



HAL
open science

Altérations de l'expression de la protéine A du surfactant dans les pneumopathies interstitielles diffuses

Nadia Nathan

► **To cite this version:**

Nadia Nathan. Altérations de l'expression de la protéine A du surfactant dans les pneumopathies interstitielles diffuses. Génétique humaine. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066590 . tel-01589652

HAL Id: tel-01589652

<https://theses.hal.science/tel-01589652v1>

Submitted on 18 Sep 2017

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.

THESE

PRESENTEE A

L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

ECOLE DOCTORALE 394 : Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Unité Inserm UMR_S933

Physiopathologie des maladies génétiques d'expression pédiatrique

Par Nadia MOULIN NATHAN

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPECIALITE : Génétique humaine

ALTERATIONS DE L'EXPRESSION DE LA PROTEINE A DU SURFACTANT DANS LES PNEUMOPATHIES INTERSTITIELLES DIFFUSES

Directrice de recherche : Annick CLEMENT

Participation à l'encadrement scientifique : Serge AMSELEM

Soutenue le : 14 septembre 2016

Devant la commission d'examen formée de :

Mr Jean-François BERNAUDIN	PU-PH	Université Pierre et Marie Curie	Président du jury
Mme Catherine BOILEAU	PU-PH	Université Paris Diderot	Rapporteur
Mr Vincent COTTIN	PU-PH	Université Claude Bernard Lyon 1	Rapporteur
Mme Dominique ISRAEL-BIET	PU-PH	Université René Descartes	Examineur
Mme Annick CLEMENT	PU-PH	Université Pierre et Marie Curie	Directeur de thèse
Mr Serge AMSELEM	PU-PH	Université Pierre et Marie Curie	Responsable de l'unité de recherche

Résumé en français

Introduction : Les pneumopathies interstitielles diffuses (PID), incluant les fibroses pulmonaires idiopathiques (FPI), sont des pathologies rares et sévères. Dans moins de 20% des cas, un défaut moléculaire d'un gène du complexe des télomérases ou du surfactant est identifié. L'objectif de ce travail a été de documenter, dans une cohorte de patients pédiatriques et adultes présentant une PID sans cause identifiée, des variations des gènes codant les protéines du surfactant (SP), en particulier SP-A1, SP-A2 et SP-D.

Méthodes : Les gènes du surfactant, en particulier *SFTPA1*, *SFTPA2* et *SFTPD*, ont été séquencés et les variations identifiées ont été étudiées par des analyses fonctionnelles et tissulaires.

Résultats : Dans une cohorte de 345 patients, une mutation hétérozygote du gène *SFTPA1* (p.Trp211Arg) a été identifiée dans une large famille. Les PID étaient isolées ou associées à des adénocarcinomes pulmonaires chez des patients avec FPI. La mutation W211R concerne un acide aminé invariant au cours de l'évolution, altère la sécrétion de SP-A1 et l'expression tissulaire de SP-A. Cinq nouvelles variations de *SFTPA2* ont aussi été identifiées. Au total, une variation de l'un des gènes du système du surfactant a été retrouvée pour 7,5% des patients.

Conclusion : Cette étude a permis d'impliquer pour la première fois le gène *SFTPA1* dans les PID de l'enfant et de l'adulte. L'association entre les mutations de *SFTPA1* et *SFTPA2* et un risque plus élevé de cancers pulmonaire soulève la question d'un conseil génétique complexe, et ouvre des hypothèses physiopathologiques nouvelles ciblant, entre autres, les anomalies de prolifération et de réparation de la surface alvéolaire.

Titre en anglais

Alteration of the Surfactant Protein A expression in idiopathic interstitial pneumonia

Résumé en anglais

Background: Idiopathic interstitial pneumonias (IIP) comprise a heterogeneous group of rare lung parenchyma disorders with high morbidity and mortality. In adults, the most common form of IIP is idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). A genetic cause is identified in up to 20% of cases, telomerase and surfactant genes mutations being the first etiologies. This study aims to investigate the implication of the genes encoding the surfactant protein (SP), in particular SP-A1, SP-A2, and SP-D, in pediatric and adult patients with unexplained IIP.

