janssen LJ, Premji M, Lu-Chao H, Cox G, Keshavjee S. NO(+) but not NO radical relaxes airway smooth muscle via cGMP-independent release of internal Ca(2+). Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2000; 278: L899-905.

189) Karupiah G, Xie QW, Buller RM, Nathan C, Duarte C, MacMicking JD. Inhibition of viral replication by interferon-gamma-induced nitric oxide synthase. **Science** 1993; 261: 1445-8.

190) Wink DA, Kasprzak KS, Maragos CM, Elespuru RK, Misra M, Dunams TM, Cebula TA, Koch WH, Andrews AW, Allen JS, et al. DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. **Science** 1991; 254: 1001-3.

191) Saura M, Zaragoza C, McMillan A, Quick RA, Hohenadl C, Lowenstein JM, Lowenstein CJ. An antiviral mechanism of nitric oxide: inhibition of a viral protease. **Immunity** 1999; 10: 21-8.

192) Denis M. Interferon-gamma-treated murine macrophages inhibit growth of tubercle bacilli via the generation of reactive nitrogen intermediates. **Cell Immunol** 1991; 132: 150-7.

193) Ishida A, Sasaguri T, Kosaka C, Nojima H, Ogata J. Induction of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21(Sdi1/Cip1/Waf1) by nitric oxide-generating vasodilator in vascular smooth muscle cells. J Biol Chem 1997; 272: 10050-7.

194) RayChaudhury A, Frischer H & Malik AB. Inhibition of endothelial cell proliferation and bFGF-induced phenotypic modulation by nitric oxide. **J Cell Biochem** 1996; 63: 125-34.

195) Estrada C, Gomez C, Martın-Nieto J, De Frutos T, Jimenez A, Villalobo A. Nitric oxide reversibly inhibits the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. **Biochem J 1997**; 326: 369-76.

196) Ruano MJ, Hernandez-Hernando S, Jimenez A, Estrada C, Villalobo A. Nitric oxide-induced epidermal growth factor-dependent phosphorylations in A431 tumour cells. **Eur J Biochem** 2003; 270: 1828-37.

197) Du M, Islam MM, Lin L, Ohmura Y, Moriyama Y, Fujimura S. Promotion of proliferation of murine BALB/C3T3 fibroblasts mediated by nitric oxide at lower concentrations. **Biochem Mol Biol Int** 1997; 41: 625-31.

198) Luczak K, Balcerczyk A, Soszynski M, Bartosz G. Low concentration of oxidant and nitric oxide donors stimulate proliferation of human endothelial cells in vitro. **Cell Biol Int** 2004; 28: 483-6.

199) Dupuy PM, Shore SA, Drazen JM, Frostell C, Hill WA, Zapol WM. Bronchodilator action of inhaled nitric oxide in guinea pigs. J Clin Invest 1992; 90: 421-8.

200) Högman M, Frostell CG, Hedenström H, Hedenstierna G. Inhalation of nitric oxide modulates adult human bronchial tone. **Am Rev Respir Dis** 1993; 148: 1474-8.

201) Shaul PW, North AJ, Wu LC, Wells LB, Brannon TS, Lau KS, Michel T, Margraf LR, Star RA. Endothelial nitric oxide synthase is expressed in cultured human bronchiolar epithelium. J Clin Invest 1994; 94: 2231-6.

202) Pechkovsky DV, Zissel G, Goldmann T, Einhaus M, Taube C, Magnussen H, Schlaak M, Müller-Quernheim J. Pattern of NOS2 and NOS3 mRNA expression in human A549 cells and primary cultured AEC II. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** 2002; 282: L684-92.

203) Li D, Shirakami G, Zhan X, Johns RA. Regulation of ciliary beat frequency by the nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate signaling pathway in rat airway epithelial cells. **Am J Respir Cell Mol Biol** 2000; 23: 175-81.

204) Lane C, Knight D, Burgess S, Franklin P, Horak F, Legg J, Moeller A, Stick S. Epithelial inducible nitric oxide synthase activity is the major determinant of nitric oxide concentration in exhaled breath. **Thorax** 2004; 59: 757-60.

205) Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman SA. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. **Pharmacol Rev** 2000; 52: 375-414.

206) Behrends S, Kempfert J, Mietens A, Koglin M, Scholz H, Middendorff R. Developmental changes of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase expression in pulmonary arteries. **Biochem Biophys Res Commun** 2001; 283: 883-7.

207) Schmidt K, Schrammel A, Koesling D, Mayer B. Molecular mechanisms involved in the synergistic activation of soluble guanylyl cyclase by YC-1 and nitric oxide in endothelial cells. **Mol Pharmacol** 2001; 59: 220-4.

208) Pal B, Kitagawa T. Binding of YC-1/BAY 41-2272 to soluble guanylate cyclase: A new perspective to the mechanism of activation. **Biochem Biophys Res Commun** 2010; 397: 375-9.

209) Friebe A, Koesling D. Mechanism of YC-1-induced activation of soluble guanylyl cyclase. **Mol Pharmacol** 1998; 53: 123-7.

210) Galle J, Zabel U, Hubner U, Hatzelmann A, Wagner B, Wanner C, Schmidt HH. Effects of the soluble guanylyl cyclase activator, YC-1, on vascular tone, cyclic GMP levels and phosphodiesterase activity. **Br J Pharmacol** 1999; 127: 195-203.

211) Rybalkin SD, Yan C, Bornfeldt KE, Beavo JA. Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. **Circ Res** 2003; 93: 280-91.

212) Hanson KA, Ziegler JW, Rybalkin SD, Miller JW, Abman SH, Clarke WR. Chronic pulmonary hypertension increases fetal lung cGMP phosphodiesterase activity. **Am J Physiol** 1998; 275: L931-41.

213) Thusu KG, Morin FC, Russel JA, Steinhorn RH. The cGMP phosphodiesterase inhibitor Zaprinast enhances the effect of nitric oxide. **Am J Respir Crit Care Med** 1995; 152: 1605-10.

214) Gustafsson LE, Leone AM, Persson MG, Wiklund NP, Moncada S. Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans. **Biochem Biophys Res Commun** 1991; 181: 852-7.

215) Barnes PJ, Dweik RA, Gelb AF, Gibson PG, George SC, Grasemann H, Pavord ID, Ratjen F, Silkoff PE, Taylor DR, Zamel N. Exhaled nitric oxide in pulmonary diseases: a comprehensive review. **Chest** 2010; 138: 682-92.

216) Belvisi MG, Stretton CD, Yacoub M, Barnes PJ. Nitric oxide is the endogenous neurotransmitter of bronchodilator nerves in humans. **Eur J Pharmacol** 1992; 210: 221-2.

217) Girgis RE, Champion HC, Diette GB, Johns RA, Permutt S, Sylvester JT. Decreased exhaled nitric oxide in pulmonary arterial hypertension: response to bosentan therapy. **Am J Respir Crit Care Med** 2005; 172: 352-7.

218) Guo FH, De Raeve HR, Rice TW, Stuehr DJ, Thunnissen FB, Erzurum SC. Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1995; 92: 7809-13.

219) Warner RL, Paine R, Christensen PJ, Marletta MA, Richards MK, Wilcosen SE, and Ward PA. Lung sources and cytokine requirements for in vivo expression of inducible nitric oxide synthase. **Am J Respir Cell Mol Biol** 1995; 12: 649-61.

220) Kleinert H, Pautz A, Linker K, Schwarz PM. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. **Eur J Pharmacol** 2004; 500: 255-66.

221) Hyde RW, Geigel EJ, Olszowka AJ, Krasney JA, Forster RE 2nd, Utell MJ, Frampton MW. Determination of production of nitric oxide by lower airways of humans--theory. **J Appl Physiol** 1997; 82: 1290-6.

222) Shin HW, Rose-Gottron CM, Sufi RS, Perez F, Cooper DM, Wilson AF, George SC. Flow-independent nitric oxide exchange parameters in cystic fibrosis. **Am J Respir Crit Care Med.** 2002;165(3):349-57.

223) Tsoukias NM, George SC. A two-compartment model of pulmonary nitric oxide exchange dynamics. J Appl Physiol 1998; 85: 653-66.

224) Weibel ER, Gomez DM. Architecture of the human lung. Use of quantitative methods establishes fundamental relations between size and number of lung structures. **Science** 1962; 137: 577-85.

225) Tiev KP, Coste J, Ziani M, Aubourg F, Cabane J, Dinh-Xuan AT. Diagnostic value of exhaled nitric oxide to detect interstitial lung disease in systemic sclerosis. **Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis** 2009; 26: 32-8.

226) Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. **Nature** 2002; 420: 520-62.