Methods: Surfactant genes, in particular *SFTPA1*, *SFTPA2* and *SFTPD*, were sequenced. New variations were studied with functional and tissues experimentations.

Results: The study involved 345 patients. A heterozygous missense mutation (p.Trp211Arg) in *SFTPA1* was identified in a large family. The IIP were isolated or associated with an adenocarcinoma of the lung in patients with IPF. The W211R mutation involves an amino-acid that is invariant throughout evolution, impairs SP-A1 secretion, and is associated with an abnormal tissue expression of SP-A. Five new *SFTPA2* mutations were also identified, and all together, a surfactant gene variation was described for 7.5% of the patients.

Conclusion: This study has involved for the first time *SFTPA1* in pediatric and adult IIP. The association of *SFTPA1* and *SFTPA2* mutations with an increased risk of lung cancer raises the issue of a complex genetic counseling in the involved families. It also brings out new pathophysiologic hypothesis such as aberrant proliferation and epithelial repair of the alveolar surface.

Mots-clés en français

Pneumopathie interstitielle diffuse

Fibrose pulmonaire idiopathique

Cancer broncho-pulmonaire

Génétique moléculaire

Surfactant

Collectines

Mots-clés en anglais

Idiopathic interstitial pneumonia

Idiopathic pulmonary fibrosis

Lung cancer

Molecular genetics

Surfactant

Collectins

Ce travail de thèse a été réalisé sous la direction du Professeur Annick Clement, au sein de l'unité mixte de recherche Inserm / UPMC UMR_S933 dirigée par le Professeur Serge Amselem qui a participé à l'encadrement scientifique.

Adresse : Service de Génétique et Embryologie Médicales, Hôpital Armand Trousseau ; 26 avenue du Docteur Arnold Netter, 75012, Paris

Remerciements

Je dédie ce travail de thèse à mon fils Ruben. Il a entendu parler de pipettes, de réactifs et de vocabulaire scientifique avant même de voir le jour. Il a cru que surfactant était le mot le plus courant de la langue française. Il est arrivé tout étonné, en plein milieu de ces années folles et passionnantes qu'ont été l'aventure d'une thèse et d'un travail clinique. Il a vécu ses 3 premières années entouré d'une mère débordée et exaltée ... et bizarrement, lui qui manie le stéthoscope, l'otoscope, et la pipette (de doliprane) comme personne, ne semble pas m'en tenir rigueur. Merci mon fils !

Je remercie tous ceux qui m'ont aidée de près ou de loin à arriver jusque-là :

Annick Clement, mon maître, l'une des femmes les plus talentueuses que je connaisse, tu as toujours été d'une grande exigence envers moi, et j'ai toujours su que c'était le plus grand honneur que tu pouvais me faire. Tu m'as guidée dans les richesses de la pneumologie pédiatrique, tu m'as poussée à affronter la peur de la page blanche, tu m'as amenée tout doucement vers la recherche, et cette expérience m'a donné envie de continuer. Entre deux cafés serrés tu m'entraînes vers des contrées peuplées de savoir, de curiosité, de centres de référence, de filières, d'ouverture vers l'Europe et le monde. J'espère être à la hauteur !

Serge Amselem, tu m'as ouvert les portes de ton laboratoire, tu m'y as fait une place, et seuls certains ici savent à quel point elles sont chères, tu m'as laissé toute la liberté d'apprendre de ton immense expérience, et tu as su faire en sorte que je me sente chez moi dans ton équipe, tu as accepté l'invasion des pneumopathies interstitielles sans condition, tu as soutenu nos projets et tu continues de les faire avancer. Tu m'as accordé beaucoup de ton temps et m'a appris énormément, et surtout qu'un pédiatre et un généticien peuvent être une même personne ... j'ai espoir !

Catherine Boileau et Vincent Cottin, mes rapporteurs, qui ont accepté de juger mon travail, de le critiquer, et de le faire progresser. Jean-François Bernanudin et Dominique Israël-Biet, qui me font l'honneur, tous les deux pour la deuxième fois, de faire partie des membres de mon jury.

Florence Dastot-Le Moal, ma bouée de sauvetage lors de mon arrivée dans le monde inconnu de la génétique. Tu as su me rassurer, me pardonner mon ignorance avec le sourire, m'intégrer, faire démarrer la thématique avec rigueur et efficacité. Tu as toujours été là pour me conseiller, et malgré des responsabilités chronophages, tu m'as toujours gardé un peu de ton temps...et de tes pâtisseries !

Marie Legendre, la seule, l'unique, celle qui est là, toujours là, qui a toujours le temps de te répondre, que tu ne déranges jamais et qui, non contente de te répondre, développe, explique, répète. J'ai appris ce que c'est que l'exigence de la génétique, l'absence de droit à l'erreur, et la responsabilité de ce métier. J'ai appris aussi qu'il fallait éduquer les cliniciens, que bizarrement les généticiens n'ont pas plus de mains que les autres, ni des super pouvoirs (quoi que ?), et que non, on ne peut pas rendre le résultat pour avant-hier.

Philippe Duquesnoy, le fil conducteur. Tu ne sais pas ? Demande à Philippe. Tu veux en discuter ? Demande à Philippe. Et non, on ne te dérange jamais, et oui bien sûr tu peux aider. J'ai rarement rencontré plus gentil et plus aidant, un puits de science et d'expérience !

Bruno Copin, l'atout info du labo. Celui qui comprend quand l'ordinateur essaie de te parler, qui te calme quand ton équation a plus de 2 chiffres, qui modèle des protéines, qui crée des pipelines, des algorithmes et qui communique avec les robots. Et pourtant tu t'es mis à mon niveau, et j'ai presque réussi à comprendre des choses !

Valérie Nau, Enzo Cohen, Claire Jumeau, Irina Giurgea, mais aussi avant Esther Kott, Laurie Galeron, Alice de Ligniville, Nathalie Kuziner, Emilie Filhol-Blin, mes colocs de bureau. J'ai eu de la chance, on rigole bien ici, on discute, on mange, on range, on déménage, on trie, on re-déménage. Tu me files

un anticorps je te file la trouilloteuse, qui veut un gâteau ? Des chips ? Quelqu'un a piqué l'agrafeuse ? C'est où ta manucure ? Oui bien sûr invite des amis on a de la place au bureau 3, il y a une chaise invité de haut style à insérer entre deux pieds de bureau. Merci Valérie pour ton aide incalculable, ton efficacité, ta gentillesse, nos papotages, merci la dream team des PPD, vous vous êtes succédées, chacune a apporté son savoir-faire et sa personnalité à ce travail !

Estelle Escudier, Guy Montantin, Sylvie Tissier, William Pitherboth, Eman Assrawi, Aurélie Pham, Camille Louvrier, Sonia Karabina, Fawaz Awad, Laetitia Cobret, Lucie Thomas, Ludovic Jeanson, Nathalie Collot, Marie-Laure Sobrier, Capucine Hyon, Frédérique Laury, Françoise Defranoux, Ophélie Kubryk-Nean. Chacun d'entre vous m'a réservé le meilleur accueil, m'a appris énormément de choses, m'a fait découvrir des gènes, des maladies inconnues, et des plats délicieux !

Harriet Corvol, ma little miss fun, un jour d'hiver et de bronchiolites, mon chemin de jeune interne a croisé le tien, de grande chef de clinique, et dans un tourbillon de rires, de travail, de contre-visites, de tours du matin, de bilans d'asthme et de transmissions, j'ai su ce que je voulais faire pour les 60 prochaines années : tout pareil. La barre est très haute, mais on rit toujours autant de tout, de rien, de nous, et le travail devient une complicité et un plaisir. Tu me supportes, me guides et me conseilles depuis un moment déjà, je te suis à la trace, ça doit en devenir collant, mais j'espère que notre chemin ensemble sera encore très long !

Guillaume Thouvenin, mon binôme, mon alter ego, le collègue que tu rêves d'avoir ... mais non, arrête de rêver c'est moi qui l'ai ! C'est en grande partie grâce à toi que j'ai eu du temps pour le labo, et que jamais tu ne m'as fait sentir qu'à cause de moi tu avais la tête dans le guidon. Un jour j'espère te rendre la pareille !