227) Mashimo H, Goyal RK. Lessons from genetically engineered animal models. IV. Nitric oxide synthase gene knockout mice. **Am J Physiol** 1999; 277: G745-50.

228) Dooley A, Low SY, Holmes A, Kidane AG, Abraham DJ, Black CM, Bruckdorfer KR. Nitric oxide synthase expression and activity in the tight-skin mouse model of fibrosis. **Rheumatology (Oxford)** 2008; 47: 272-80.

229) Fagan KA, Morrissey B, Fouty BW, Sato K, Harral JW, Morris KG Jr, Hoedt-Miller M, Vidmar S, McMurtry IF, Rodman DM. Upregulation of nitric oxide synthase in mice with severe hypoxia-induced pulmonary hypertension. **Respir Res** 2001; 2: 306-13.

230) Bernareggi M, Rossoni G, Clini E, Pasini E, Bachetti T, Cremona G, Ambrosino N, Berti F. Detection of nitric oxide in exhaled air of different animal species using a clinical chemiluminescence analyser. **Pharmacol Res** 1999; 39: 221-4.

231) De Sanctis GT, Mehta S, Kobzik L, Yandava C, Jiao A, Huang PL, Drazen JM. Contribution of type I NOS to expired gas NO and bronchial responsiveness in mice. **Am J Physiol** 1997; 273: L883-8.

232) Ahmad T, Mabalirajan U, Joseph DA, Makhija L, Singh VP, Ghosh B, Agrawal A. Exhaled nitric oxide estimation by a simple and efficient noninvasive technique and its utility as a marker of airway inflammation in mice. J Appl Physiol 2009; 107: 295-301.

233) Sethi JM, Choi AM, Calhoun WJ, Ameredes BT. Non-invasive measurements of exhaled NO and CO associated with methacholine responses in mice. **Respir Res** 2008; 9: 45.

234) Irvin CG, Bates JH. Measuring the lung function in the mouse: the challenge of size. Respir Res 2003; 4: 4.

235) Hyde DM, Hamid Q, Irvin CG. Anatomy, pathology, and physiology of the tracheobronchial tree: emphasis on the distal airways. J Allergy Clin Immunol 2009; 124 (6 Suppl): S72-7.

236) Stitt JT, Dubois AB, Douglas JS, Shimada SG. Exhalation of gaseous nitric oxide by rats in response to endotoxin and its absorption by the lungs. **J Appl Physiol** 1997; 82: 305-16.

237) Hoffman RA, Zhang G, Nussler NC, Gleixner SL, Ford HR, Simmons RL. Watkins SC. Constitutive expression of inducible nitric oxide synthase in the mouse ileal mucosa. **Am J Physiol 1997**; 272: G383-92.

238) Dippel E, Mayer B, Schonfelder G, Czrnetki BM, Paus R. Distribution of constitutive nitric oxide synthase immunoreactivity and NADPH diaphorase activity in murine and telogen and anagen skin. J Invest Dermatol 1994; 103: 112-5.

239) Steudel W, Kirmse M, Weimann J, Ullrich R, Hromi J, Zapol WM. Exhaled nitric oxide production by nitric oxide synthase-deficient mice. **Am J Respir Crit Care Med** 2000; 162: 1262-7.

240) Yates DH, Kharitonov SA, Robbins RA, Thomas PS, Barnes PJ. Effect of a nitric oxide synthase inhibitor and a glucocorticosteroid on exhaled nitric oxide. **Am J Respir Crit Care Med** 1995; 152: 892-6.

241) Cook S, Vollenweider P, Ménard B, Egli M, Nicod P, Scherrer U. Increased eNO and pulmonary iNOS expression in eNOS null mice. **Eur Respir J** 2003; 21: 770-3.

242) Weicker S, Karachi TA, Scott JA, McCormack DG, Mehta S. Noninvasive measurement of exhaled nitric oxide in a spontaneously breathing mouse. **Am J Respir Crit Care Med** 2001; 163: 1113-6.

243) Robbins RA, Springall DR, Warren JB, Kwon OJ, Buttery LD, Wilson AJ, Adcock IM, Riveros-Moreno V, Moncada S, Polak J, et al. Inducible nitric oxide synthase is increased in murine lung epithelial cells by cytokine stimulation. **Biochem Biophys Res Commun.** 1994; 198: 835-43.

244) Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1990; 87: 10043-7.

245) Nakayama DK, Geller DA, Di Silvio M, Bloomgarden G, Davies P, Pitt BR, Hatakeyama K, Kagamiyama H, Simmons RL, Billiar TR. Tetrahydrobiopterin synthesis and inducible nitric oxide production in pulmonary artery smooth muscle. **Am J Physiol** 1994; 266: L455-60.

246) Sartori C, Lepori M, Busch T, Duplain H, Hildebrandt W, Bärtsch P, Nicod P, Falke KJ, Scherrer U. Exhaled nitric oxide does not provide amarker of vascular endothelial function in healthy humans. **Am J Respir Crit Care Med** 1999; 160: 879-82.

247) Ameredes BT, Zamora R, Sethi JM, Liu HL, Kohut LK, Gligonic AL, Choi AM, Calhoun WJ. Alterations in nitric oxide and cytokine production with airway inflammation in the absence of IL-10. J Immunol 2005; 175: 1206-13.

248) Bratt JM, Franzi LM, Linderholm AL, Last MS, Kenyon NJ, Last JA. Arginase enzymes in isolated airways from normal and nitric oxide synthase 2-knockout mice exposed to ovalbumin. **Toxicol Appl Pharmacol** 2009; 234: 273-80.

249) Yamamoto T, Nishioka K. Cellular and molecular mechanisms of bleomycin-induced murine scleroderma: current update and future perspective. **Exp Dermatol** 2005; 14: 81-95.

250) Moore BB, Hogaboam CM. Murine models of pulmonary fibrosis. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** 2008; 294: L152-60.

251) Umezawa H, Maeda K, Takeuchi T, Okami Y. New antibiotics, bleomycin A and B. J Antibiot 1966; 19: 200-9.

252) Onuma T, Holland JF, Masuda H, Waligunda JA, Goldberg GA. Microbiological assay of bleomycin: inactivation, tissue distribution, and clearance. **Cancer** 1974; 33: 1230-8.

253) Schrier DJ, Kunkel RG, Phan SH. The role of strain variation in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **Am Rev Respir Dis** 1983; 127: 63-6.

254) Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, Yamazaki K, Hamazaki Y, Shinkai H, Nishioka K. Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bléomycine induce sclerotic skin mimicking scleroderma. J Invest Dermatol 1999; 112: 456-62.

255) Azuma A, Takahashi S, Nose M. Role of E-selectin in bleomycin induced lung fibrosis in mice. **Thorax** 2000; 55: 147-152.

256) Adamson IY, Bowden DH. The pathogenesis of bloemycin-induced pulmonary fibrosis in mice. **Am J Pathol** 1974; 77: 185-97.

257) Aso Y, Yoneda K, Kikkawa Y. Morphologic and biochemical study of pulmonary changes induced by bleomycin in mice. **Lab Invest** 1976; 35: 558-68.

258) Hamaguchi Y, Nishizawa Y, Yasui M, Hasegawa M, Kaburagi Y, Komura K, Nagaoka T, Saito E, Shimada Y, Takehara K, Kadono T, Steeber DA, Tedder TF, Sato S. Intercellular adhesion molecule-1 and L-selectin regulate bleomycin-induced lung fibrosis. **Am J Pathol** 2002; 161: 1607-18.

259) Yoshizaki A, Yanaba K, Iwata Y, Komura K, Ogawa A, Akiyama Y, Muroi E, Hara T,Ogawa F, Takenaka M, Shimizu K, Hasegawa M, Fujimoto M, Tedder TF, Sato S. Cell adhesion molecules regulate fibrotic process via Th1/Th2/Th17 cell balance in a bleomycin-induced scleroderma model. J Immunol 2010; 185: 2502-15.

260) Howell DC, Goldsack NR, Marshall RP, McAnulty RJ, Starke R, Purdy G, Laurent GJ, Chambers RC. Direct thrombin inhibition reduces lung collagen, accumulation, and connective tissue growth factor mRNA levels in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **Am J Pathol** 2001; 159: 1383-95.

261) Manoury B, Nenan S, Leclerc O, Guenon I, Boichot E, Planquois JM, Bertrand CP,Lagente V. The absence of reactive oxygen species production protects mice against bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **Respir Res** 2005; 6: 11.

262) Carnesecchi S, Deffert C, Donati Y, Basset O, Hinz B, Preynat-Seauve O, Guichard C, Arbiser JL, Banfi B, Pache JC, Barazzone-Argiroffo C, Krause KH. A key role for NOX4 in epithelial cell death during development of lung fibrosis. **Antioxid Redox Signal** 2011; 15: 607-19.

263) Helene M, Lake-Bullock V, Zhu J, Hao H, Cohen DA, Kaplan AM. T cell independence of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. J Leukoc Biol 1999; 65: 187-95.

264) Hao H, Cohen DA, Jennings CD, Bryson JS, Kaplan AM. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis is independent of eosinophils. J Leukoc Biol 2000; 68: 515-21.

265) Miyazawa H, Takiguchi Y, Hiroshima K, Kurosu K, Tada Y, Kasahara Y, Sakao S, Tanabe N, Tatsumi K, Kuriyama T. Pulmonary and systemic toxicity of bleomycin on severe combined immune deficiency mice. **Exp** Lung Res 2008; 34: 1-17.

266) Clark J C, Starcher B C, Uitto J. Bleomycin-induced synthesis of type I procollagen by human lung skin fibroblasts in culture. **Biochim Biophys Acta** 1980; 631: 359-70.

267) Yamamoto T, Eckes B, Krieg T. Bleomycin increases steady-state levels of type I collagen, fibronectin and decorin gene expression in human skin fibroblasts. Arch Dermatol Res 2000; 292: 556-61.

268) Maeda A, Hiyama K, Yamakido H, Ishioka S, Yamakido M. Increased expression of platelet-derived growth factor A and insulin-like growth factor-I in BAL cells during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. **Chest** 1996; 109: 780-6.

269) Coker RK, Laurent GJ, Shahzeidi S, Lympany PA, du Bois RM, Jeffery PK, McAnulty RJ. Transforming growth factors-beta 1, -beta 2, and -beta 3 stimulate fibroblast procollagen production in vitro but are differentially expressed during bleomycin-induced lung fibrosis. **Am J Pathol** 1997; 150: 981-91.

270) Lasky JA, Ortiz LA, Tonthat B, Hoyle GW, Corti M, Athas G, Lungarella G, Brody A, Friedman M. Connective tissue growth factor mRNA expression is upregulated in bleomycin-induced lung fibrosis. **Am J Physiol** 1998; 275: L365-71.

271) Mutsaers SE, Foster ML, Chambers RC, Laurent GJ, McAnulty RJ. Increased endothelin-1 and its localization during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. **Am J Respir Cell Mol Biol** 1998; 18: 611-9.

272) Giri SN, Hyde DM, Hollinger MA. Effect of antibody to transforming growth factor beta on bleomycin induced accumulation of lung collagen in mice. **Thorax** 1993; 48: 959-66.

273) Smith RE, Strieter RM, Zhang K, Phan SH, Standiford TJ, Lukacs NW, Kunkel SL. A role for C-C chemokines in fibrotic lung disease. J Leukoc Biol 1995; 57: 782-7.

274) Belperio JA, Dy M, Burdick MD, Xue YY, Li K, Elias JA, Keane MP. Interaction of IL-13 and C10 in the pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **Am J Respir Cell Mol Biol** 2002; 27: 419-27.

275) Mungunsukh O, Griffin AJ, Lee YH, Day RM. Bleomycin induces the extrinsic apoptotic pathway in pulmonary endothelial cells. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** 2010; 298: L696-703.

276) Golan-Gerstl R, Wallach-Dayan SB, Amir G, Breuer R. Epithelial cell apoptosis by fas ligand-positive myofibroblasts in lung fibrosis. **Am J Respir Cell Mol Biol** 2007; 36: 270-5.

277) Gabrielli A, Svegliati S, Moroncini G, Pomponio G, Santillo M, Avvedimento EV. Oxidative stress and the pathogenesis of scleroderma: the Murrell's hypothesis revisited. **Semin Immunopathol** 2008; 30: 329-37.

278) Tikly M, Channa K, Theodorou P, Gulumian M. Lipid peroxidation and trace elements in systemic sclerosis. **Clin Rheumatol** 2006; 25: 320-4.

279) Herrick AL, Rieley F, Schofield D, Hollis S, Braganza JM, Jayson MI. Micronutrient antioxidant status in patients with primary Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis. **J Rheumatol** 1994; 21: 1477-83.

280) King MR, Ismail AS, Davis LS, Karp DR. Oxidative stress promotes polarization of human T cell differentiation toward a T helper 2 phenotype. J Immunol 2006; 176: 2765-72.

281) Sgonc R, Gruschwitz MS, Dietrich H, Recheis H, Gershwin ME, Wick G. Endothelial cell apoptosis is a primary pathogenetic event underlying skin lesions in avian and human scleroderma. **J Clin Invest** 1996; 98: 785-92.

282) Falanga V, Martin TA, Takagi H, Kirsner RS, Helfman T, Pardes J, Ochoa MS. Low oxygen tension increases mRNA levels of alpha 1(I) procollagen in human dermal fibroblasts. **J Cell Physiol** 1993; 157: 408-12.

283) Bruckdorfer KR, Hillary JB, Bunce T et al. Increased susceptibility to oxidation of low-density lipoproteins isolated from patients with systemic sclerosis. **Arthritis Rheum** 1995; 38: 1060-7.

284) Cracowski JL, Carpentier PH, Imbert B, Cachot S, Stanke-Labesque F, Bessard J, Bessard G. Increased urinary F2-isoprostanes in systemic sclerosis, but not in primary Raynaud's phenomenon: effect of cold exposure. Arthritis Rheum 2002;46:1319-23.

285) Classen JF, Henrohn D, Rorsman F, Lennartsson J, Lauwerys BR, Wikström G, Rorsman C, Lenglez S, Franck-Larsson K, Tomasi JP, Kämpe O, Vanthuyne M, Houssiau FA, Demoulin JB. Lack of evidence of stimulatory autoantibodies to platelet-derived growth factor receptor in patients with systemic sclerosis. **Arthritis Rheum** 2009; 60: 1137-44.

286) Matucci Cerinic M, Kahaleh MB. Beauty and the beast. The nitric oxide paradox in systemic sclerosis. **Rheumatology** 2002; 41: 843-7.

287) Hammerschmidt S, Wahn H. The oxidants hypochlorite and hydrogen peroxide induce distinct patterns of acute lung injury. **Biochim Biophys Acta** 2004; 1690: 258-64.

288) Spencer JP, Whiteman M, Jenner A, Halliwell B. Free Nitrite-induced deamination and hypochlorite-induced oxidation of DNA in intact human respiratory tract epithelial cells. **Radic Biol Med** 2000; 28: 1039-50.

289) Albrich JM, Hurst JK. Oxidative inactivation of Escherichia coli by hypochlorous acid. Rates and differentiation of respiratory from other reaction sites. **FEBS Lett** 1982; 144: 157-61.

290) Masuda M, Suzuki T, Friesen MD, Ravanat JL, Cadet J, Pignatelli B, Nishino H, Ohshima H. Chlorination of guanosine and other nucleosides by hypochlorous acid and myeloperoxidase of activated human neutrophils. Catalysis by nicotine and trimethylamine. **J Biol Chem** 2001; 276: 40486-96.

291) Cantin A, Woods DE. Protection by antibiotics against myeloperoxidase-dependent cytotoxicity to lung epithelial cells in vitro. J Clin Invest 1993; 91: 38-45.

292) Turner-Warwick M. A perspective view on widespread pulmonary fibrosis. Br Med J. 1974; 2(5915): 371-6.

293) Bolster MB, Silver RM. Lung disease in systemic sclerosis (scleroderma). **Baillieres Clin Rheumatol**. 1993; 7(1): 79-97.

294) Weibel ER, Sapoval B and Filoche M. Design of peripheral airways for efficient gas exchange. **Respir Physiol Neurobiol** 2005; 148: 3-21.

295) Wynn TA. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. J Exp Med. 2011; 208(7): 1339-50.

296) Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. **Am J Pathol**. 2007; 170(6): 1807-16.

297) Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH, et al. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1986; 83(12): 4167-71.

298) Bhattacharyya S, Chen SJ, Wu M, Warner-Blankenship M, Ning H, Lakos G, Mori Y, Chang E, Nihijima C, Takehara K, Feghali-Bostwick C, Varga J. Smad-independent transforming growth factor-beta regulation of early growth response-1 and sustained expression in fibrosis: implications for scleroderma. **Am J Pathol**. 2008; 173(4): 1085-99.

299) Bhattacharyya S, Ghosh AK, Pannu J, Mori Y, Takagawa S, Chen G, Trojanowska M, Gilliam AC, Varga J. Fibroblast expression of the coactivator p300 governs the intensity of profibrotic response to transforming growth factor beta. **Arthritis Rheum**. 2005; 52(4): 1248-58.