Guillaume Aubertin, premier Guillaume du nom en pneumologie, tu as transformé nos journées en les ventilant, tu nous as invités dans ta vie et enivrés sur une péniche, tu es celui qui ne flanche jamais, qui nous défend toujours, le premier à offrir un Nespresso et une banquette au 4^{ème} ... mais attends, tu es encore en vacances ?

Caroline Perisson, ma PADAone, toi qui m'as supportée comme chef, ça a dû être tellement dur que tu as essayé de partir pour le soleil. Idée en bois, on ne quitte pas comme ça une équipe en or ! De photos du mercredi en Demory de fin de semestre, tu es notre rayon de soleil du CRCM au 4^{ème}. Plus d'idées saugrenues, c'est là-haut que ça se passe, c'est entre la souris et la machine à café qu'il faut être !

Jessica Taytard, notre mini-ventilatrice, toujours un petit sentec d'avance, toujours un petit masque à la main, une petite PPC par-ci, une petite VNI par-là, c'est si simple le bonheur ! Notre Vaness nationale, je te transmets le flambeau pour les 3 prochaines années, profite-en bien !

Blandine Prevost, la première que j'ai réussi à détourner vers le droit chemin de la pneumologie, mais, j'espère, pas la dernière. Tu pars avec la petite Madeleine et Junior(ette ?) vers d'autres aventures, tu seras notre référente Asie pour les 2 prochaines années, mais j'espère un jour retravailler avec toi, ou à défaut se refaire une petite cala medea !

Sophie Leyronnas, notre chef, tu as posé tes valises au 3^{ème} et on t'y trouve encore à toute heure en train d'affronter toutes sortes de hordes d'internes qui chaque jour mettent au défi ta patience et ton calme. Mais c'est mal te connaître, toujours présente, toujours mesurée, toujours pertinente, il faudra plus que 24 lits, 2 salles, 8 internes, et des nuées d'externes pour te déstabiliser !

Aline Tamalet, l'outsider du 4^{ème}, celle qui en 24h arrive à en faire plus que toi en une semaine. Celle qui nous fait croire qu'on le vaut bien, en traversant chaque semaine toute l'Ile de France juste pour avoir la chance de partager un Franprix ou une quiche sans pâte avec nous. Celle qui partage ses bons plans « comment gérer ses ados » et de qui je garde consciencieusement les bons conseils pour un jour ... proche.

Corinne Troadec, mon maître de fibroscopie, tu m'as fait confiance, tu m'as donné les clés de ton cabinet. Grâce à toi j'ai touché du doigt la liberté et les joies de la médecine de ville, j'ai rencontré et côtoyé des personnes exceptionnelles au CMSEA, je me suis surprise à croire que je savais faire des EFR et des tests allergeo, et surtout j'ai appris qu'on pouvait, comme toi, être une wonder woman internationale, et garder le sourire.

Arnold Munich, qui un jour, il y a très longtemps, m'a fait découvrir la génétique le temps d'un stage d'externe, et m'a transmis pour la première fois ce virus ... J'ai mis le temps, c'est vrai, mais j'ai fini par y revenir !

Raphaël Borie et Caroline Kannengiesser, mes copains de l'autre bout de la médecine : les adultes. Grâce à vous les grands me sont moins étrangers et me voilà rassurée de savoir qu'un jour mes petits atterriront entre vos mains. Avec vous, puis avec beaucoup de vos collègues nous avons réussi le tour de force de traverser la frontière enfant / adultes, et cette collaboration est sans doute la plus belle réussite de ce travail.

Loïc Guillot, qui est toujours là pour me donner de bons conseils et pour m'aider, et partager avec moi des anticorps, et des pancakes d'anthologie !

Delphine Habouria, Charlotte Mailhat, Meriem Rahmani, Claire Hamoniez, Valérie Klepaki, la fine équipe de RespiRare et RespiFIL qui a réussi à créer une ambiance chaleureuse et dynamique pour les maladies respiratoires rares, mais aussi à nous initier au monde inconnu des bases de données, des réseaux, des dictionnaires, des requêtes, des hakaton, des kakémono, et autres joyeusetés. Désormais on Like la filière et on tweete les newsletters. RespiFIL 4.0 !

Tous les cliniciens qui nous ont fait confiance et nous adressé les prélèvements de leurs patients, et continuent, toujours plus nombreux à le faire.