300) Holmes A, Abraham DJ, Sa S, Shiwen X, Black CM, Leask A. CTGF and SMADs, maintenance of scleroderma phenotype is independent of SMAD signaling. J Biol Chem. 2001; 276(14): 10594-601.

301) Shi-wen X, Chen Y, Denton CP et al. Endothelin-1 promotes myofibroblast induction through the ETA receptor via a rac/phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent pathway and is essential for the enhanced contractile phenotype of fibrotic fibroblasts. **Mol Biol Cell** 2004; 15(6):2707-19.

302) Shi-wen X, Kennedy L, Renzoni EA et al. Endothelin is a downstream mediator of profibrotic responses to transforming growth factor beta in human lung fibroblasts. **Arthritis Rheum** 2007; 56(12):4189-94.

303) Xiang Y, Matsui T, Matsuo K et al. Comprehensive investigation of disease-specific short peptides in sera from patients with systemic sclerosis: complement C3f-des-arginine, detected predominantly in systemic sclerosis sera, enhances proliferation of vascular endothelial cells. **Arthritis Rheum** 2007; 56(6): 2018-30.

304) Whiteside TL, Buckingham RB, Prince RK, Rodnan GP. Products of activated mononuclear cells modulate accumulation of collagen by normal dermal and scleroderma fibroblasts in culture. J Lab Clin Med. 1984; 104(3): 355-69.

305) Chizzolini C, Raschi E, Rezzonico R, Testoni C, Mallone R, Gabrielli A, Facchini A, Del Papa N, Borghi MO, Dayer JM, Meroni PL. Autoantibodies to fibroblasts induce a proadhesive and proinflammatory fibroblast phenotype in patients with systemic sclerosis. **Arthritis Rheum**. 2002; 46(6): 1602-13.

306) Fertin C, Nicolas JF, Gillery P, Kalis B, Banchereau J, Maquart FX. Interleukin-4 stimulates collagen synthesis by normal and scleroderma fibroblasts in dermal equivalents. **Cell Mol Biol**. 1991; 37(8): 823-9.

307) Postlethwaite AE, Holness MA, Katai H, Raghow R. Human fibroblasts synthesize elevated levels of extracellular matrix proteins in response to interleukin 4. J Clin Invest 1992; 90: 1479–85.

308) Kurasawa K, Hirose K, Sano H, Endo H, Shinkai H, Nawata Y, Takabayashi K, Iwamoto I. Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. **Arthritis Rheum**. 2000; 43(11): 2455-63.

309) Hua-Huy T, Tiev KP, Chéreau C, Duong-Quy S, Cabane J, Dinh-Xuan AT. Increased alveolar concentration of nitric oxide is related to serum-induced lung fibroblast proliferation in patients with systemic sclerosis. J Rheumatol 2010; 37: 1680-7.

310) Marten K, Dicken V, Kneitz C, Hoehmann M, Kenn W, Hahn D, Engelke C. Computer-assisted quantification of interstitial lung disease associated with rheumatoid arthritis: preliminary technical validation. **Eur J Radiol**. 2009; 72(2): 278-83.

311) Kim HG, Tashkin DP, Clements PJ, Li G, Brown MS, Elashoff R, Gjertson DW, Abtin F, Lynch DA, Strollo DC, Goldin JG. A computer-aided diagnosis system for quantitative scoring of extent of lung fibrosis in scleroderma patients. **Clin Exp Rheumatol**. 2010; 28(5 Suppl 62): S26-35.

312) Condorelli P, Shin HW, Aledia AS, Silkoff PE, George SC. A simple technique to characterize proximal and peripheral nitric oxide exchange using constant flow exhalations and an axial diffusion model. J Appl Physiol. 2007; 102(1): 417-25.

313) Perillo IB, Hyde RW, Olszowka AJ, Pietropaoli AP, Frasier LM, Torres A, Perkins PT, Forster RE 2nd, Utell MJ, Frampton MW. Chemiluminescent measurements of nitric oxide pulmonary diffusing capacity and alveolar production in humans. J Appl Physiol. 2001; 91: 1931-40.

314) Failli P, Palmieri L, D'Alfonso C, Giovannelli L, Generini S, Rosso AD, Pignone A, Stanflin N, Orsi S, Zilletti L, Matucci-Cerinic M. Effect of N-acetyl-L-cysteine on peroxynitrite and superoxide anion production of lung alveolar macrophages in systemic sclerosis. **Nitric Oxide**. 2002; 7: 277-82.

315) Saleh D, Barnes PJ, Giaid A. Increased production of the potent oxidant peroxynitrite in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. **Am J Respir Crit Care Med** 1997; 155: 1763-9.

316) Giri SN, Biring I, Nguyen T, Wang Q, Hyde DM. Abrogation of bleomycin-induced lung fibrosis by nitric oxide synthase inhibitor, aminoguanidine in mice. **Nitric Oxide** 2002; 7: 109-18.

317) Giaid A, Lehnert SM, Chehayeb B, Chehayeb D, Kaplan I, Shenouda G. Inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in mice with radiation-induced lung damage. **Am J Clin Oncol** 2003; 26: e67-72.

318) Genovese T, Cuzzocrea S, Di Paola R, Failla M, Mazzon E, Sortino MA, Frasca G,Gili E, Crimi N, Caputi AP, Vancheri C. Inhibition or knock out of inducible nitric oxide synthase result in resistance to bleomycin-induced lung injury. **Respir Res** 2005;6:58.

319) Tiev KP, Hua-Huy T, Kettaneh A, Allanore Y, Le-Dong NN, Duong-Quy S, Cabane J, Dinh-Xuan AT. Alveolar concentration of nitric oxide predicts pulmonary function deterioration in scleroderma. **Thorax** 2011 Oct 24.

320) Gilson M, Zerkak D, Wipff J, Dusser D, Dinh-Xuan AT, Abitbol V, Chaussade S, Legmann P, Kahan A, Allanore Y. Prognostic factors for lung function in systemic sclerosis: prospective study of 105 cases. **Eur Respir** J 2010; 35: 112-7.

321) Kahaleh MB. The role of vascular endothelium in fibroblast activation and tissue fibrosis, particularly in scleroderma (systemic sclerosis) and pachydermoperiostosis (primary hypertrophic osteoarthropathy). **Clin Exp Rheumatol.** 1992; 10(Suppl 7):51-6.

322) Rolla G, Colagrande P, Scappaticci E, Chiavassa G, Dutto L, Cannizzo S, Bucca C, Morello M, Bergerone S, Bardini D, Zaccagna A, Puiatti P, Fava C, Cortese G. Exhaled nitric oxide in systemic sclerosis: relationships with lung involvement and pulmonary hypertension. J **Rheumatol** 2000; 27: 1693-8.

323) De Sanctis GT, MacLean JA, Hamada K, Mehta S, Scott JA, Jiao A, Yandava CN, Kobzik L, Wolyniec WW, Fabian AJ, Venugopal CS, Grasemann H, Huang PL, Drazen JM.Contribution of nitric oxide synthases 1, 2, and 3 to airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of asthma. **J Exp Med**. 1999; 189(10): 1621-30.

324) Xiong Y, Karupiah G, Hogan SP, Foster PS, Ramsay AJ. Inhibition of allergic airway inflammation in mice lacking nitric oxide synthase 2. J Immunol 1999; 162: 445-52.

325) Ten Broeke R, De Crom R, Van Haperen R, Verweij V, Leusink-Muis T, Van Ark I, De Clerck F, Nijkamp FP, Folkerts G. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase suppresses features of allergic asthma in mice. **Respir Res** 2006; 7: 58.

326) Suzuki YJ, Ford GD. Superoxide stimulates IP3-induced Ca2+ release from vascular smooth muscle sarcoplasmic reticulum. **Am J Physiol** 1992; 262: H114-6.

327) Gerassimou C, Kotanidou A, Zhou Z, Simoes DC, Roussos C, Papapetropoulos A. Regulation of the expression of soluble guanylyl cyclase by reactive oxygen species. **Br J Pharmacol** 2007; 150: 1084-91.

328) Barouki R, Morel Y. Oxidative stress and gene expression. J Soc Biol 2001; 195: 377-82.

329) Cosentino F, Barker JE, Brand MP, Heales SJ, Werner ER, Tippins JR, West N, Channon KM, Volpe M, Lüscher TF. Reactive oxygen species mediate endothelium-dependent relaxations in tetrahydrobiopterindeficient mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 2001; 21: 496-502.

330) Poderoso JJ, Carreras MC, Lisdero C, Riobó N, Schöpfer F, Boveris A. Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. **Arch Biochem Biophys** 1996; 328: 85-92.

Entité anatomo-cli	nique	Lésions au scanner thoracique	Histologie	Evolution
Pneumopathie	interstitielle	- Bases pulmonaires avec lésion sous pleurale et	-Présence de foyers fibroblastiques traduisant une activité de	- Mauvais pronostic si diminution de CVF de plus de 10% en 6
commune		para-septale avec modification structurale	la maladie.	mois ou de DLCO de 15% en 1 an
		- Alternance de zones pathologiques et de zones	-Distorsion architecturale du parenchyme pulmonaire avec	- Valeur de pronostic péjoratif de la présence de nombreux foyers
		saines	présence d'aspect en rayon de miel	fibroblastiques constatés sur la biopsie pulmonaire
		Aspect pseudo-kystique sous pleurale ou en rayon	-Hétérogénéité temporelle des lésions	
		de miel		
Pneumopathie into	erstitielle non	- Aspects en verre dépoli bilatéraux symétriques	- Infiltrat de cellules inflammatoires principalement	- Pronostic plus favorable que la pneumopathie interstitielle
spécifique		prédominant aux bases pulmonaires	lymphocytaire avec une fibrose interstitielle inter-alvéolaire	commune
		 Images réticulaires et linéaires irrégulières 	- Forme cellulaires : lésions inflammatoires sans fibrose	- Pronostic moins favorable des formes histologiques fibreuses.
		- Co-existence des 2 types de lésions dans la même	- Forme fibreuse : association de lésion inflammatoire et de	
		zone du parenchyme pulmonaire	fibrose ou bien uniquement de fibrose	
		 Distribution péri-bronchique des lésions 		
Pneumopathie organisée cryptogénique ou Bronchiolite oblitérante avec pneumopathie organisée		- Plages de condensation parenchymateuse avec	- Obstruction endoluminale des espaces aériens distaux par	Excellente cortico-sensiblité de la bronchiolite oblitérante avec
		bronchogramme aérique uni ou bilatérales	un tissu de granulation fibreux constitué de cellules	pneumopathie organisée
		- Dilatation modérée de la lumière bronchique	inflammatoires, de fibroblastes et de tissu conjonctif	
		- Distribution sous pleurale et péri-bronchique des		
		opacités en verre dépoli ou micro-nodulaire		
		 Images migratrices des opacités alvéolaires 		
bronchiolite respiratoire avec pneumopathie interstitielle		Association de petites lésions nodulaires et des	- Inflammation de la paroi des bronchioles avec infiltrat de	Amélioration clinique à l'arrêt du tabac et à l'instauration de la
		opacités en verre dépoli péribronchiques et parfois	macrophages contenant des pigments brunes	corticothérapie
		des lésions d'emphysème centro-lobulaires	 Lésions sont associées avec des infiltrats lymphocytaires et 	
			histiocytaires péri-bronchiolaires avec inflammation de la	
			paroi alvéolaire adjascente	
			- Parfois emphysème centro-lobulaire	
Pneumopathie desquamative	interstitielle	 Opacités en verre dépoli prédominant aux lobes 	- Inflammation de la paroi des bronchioles avec infiltrat de	Amélioration clinique à l'arrêt du tabac et à l'instauration de la
		inférieurs et dans les régions périphériques	macrophages contenant des pigments brunes	corticothérapie
		- Opacités linéaires irrégulières et réticulaires des	- Infiltrat inflammatoire des septa inter-alvéolaires par des	
		bases	plasmocytes et des polynucléaires éosinophiles	
		- Parfois des images en rayon de miel d'étendue	- Hyperplasie pneumocytaire	
n		limitée	- Accumulation de macrophages intra-alvéolaire	
Pneumopathie aigue	interstitielle	- Condensation alveolaire diffuse qui peut soit	- Lesions alveolaires diffuses avec une phase aigue et une	- Evolution possible vers une restitution <i>ad integrum</i> ou vers une
		régresser soit laisser la place à une fibrose	phase de lésions organisées	fibrose pulmonaire terminale
		pulmonaire avec des images en aspect en verre	- Phase aigue : œdeme des cloisons alveolaires avec exsudat	
		depoli fixe, des images reticulaires et des en rayon	associe a une inflammation aigue a polynucleaire et	
		de miel		
			- Phase de lesions organisées : ilorose des cloisons inter-	
			arveolaries et hyperplaste des preumocytes de type il avec	
			Thrambus ortégioloire	
Droumonathic	intonatitic II-	Openitás en verre dánali essenciáns è des essentiós	- Informus aneriorare Infiltrat hymphoxida interatital danga hymphoxida interation	Transformation possible on transforma
Pneumopathie lymphocytaire	interstitielle	- Opacites en verre depoir associees a des opacites	- initial lymphoide interstitel dense lympho-plasmocytaire	- mansformation possible en lymphome
		nouuaires centroiodulaires et micronodulaires sous	E insuocytaire associe a des follicules lympholdes	- Diagnostic differentier avec le symphome en eliminant une
		preuraux Drécorace d'adémonstria médicatingle group ite	- romcure hympholide est organisee avec un centre	Cionanie des lymphocytes
		- riesence a adenopathie mediastinale associee	Parfois modification de l'architecture du poumer	- Sensionne a la corticolnerapie
			- ranois, modification de l'architecture du poumon	- Evolution dans un tiers des cas en notose pullionalle avec
				insumsance respiratoire

Annexe A: Classification des pneumopathies interstitielles diffuses; American Thoracic Society/ European Respiratory Society (2002)

Annexe B: Publication complémentaire pendant le travail de Thèse

ERJ Express. Published on July 20, 2011 as doi: 10.1183/09031936.00004711

Original article

Serum CC chemokine ligand-18 predicts lung disease worsening in systemic sclerosis

Authors:

K.P. Tiev (1), T. Hua-Huy (2), A. Kettaneh (1), M. Gain (1), S. Duong-Quy (2), C. Tolédano (1), J. Cabane (1), A.T. Dinh-Xuan (2).

Address:

- University Paris VI, Department of Internal Medicine, Saint Antoine Hospital, 184 rue du Faubourg Saint Antoine, 75571 Paris cedex 12, France.
- (2) Université Paris V, Department of Physiology, Cochin Hospital, 27 rue du Faubourg Saint-Jacques, 75679 Paris cedex 14, France.

Correspondence: Pr Anh Tuan Dinh-Xuan

Phone: 33 1 58 41 23 36

e-mail: anh-tuan.dinh-xuan@cch.aphp.fr

Keywords: Systemic sclerosis, interstitial lung disease, chemokines, prognosis

Abstract

Elevated serum CCL18 reflects lung fibrosis activity in systemic sclerosis (SSc) and could be an early marker of lung function worsening. We have therefore sought to evaluate whether serum CCL18 levels at baseline could predict the worsening of lung disease in SSc.

In this prospective study, 83 SSc patients enrolled were analyzed longitudinally over 4 years observation period for the risk of occurrence of combined deleterious events, defined as 10% decrease from baseline of predicted values, of total lung capacity, or forced vital capacity, or death, according to serum CCL18 at inclusion. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was performed for prediction of event during the first year after inclusion.

The best cut-off of CCL18 for prediction of combined event within the year of followup was 187 ng/mL with sensitivity: 53%, and specificity: 96% (area under ROC curve= 0.86; p<0.001). After 33.7 ± 10.8 months of follow-up, a higher rate of disease progression occurred in the group with serum CCL18 levels >187 ng/mL. The adjusted hazard ratio (HR) was 5.36; (95% confidence intervals: 2.44-11.75, p<0.001).

In summary, Serum CCL18 is an accurate predictive biomarker to identify patients with higher risk of subsequent scleroderma lung disease worsening.

word count=196

Introduction:

Systemic sclerosis (SSc) is a chronic autoimmune connective tissue disease characterized by sclerotic changes in skin and internal organs with poor prognosis. Interstitial lung disease (ILD) occurs in more than 50% of SSc patients and became the leading cause of death ¹. It remains a great challenge to develop biomarkers that could identify SSc patients who will have progressive disease with those having slow or stable disease in order to give appropriate treatment and follow-up cares.

CC Chemokine ligand 18 (CCL18) is a chemokine secreted mainly by alternatively activated alveolar macrophages (M2 phenotype) ² by T helper 2 cytokines and plays an important role in the immune-mediated lung fibrosis processes in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) ³ and scleroderma lung disease ^{3, 4}. A high amount of CCL18, produced by alveolar inflammatory cells ⁵, could induce an overproduction of collagen by lung fibroblasts through Sp1 signalling and basal Smad3 activity independently to autocrine transforming growth factor β (TGF- β) ⁶.