Les patients et leurs familles, et en particulier la famille décrite dans ce travail, dont j'ai maintenant le plaisir de suivre une charmante jeune fille. Mais aussi les patients pédiatriques qui présentent une pneumopathie interstitielle qui me font confiance, et pour qui j'espère poursuivre ce travail et trouver des solutions, ou du moins des réponses.

Ma famille, eh oui, 40 ans et toujours une carte d'étudiante en poche, ça ne finira donc jamais ? Tu nous avais dit 10 ans, pas 20 ! Une thèse ? Mais tu n'en as pas déjà une ? Ah de sciences. Un article ! On a tout lu, jusqu'au bout. Et ça je mesure à quel point c'est de l'amour, parce que la protéine A du surfactant quand on n'est ni médecin ni scientifique c'est quand même obscur. Mais votre fierté est inconditionnelle, elle n'a aucune limite, elle me donne confiance et me fait grandir. PhD ça veut dire Professeur ? Ah non, pas du tout, ça veut dire docteur, la route est encore longue, il va falloir que vous lisiez encore quelques articles avant ...courage !

Table des matières

1.	Liste des abréviations et URL des sites web utilisés	13
2.	Introduction	16
3.	Physiopathologie des PID.....	17
3.1	L'alvéole pulmonaire et le surfactant.....	17
3.2	Stress cellulaire et réparation épithéliale aberrante.....	21
3.3	Comorbidités associées au développement des PID	25
3.4	PID et cancers	26
3.5	Facteurs génétiques dans les PID.....	27
3.5.1	Gènes du complexe des télomérases	27
3.5.2	Gènes du système du surfactant	29
3.5.2.1	Les protéines hydrophobes SP-B et SP-C	29
3.5.2.2	Le transporteur lipidique ABCA3	32
3.5.2.3	Le facteur de transcription NKX2-1	33
3.5.2.4	Les collectines hydrophiles SP-A et SP-D	34
3.5.2.5	Résumé des caractéristiques des gènes impliqués dans les anomalies du métabolisme du surfactant.....	39
3.5.3	Autres gènes impliqués dans les PID	40
4.	Objectifs du travail	41
5.	Patients, matériel et méthodes	42
5.1	Patients.....	42
5.1.1	Critères d'inclusion	42
5.1.2	Méthode de sélection des patients	42
5.1.3	Recueil de données phénotypiques.....	43
5.2	Etudes génétiques.....	44
5.2.1	Matériel d'étude	44
5.2.2	Séquençage des gènes <i>SFTPA1</i> , <i>SFTPA2</i> et <i>SFTPD</i>	44
5.2.3	Autres études génétiques	45
5.3	Etudes in silico.....	45
5.4	Etudes fonctionnelles cellulaires.....	46
5.4.1	Génération de vecteurs d'expression plasmidiques.....	46
5.4.1.1	Clonage et mutagenèse	46
5.4.1.2	Transformation bactérienne, mini et maxi-prep	47
5.4.2	Transfection de cellules HEK293T humaines	47
5.4.3	Western Blot (WB), et marquage anticorps (Ac)	48
5.4.4	Immunofluorescence	48
5.4.5	Etude du stress du RE.....	49

5.5	Analyses tissulaires	49
6.	Résultats.....	50
6.1	Caractéristiques de la cohorte de patients	50
6.2	Etude de SP-A1	52
6.2.1	Etude génétique et protéique	52
6.2.2	Etudes complémentaires.....	65
6.2.2.1	Etude du stress du RE.....	65
6.2.2.2	Etudes de la localisation cellulaire de SP-A1 en immunofluorescence.....	66
6.3	Etude de SP-A2.....	68
6.4	Analyse pour <i>SFTPD</i>	72
6.5	Etude des autres gènes	76
6.5.1	<i>SFTPB</i>	76
6.5.2	<i>SFTPC</i>	76
6.5.3	<i>ABCA3</i>	76
6.5.4	<i>NKX2-1</i>	76
6.6	Synthèse	76
7.	Discussion.....	80
8.	Conclusion et perspectives	87
9.	Financement.....	88
10.	Références	89
11.	Annexes.....	95