In ILD associated with SSc, although several data strongly suggested that CCL18 reflected an alveolar inflammatory activity, leading up to lung fibrosis and subsequent worsening of lung function. Serum CCL18 fulfilled criteria for a potential biomarker of lung fibrosis activity in ILD associated with SSc ^{3, 4}. Its prognostic value on overtime lung function worsening in patient with SSc has not yet been prospectively assessed in a long term follow-up study. We hypothesized that elevated serum CCL18 level, reflecting the underlying sustained lung inflammatory activity, could herald the subsequent lung function worsening in SSc. We aimed to determine whether the serum CCL18 concentration could provide truly valuable information to identify in SSc patients those at higher risk to have subsequent overtime lung function worsening in a prospective cohort study.

Methods:

Patients:

Study design:

Inclusion period of the cohort study was conducted from November 2004 to November 2007, in the department of Internal Medicine, Hospital Saint Antoine, Paris and the follow-up of this time-to-event driven study ended in June 2010. Patients eligible for the study were those who met the following criteria.

Inclusion criteria:

Patients were considered for inclusion if they were older than 18 years and had a diagnosis of SSc and its subsets according to the American College of Rheumatology criteria⁸, and Leroy's criteria⁹, respectively. Patients with SSc were eligible, irrespective of the values of their forced vital capacity (FVC), diffusing lung capacity for carbon monoxide (DLCO). Patients with ILD as diagnosed by chest high-resolution computed tomography (HRCT) and patients treated by immunosuppressive therapy were also eligible.

Exclusion criteria:

Exclusion criteria were: the presence of recent airway upper tract infection, pneumonia, or other systemic infection in the three last months. Patients with IPF or ILD associated with connective tissue diseases other than SSc were excluded.

Data collection:

Baseline

The study was approved by the local ethics committee (CPP IIe de France 5). After written informed consent, patients routinely underwent lung high-resolution computed tomography (HRCT), echocardiogram, and pulmonary function tests (PFTs)¹⁰. Interstitial lung disease was considered present if pulmonary HRCT demonstrated compatible changes in reticular or air space opacities according to the ATS/ERS Consensus ¹¹. Serum samples were frozen at - 80°C until the serum CCL18 measurement by ELISA method.

Follow-up

Survival was obtained from visits and telephone interviews. The changes in PFTs were determined by calculating percent differences of PFTs' measurement between baseline at the time of visit, when CCL18 was measured in the serum and every year or earlier when clinically indicated over a 4-year period. A decrease of more than 10% of predicted value in total lung capacity (TLC) or forced vital capacity (FVC) was considered as significant according to the ATS/ERS criteria ¹¹ and previous report ¹². Patients who had not been seen within 6 months were called to confirm their vitality. Serum CCL18 measurements were also performed at the first following visit.

Measurement of serum CCL18

CCL18 was quantified using a DuoSet ELISA Development kit (R&D Systems Europe, Abingdon, United Kingdom). All serum samples were diluted to 1:200 and measured in duplicate. Intra-assay coefficients of variation of less than 10% were accepted. To insure the reliability of measurement, we assayed CCL18 from 16 healthy volunteers as controls.

Statistical Analysis

First, we assessed the optimal threshold and the diagnostic performance of CCL18 for identifying SSc patients who were going to have subsequent lung disease worsening or to die within the 2 years after inclusion (positive if combined event occurred within 2 years of follow-up and negative if combined event did not occur) by using receiver operating characteristic curves (ROC) analysis.

Second, SSc patients were equally categorized into two groups, patients with serum CCL18 level higher than optimal threshold, and the other patients. Characteristics for group of SSc patients with serum CCL18 equal or lesser than optimal cut-off versus those with levels of serum CCL18 greater were compared by student t-test for continuous parameters and χ^2 tests for categorical measures. Continuous and categorical values were expressed as means ± SD, and percentage respectively. A p value <0.05 was considered as statistically significant.

To estimate the predictive value of serum CCL18 on lung function outcomes during the whole follow-up, cumulative risks were computed by Kaplan-Meier analysis. We used Cox proportional hazards models, full backward and forward multivariate analysis to assess the risk to develop an overtime lung function worsening for patients whose CCL18 was higher than the best threshold of CCL18, and compared this risk with that of the remaining patients. Next, we assessed the relationship between change in FVC and variation of serum CCL18 level between baseline and the last visit by linear regression model.

Results:

Characteristics of population at baseline

Eighty five patients with SSc were eligible in this prospective study. Two patients were excluded for pneumonia, and sigmoiditis (Figure 1). Eighty three patients were consecutively included in the study (Table 1). After a mean follow-up of 33.7 ± 10.8 months, 4 SSc patients died, and no patient was lost to follow-up. The composite events, defined as death or decrease of 10% of TLC or FVC, occurred in 43% of patients.

Threshold to identify SSc patients who were going to have subsequent lung disease worsening or to die during the 2 years after inclusion

The baseline serum levels ranged from 33 ng/mL to 649 ng/mL and its distribution in the whole studied population was shown in figure 2. The best cut-off for identifying subsequent lung disease worsening within 2 years was 187 ng/mL (95%CI: 159-218) with an area under ROC curve=0.86 (0.78-0.93); p<0.001 and the sensitivity and specificity were 0.53 (0.35-0.70) and 0.96 (0.85-0.99) respectively (Figure 2). The internal validation of CCL18 cut-off was provided as supplemental data available online (Table S1).

Characteristics of population at baseline according to the best threshold of CCL18 to predict subsequent combined events during the first 2 years after inclusion

We used the best cut-off of CCL18 (at 187 ng/mL) to split the studied population. The composite events, defined as death or decrease of 10% of TLC or FVC, occurred in 91% of patients with CCL18 greater than 187 ng/mL and 27% of those with CCL18 equal or lesser than the best cut-off. There were significantly higher percentages of diffuse form of disease (p=0.004), presence of anti-topoisomerase I (p=0.004), ILD (p=0.003), systolic pulmonary artery pressure higher than 40 mmHg (p=0.001), lower level of FVC (p=0.01) or DLCO

(p<0.001) in the group of SSc patients with high level of CCL18 as compared to those with low level of CCL18. The immunosuppressive therapy including corticosteroids and immunosuppressive agents were comparable between the 2 groups. Further cross sectional analysis of baseline data was provided as supplemental data available online (Cross sectional analysis of the population at baseline, and figure S1).

Association between baseline serum CCL18 level and overtime lung function worsening

Progression of lung function decline differed between SSc patients with high and low serum CCL18 levels at baseline. Times to 25% events were significantly shorter in patients with high CCL18 levels (22 months, 95%CI: 14.0-23.5) as compared to those with low CCL18 levels (37 months, 95%CI: 28.7-37.4; logrank p<0.001; figure 3).

In the univariate, Cox proportional hazards model, serum baseline CCL18 level greater than 187 ng/mL was associated with a higher risk of overtime lung function worsening (HR=5.32, 95%CI: 2.70-10.52; p<0.001; table 2). Linear regression analysis using CCL18 as continuous variable to predict subsequent change in FVC was consistent with the Cox proportional hazards model and was available online as supplemental data (Table S2).

In multivariate analysis, when large demographic data, characteristics of disease, serum inflammatory marker, and immunosuppressive therapy were put into the backward and forward multivariate Cox proportional hazards models, serum CCL18 concentration at baseline remained an accurate predictive factor of the subsequent lung disease worsening (HR=5.36, 95%CI:2.44-11.75, p<0.001; table 3). The baseline CCL18 level from 4 SSc patients who died during the follow-up was 139 ng/mL, 228 ng/mL, 230 ng/mL and 649 ng/mL.

Relationship between variation of serum CCL18 level and change in forced vital capacity

After adjustment for FVC at baseline, FVC at follow-up visit was related to CCL18 at baseline but not to its change (serum CCL18 at inclusion minus that at the follow-up visit, table 4). Serum levels from SSc patients with CCL18 higher than the optimal threshold remained higher than 187 ng/mL during follow-up (figure 4).

Discussion:

In this present prospective cohort study, we found for the first time that baseline serum CCL18 level above 187 mg/mL was a strong independent predictive factor of subsequent lung disease worsening in patients with SSc (HR=5.36). CCL18 provided additional information that helps us to identify patient with progressive lung disease in SSc.

In SSc, there are not many relevant biomarkers that could allow us to predict progression of lung fibrosis or survival ¹³. Currently, several biological markers such as neutrophilic alveolits surfactant A or D¹⁴, or cytokines like TNFα¹⁵, and chemokines like IL8¹⁶, CCL2^{16, 17, 18} and alveolar concentration of nitric oxide 19, 20 have been shown to be associated with the severity of ILD in SSc. Nevertheless, for each biomarker, long-term follow-up study available showing relevant prognostic value on its progression is lacking. So far FVC ^{12, 21} and DLCO ²² remained the most relevant predictive factors in ILD. In order to assess scleroderma lung disease which has become the leading cause of death, several physiological lung parameters such as FVC and DLCO have been used as surrogate markers for mortality, or impairment of lung function in clinical trial ^{23, 24}. Decreased FVC reflected the severity of lung fibrosis and FVC less than 55% of predicted value predicted increased mortality in 9 years in diffuse form of SSc²⁵. Low DLCO was also a predictor for the occurrence of PAH²⁶ and mortality ²⁷. However, patients with more severe impairment of FVC or DLCO were more likely to worsen lung function than others. Unlike physiological lung parameters, biological markers have the advantages to describe the underlying biological activity leading to lung fibrosis independently of the subjectivity of patients-related symptoms and fibrosis-related mechanical changes of lung parenchyma. Herein, the serum level of CCL18 seems to satisfy these requirements to be a good biomarker.

Previous study have shown that high CCL18 was associated with increased pro-fibrotic activity in scleroderma lung disease and high serum level could reflect progressive lung disease ³. Consistent with previous findings, we found relationships between elevated CCL18 and severity of scleroderma lung disease, extent of skin fibrosis and systolic pulmonary pressure greater estimated by echocardiogram than 40 mmHg.

Recently, in IPF, Prasse et al.²⁸ reported that serum CCL18 had an accurate prognostic value on disease-related death with a hazards ratio of 8. Although previous studies have proposed potential link between CCL18 and SSc-ILD, we present here the first long-term follow-up data showing that serum level of CCL18 predicted an overtime lung function decline or death. In a large cohort studies, Sin et al ²⁹ reported that CCL18 levels was significantly related to age, gender, body mass index, and smoking status. As SSc patients were predominantly female and their mean age was around fifty five years, elevated CCL18 could be biased by age and gender. So, we took account age, gender, body mass index, and smoking status in the multivariate analysis. Serum level of CCL18 was still an accurate predictive marker for an overtime lung function decline or death (HR at 5.36) after adjustment for all these latter factors including duration of disease, baseline FVC and DLCO.

The rate of progressive form in this present study seemed higher than that reported in previous large cohort studies ^{21, 30}. As compared with previous studies, patients from the present study seemed to have more severe disease, as evidenced by the presence of severe organs involvement in most patients and 4 deaths during the first year after inclusion (4.8%). The fact that our Center is a national reference receiving the most severe cases of SSc might account for the high rate of combined outcomes in the present study.
We showed the robustness of CCL18 optimal threshold for prediction of lung disease worsening in SSc by an internal validation. However, external validation by an independent cohort is needed prior to recommending intervention studies targeting CCL18.

The variation of serum CCL18 obtained by repeated measurement did not provide more information on change in FVC during history of progression of lung disease. However, the fact that serum levels from patients with CCL18 higher than the optimal cut-off still remained higher than this latter during follow-up may reflect the continuous deterioration of lung function, even in those patients loss of lung volume due to lung fibrosis had already begun.

Our findings showed that serum CCL18 had a good predictive value to predict worsening of lung disease in patients with SSc and it might therefore be used as a surrogate biomarker to identify at risk SSc patients. Further studies are needed to show whether therapies may have an influence on CCL18 levels.

Statement of interest:

The authors have no conflicts of interest to disclose

Support statement

This study was supported by the Legs Poix (Chancellerie des Universités de Paris, France) and the Association des Sclérodermiques de France (28260 Sorel-Moussel, France).

Word count: abstract: 194, text: 2311;

References:

- Steen VD, Medsger TA. Changes in causes of death in systemic sclerosis, 1972-2002. Ann Rheum Dis. 2007; 66: 940-944.
- Schutyser E, Richmond A, Van Damme J. Involvement of CC chemokine ligand 18 (CCL18) in normal and pathological processes. *J Leukoc Biol.* 2005; 78: 14-26.
- 3. Prasse A, Pechkovsky DV, Toews GB, et al. CCL18 as an indicator of pulmonary fibrotic activity in idiopathic interstitial pneumonias and systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2007; 56: 1685-1693.
- Kodera M, Hasegawa M, Komura K, Yanaba K, Takehara K, Sato S. Serum pulmonary and activation-regulated chemokine/CCL18 levels in patients with systemic sclerosis: a sensitive indicator of active pulmonary fibrosis. *Arthritis Rheum*. 2005; 52: 2889-2896.
- Luzina IG, Atamas SP, Wise R, Wigley FM, Xiao HQ, White B. Gene expression in bronchoalveolar lavage cells from scleroderma patients. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002; 26: 549-557.
- Atamas SP, Luzina IG, Choi J, et al. Pulmonary and activation-regulated chemokine stimulates collagen production in lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003; 29: 743-749.
- Luzina IG, Highsmith K, Pochetuhen K, Nacu N, Rao JN, Atamas SP. PKCalpha mediates CCL18-stimulated collagen production in pulmonary fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006; 35: 298-305.
- Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. *Arthritis Rheum.* 1980; 23: 581-590.
- 9. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol*. 1988; 15: 202-205.
- 10. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, et al. Standardisation of spirometry. *Eur Respir* J. 2005; 26: 319-338.
- 11. American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 165: 277-304.
- Steen VD, Conte C, Owens GR, Medsger TA, Jr. Severe restrictive lung disease in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 1994; 37: 1283-1289.
- Prasse A, Muller-Quernheim J. Non-invasive biomarkers in pulmonary fibrosis. *Respirology*. 2009; 14: 788-795.
- Asano Y, Ihn H, Yamane K, et al. Clinical significance of surfactant protein D as a serum marker for evaluating pulmonary fibrosis in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2001; 44: 1363-1369.
- 15. Schmidt K, Martinez-Gamboa L, Meier S, et al. Bronchoalveoloar lavage fluid cytokines and chemokines as markers and predictors for the outcome of interstitial lung disease in systemic sclerosis patients. *Arthritis Res Ther.* 2009; 11: R111.
- Meloni F, Caporali R, Marone Bianco A, et al. BAL cytokine profiRle in different interstitial lung diseases: a focus on systemic sclerosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 2004; 21: 111-118.
- 17. Antonelli A, Ferri C, Fallahi P, et al. CXCL10 (alpha) and CCL2 (beta) chemokines in systemic sclerosis--a longitudinal study. *Rheumatology (Oxford)*. 2008; 47: 45-49.

- 18. Fujii H, Shimada Y, Hasegawa M, Takehara K, Sato S. Serum levels of a Th1 chemoattractant IP-10 and Th2 chemoattractants, TARC and MDC, are elevated in patients with systemic sclerosis. *J Dermatol Sci.* 2004; 35: 43-51.
- 19. Tiev KP, Cabane J, Aubourg F, et al. Severity of scleroderma lung disease is related to alveolar concentration of nitric oxide. *Eur Respir J.* 2007; 30: 26-30.
- Tiev KP, Coste J, Ziani M, Aubourg F, Cabane J, Dinh-Xuan AT. Diagnostic value of exhaled nitric oxide to detect interstitial lung disease in systemic sclerosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 2009; 26: 32-38.
- 21. Goh NS, Desai SR, Veeraraghavan S, et al. Interstitial lung disease in systemic sclerosis: a simple staging system. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008; 177: 1248-1254.
- 22. Bouros D, Wells AU, Nicholson AG, et al. Histopathologic subsets of fibrosing alveolitis in patients with systemic sclerosis and their relationship to outcome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 165: 1581-1586.
- 23. Tashkin DP, Elashoff R, Clements PJ, et al. Cyclophosphamide versus placebo in scleroderma lung disease. *N Engl J Med.* 2006; 354: 2655-2666.
- 24. Tashkin DP, Elashoff R, Clements PJ, et al. Effects of 1-year treatment with cyclophosphamide on outcomes at 2 years in scleroderma lung disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 176: 1026-1034.
- 25. Steen VD, Medsger TA, Jr. Severe organ involvement in systemic sclerosis with diffuse scleroderma. *Arthritis Rheum.* 2000; 43: 2437-2444.
- 26. Steen VD, Graham G, Conte C, Owens G, Medsger TA, Jr. Isolated diffusing capacity reduction in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 1992; 35: 765-770.
- Steen V, Medsger TA, Jr. Predictors of isolated pulmonary hypertension in patients with systemic sclerosis and limited cutaneous involvement. *Arthritis Rheum.* 2003; 48: 516-522.
- Prasse A, Probst C, Bargagli E, et al. Serum CC-chemokine ligand 18 concentration predicts outcome in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009; 179: 717-723.
- Sin DD, Miller B, Duvoix A et al. Serum PARC/CCL-18 Concentrations and Health Outcomes in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Am J Respir Crit Care Med 2011; 2011 Jan 14. [Epub ahead of print]
- 30. Assassi S, Sharif R, Lasky RE et al. Predictors of interstitial lung disease in early systemic sclerosis: a prospective longitudinal study of the GENISOS cohort. Arthritis Res Ther 2010; 12: R166.