1. Liste des abréviations et URL des sites web utilisés

Abréviations

ABCA3	ATP-Binding Cassette, famille A, membre 3
Ac	Anticorps
AD	Autosomique dominant
AEC	Cellules épithéliales alvéolaires
ATF	Activating Transcription Factor
AR	Autosomique récessif
BiP	Binding immunoglobulin Protein
BSA	Albumine de sérum bovin
CCL	CC-chemokine ligand
CMV	Cytomegalovirus
CRD	Domaine de reconnaissance des carbohydrates
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DDIT	<i>DNA</i> Damage Inducible Transcript
DKC1	Dyskeratosis congenita 1 dyskerin
EFR	Epreuves fonctionnelles respiratoires
FGF	Fibroblast growth factor
FPI	Fibrose pulmonaire idiopathique
HES	Hématoxyline et Eosine
IFN	Interféron
IGFBP	Insulin-like growth factor-binding protein
IL	Interleukine
Ire	Inositol-requiring enzyme
KL	Krebs von den Lungen
LAP	Latency Associated Peptide
LBA	Lavage broncho-alvéolaire
MMP	Métalloprotéinases
Mreg	Macrophages régulateurs
MUC	Mucine
NBD	Domaine de liaison nucléotidique

NFκB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK	Natural killer
PDGF	Platelet-derived growth factor
PERK	Protein kinase RNA-like ER kinase
PID	Pneumopathies interstitielles diffuses
PR	Polyarthrite rhumatoïde
RaDiCo	Rare Disease Cohorts
RE	Réticulum endoplasmique
RGO	Reflux gastro-oesophagien
RTEL	Regulator of telomere elongation helicase
SAVI	STING-associated vasculopathy with onset in infancy
SP	Surfactant Protein (protéine du surfactant)
TDM	Tomodensitométrie
TERC	Telomerase, composant RNA
TERT	telomerase reverse transcriptase
TGF	Transforming growth factor
TINF	TERF1-interacting nuclear factor
TLR	Toll-like receptors
Treg	Lymphocytes T régulateurs
UPR	unfolded protein response
WB	Western Blot
XBP	X-box Binding Protein
YKL-40	Chitinase 3-like

URL des sites web utilisés

1000 genomes : <http://browser.1000genomes.org/index.html>

Ensembl : <http://www.ensembl.org/index.html>

ExAC Browser : <http://exac.broadinstitute.org/>

Exome Variant Server : <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>

Max EntScan 3' : http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq_acc.html

MaxEntScan 5' : http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html

NCBI : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>

Polyphen : <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>

Smart : <http://smart.embl-heidelberg.de/>

Uniprot : <http://www.uniprot.org/>

2. Introduction

Les pneumopathies interstitielles diffuses (PID) (MIM263000) représentent un groupe hétérogène de pathologies rares, le plus souvent sévères. Elles sont caractérisées par des lésions inflammatoires et fibrosantes de la paroi alvéolaire. Leur diagnostic est basé sur des tableaux cliniques compatibles, des anomalies de l'imagerie thoracique caractéristiques de lésions de la structure alvéolo-interstitielle, et un profil restrictif de la fonction respiratoires avec une altérations des échanges gazeux (1–3). Les causes de PID et leurs présentations phénotypiques sont très diverses. Chez l'adulte, la forme la plus fréquente, mais aussi la plus sévère est la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI*) (MIM178500).

Bien que les PID soient plus fréquemment diagnostiquées chez le sujet adulte de plus de 50 ans, elles peuvent survenir à tous les âges, y compris dans la petite enfance (4,5). L'épidémiologie des PID est mal connue. Chez l'enfant, la prévalence serait de moins de 1 enfant / 100 000, avec une morbidité et une mortalité élevée, estimée à environ 15% (6). Chez l'adulte, la prévalence des FPI est estimée à 60 - 80 / 100 000 individus, et leur médiane de survie est de 3 à 5 ans (7,8).

Les connaissances actuelles suggèrent que la plupart des PID se développe chez des individus génétiquement prédisposés, exposés à certaines conditions environnementales et de comorbidités. Les facteurs génétiques impliqués sont actuellement peu documentés. Ceci explique l'orientation de ce travail de thèse sur l'identification des variants génétiques associés au développement des PID, en ciblant en particulier les gènes du système du surfactant.