	All SSc natients	CCL18 > 187 ng/m]	$CC1.18 < 1.87 n_0/m^2$	q
	(n=83)	(n=21)	(n=62)	2
Age (years)	53.5 ± 12.2	56.4 ± 12.5	52.6 ± 12.0	0.23
Female, n (%)	73 (88.0)	16 (76.6)	57 (91.9)	0.13
Duration of disease (years)	11.6 ± 11.1	11.1 ± 9.8	11.6 ± 11.5	0.84
Diffuse, n (%)	35 (42.2)	15 (71.4)	20 (32.3)	0.004
Modified Rodnan skin score	8.6 ± 6.8	12.5 ± 7.9	7.3 ± 5.9	0.01
Anti-centromere antibody	42 (50.6)	6 (28.6)	36 (58.1)	0.02
Anti-topoisomerase I antibody	37 (44.6)	15 (71.4)	22 (35.5)	0.004
History of smoking, n (%)	19(22.9)	5 (23.8)	14 (22.5)	0.85
ILD, n (%)	46 (55.4)	18 (85.7)	28 (45.2)	0.003
Baseline FVC (% pred)	93 ± 20	84 ± 16	96 ± 21	0.01
Baseline FEV ₁ (% pred)	90 ± 17	82 ± 15	93 ± 19	0.02
Baseline DLCO (% pred)	62 ± 16	50 ± 10	65 ± 16	< 0.001
Baseline Creatine serum level (µmol/L)	82.4 ± 22.1	81.4 ± 23.5	82.8 ± 21.8	0.82
Baseline Fibrinogen (g/L)	3.2 ± 0.8	3.8 ± 1.2	3.1 ± 0.7	0.02
Baseline sPAP (mmHg)	32.9 ± 10.8	37.7 ± 7.4	31.2 ± 4.4	0.01
sPAP>40 mmHg	13 (15.6)	9 (42.9)	4 (6.4)	0.001
Immunosuppressive treatment, n (%)	15 (18.1)	6(28.6)	9 (14.5)	0.26
ILD: interstitial lung disease, % of pred: percentage of pred	icted value, FVC: forced vital	capacity, FEV1: forced expiratory	volume in one second, DLCO: diffu	using capacity

Table 1: Baseline characteristics of patients

of carbon monoxide, sPAP: Systolic pulmonary artery pressure assessed by echocardiogram.

	Hazaru Kaulo (95 % CI)	<i>ф</i>
CL18 > 187 ng/ml	5.32 (2.70-10.52)	<0.001
dge (as continuous, per year)	1.02(0.98-1.05)	0.19
emale	0.53(0.24-1.20)	0.11
diffuse form of SSc	2.09 (1.08-4.05)	0.03
anti-centromere antibody	0.61(0.31-1.18)	0.14
anti-topoisomerase I antibody	1.62(0.84-3.13)	0.15
listory of smoking	0.81 (0.35-1.85)	0.62
Duration of disease (as continuous, per year)	0.99 (0.95-1.02)	0.46
resence of ILD	2.40(1.15-4.99)	0.02
oLCO (as continuous, per % of pred)	0.96(0.94-0.98)	0.001
VC (as continuous, per % of pred)	0.99(0.97-1.00)	0.11
PAP>40 mmHg	3.19 (1.55-6.56)	0.002
Tibrinogen (as continuous, per g/L)	1.41 (1.00-2.00)	0.05
mmunosuppressive treatment	2.18(1.04-4.56)	0.04

worsening
g functions
e lung
overtime
f
risk (
he
assessing t
lysis
ana
iate
nivar
Б
Table 2:

	Hazard ratio (95%CI)	ď
CCL18> 187 ng/mL	5.36 (2.44-11.75)	<0.001
Duration of disease (per year)	$0.97\ (0.93-1.01)$	0.10
DLCO (per % of pred)	0.97 (0.95-1.00)	0.04

Table 3: Risks of overtime lung functions worsening in patients with systemic sclerosis according to optimal cut-off

CI: Confidence interval, SSc: Systemic sclerosis, % of pred: percentage of predicted value, DLCO: diffusing capacity of carbon monoxide, sPAP: Systolic pulmonary artery pressure assessed by echocardiogram. Full backward analysis provided a final model that we also obtained using the forward multivariate analysis. In the initial multivariate analysis model, we input for adjustment age and duration of disease and all other parameters with a p value <0.20 in univariate analysis (*i. e.* gender, form of SSc, presence of interstitial lung disease, forced vital capacity, presence of systolic PAP≥ 40 mmHg, fibrinogen, immunosuppressive therapy, and forced vital capacity).

Table 4: Forced vital capacity at follow-up visit according CCL18 at baseline and its variation between inclusion and the following visit

FVC: forced vital capacity, * by additional unit 1% of predicted value, ** by additional ng/ml, [#]serum CCL18 at follow-up visit minus that at baseline

Figure legends

Figure 1: Population of the study

Figure 1: Flow of patients with systemic sclerosis in study



Figure 2: Distribution of baseline CCL18 serum level in patients with systemic sclerosis

SSc: systemic sclerosis; SSc patients with stable lung disease and those with subsequent lung disease worsening were represented by grey bars \square , and black bars \blacksquare , respectively. The best threshold of CCL18 (187 ng/mL) and its 95% confidence interval (159-218 ng/mL) were represented by the black line ______ and small dotted lines _______ respectively.





Figure 3: Kaplan Meier analysis grouped by baseline serum CCL18 level

The black line represents the group of SSc patients with baseline serum CCL18 level above the best threshold of CCL18 (187 ng/mL) and the dotted line the group of SSc patients with baseline serum CCL18 level equal or below the best threshold.



Figure 4: Change in CCL18 levels during the follow-up

Black line _____ represents SSc patients with baseline serum CCL18 level above the best threshold of CCL18 (187 ng/mL) and grey line _____ those with baseline serum CCL18 level equal or below the best threshold.



Figure S1 (supplemental data): serum CCL18 levels from systemic sclerosis patients with and without interstitial lung disease at baseline and healthy controls

Systemic sclerosis patients with interstitial lung disease at baseline (O), systemic sclerosis

patients without interstitial lung disease at baseline (\bullet) and healthy controls (Δ).

Figure S1



Résumé

Le dysfonctionnement endothélial et le dérèglement du système immunitaire sont les deux principaux mécanismes physiopathologiques responsables de la fibrose de la peau et des organes internes dans la sclérodermie systémique (ScS). La pneumopathie interstitielle diffuse (PID) est devenue la principale cause de mortalité de la maladie. L'inflammation pulmonaire est la conséquence de l'activation du système immunitaire, qui stimule la NO synthase inductible (NOS-2) et augmente la production alvéolaire de monoxyde d'azote (NO). L'augmentation de la concentration alvéolaire de NO (CANO) est significativement corrélée à la sévérité de la PID chez les patients atteints de ScS. L'augmentation de la CANO est liée à la l'effet inducteur du sérum des malades sur la prolifération des fibroblastes pulmonaires et leur différentiation en myofibroblastes, faisant ainsi le lien biologique entre l'inflammation alvéolaire et la fibrose pulmonaire dans la ScS. Nous avons ensuite testé la valeur prédictive de la CANO dans la détérioration de la PID. Les patients ayant une CANO supérieure à 5,3 ppb présentent un risque élevé (> 6 fois) de voir survenir l'aggravation de la fibrose pulmonaire ou le décès (évènement combiné) par rapport à ceux qui ont une C_ANO inférieure ou égale à 5,3 ppb. Une valeur de CANO supérieure ou égale à 8,5 ppb permet de détecter les patients avec un risque de 90% de survenue d'évènement combiné dans les trois ans. Ces patients pourraient alors bénéficier d'un traitement approprié précoce. Nous avons évalué l'inflammation pulmonaire dans deux modèles murins de fibrose pulmonaire induite par l'acide hypochloreux et la bléomycine, par la mesure non-invasive du NO expiré (F_ENO). Le pic d'augmentation de F_ENO se situe 4 semaines après le début des injections, et précède la fibrose pulmonaire, qui ne devient significative qu'à partir de 6 semaines d'intoxication. L'augmentation de la F_ENO est liée à l'augmentation de l'expression de la NOS-2 aussi bien aux niveaux des bronches qu'aux niveaux des alvéoles. Enfin, la forte production de NO constatée provoque un effet délétère direct sur le tissu pulmonaire attesté par la présence de 3nitrotyrosines, marqueurs du stress nitrosatif.

<u>Mots-clés:</u> sclérodermie systémique, pneumopathie interstitielle diffuse, monoxyde d'azote, physiopathologie.