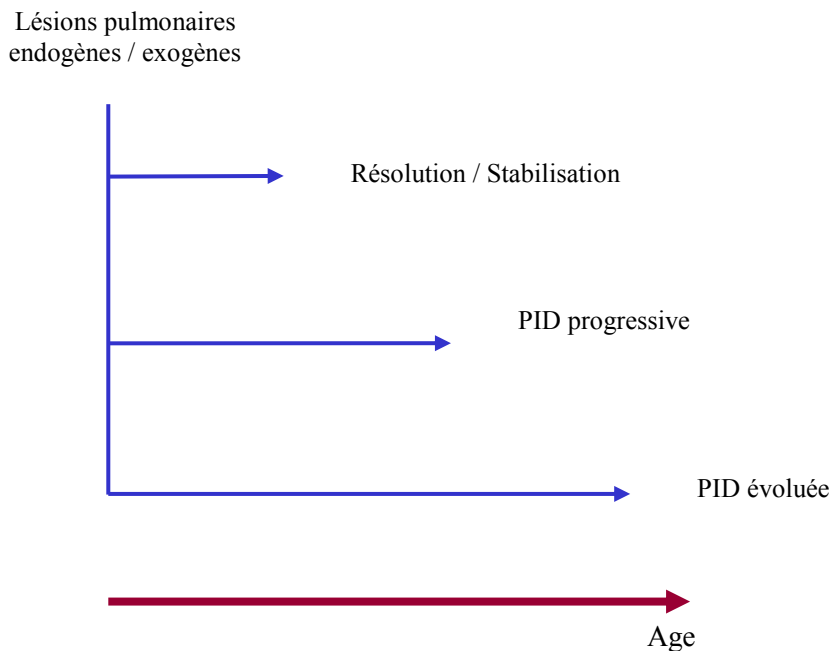
La première partie du document fait le point sur les connaissances physiopathologiques actuelles des PID. La seconde partie expose les recherches effectuées dans le cadre de ce travail de thèse. Elle sera suivie d'une discussion générale.

**Dans ce document, le terme de FPI sera utilisé arbitrairement pour désigner l'ensemble des fibroses pulmonaires.*

3. Physiopathologie des PID

La compréhension physiopathologique actuelle suggère que les PID se développent à partir d'un épithélium alvéolaire génétiquement « vulnérable », soumis à des « agressions » environnementales et de comorbidités répétées, et que le processus lésionnel est accéléré par le vieillissement (9,10). L'altération de la réépithélialisation de la surface alvéolaire et de sa réparation conduit à un remodelage de la structure parenchymateuse et au développement de zones de fibrose pulmonaire (**Figure 1**) (11–13).

Figure 1 : Concept physiopathologique des PID



Schématisation des 3 possibilités évolutives après une lésion endogène ou exogène de la structure alvéolo-interstitielle. Ces évolutions physiopathologiques sont influencées par l'âge.

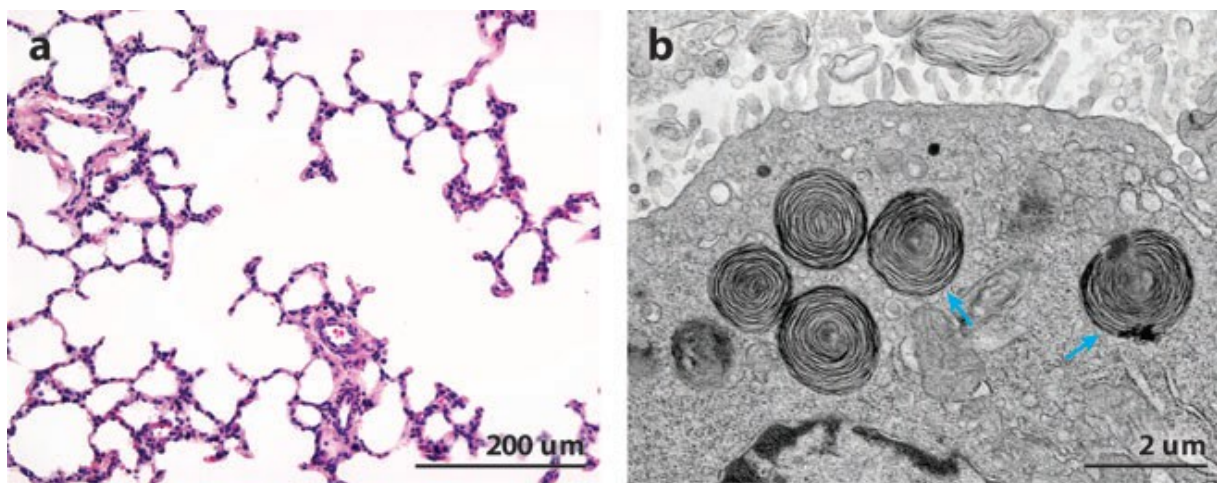
3.1 L'alvéole pulmonaire et le surfactant

L'épithélium alvéolaire est constitué de cellules épithéliales alvéolaires (AEC) de type 1 et 2. Les AEC1 sont des cellules différenciées de façon extrême et incapables de proliférer. Elles couvrent la plus grande partie de la surface alvéolaire et jouent un rôle important dans les échanges gazeux. Les AEC2 sont des cellules cuboïdes métaboliquement très actives. Elles sont considérées comme les

cellules souches de l'épithélium alvéolaire par leur capacité à se multiplier et à se transdifférencier en AEC1 (14).

L'épithélium alvéolaire repose sur une membrane basale. Les capillaires alvéolaires sont disposés au contact de l'épithélium, au sein de chaque septa alvéolaire. L'espace réduit et le plus souvent virtuel situé entre l'épithélium et les capillaires est appelé l'espace interstitiel. Quelques fibroblastes et myofibroblastes peuvent y siéger et des cellules souches mésenchymateuses résidentes y ont été récemment décrites. Dans l'espace alvéolaire, le surfactant pulmonaire sépare l'épithélium de l'espace intra-alvéolaire dans lequel on trouve les macrophages alvéolaires (**Figure 2**).

Figure 2 : Aspects histologiques du parenchyme pulmonaire



(a) Coupe de parenchyme pulmonaire normal, colorée à l'Hématoxyline et Eosine (HES)

(b) Aspect en microscopie électronique des corps lamellaires

D'après Whitsett et al. Alveolar surfactant homeostasis and the pathogenesis of pulmonary disease. *Annu. Rev. Med.* 2010. 61:105–19 (15)

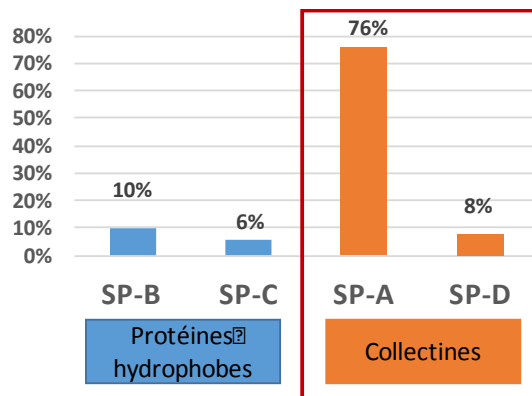
Les rôles de l'épithélium alvéolaire sont multiples. Les 500 millions d'alvéoles qui constituent le poumon mature adulte représentent une très grande surface de contact avec les espaces capillaires pour assurer les échanges gazeux. Cette fonction est rendue possible par la structure même de l'épithélium dont l'extrême finesse permet la diffusion des gaz depuis les capillaires alvéolaires. Lors de la respiration, les AEC sont en effet réduits à une fine couche monocellulaire de moins d'1µm d'épaisseur par la tension de surface alvéolaire. Celle-ci est assurée par la production par les AEC2 du surfactant alvéolaire (13).

Le surfactant est un film phospholipidique tapissant la surface des alvéoles à leur interface air-liquide. Son principal rôle est mécanique : grâce à ses propriétés tensio-actives, il empêche le collapsus alvéolaire, et préserve un volume résiduel permettant de diminuer le travail respiratoire (16). Ses

autres rôles incluent une action anti-infectieuse et immunomodulatrice et une participation à la clairance muco-ciliaire (17,18).

Le surfactant pulmonaire est un composé multimoléculaire synthétisé par les AEC2. Il est formé de 90 % de lipides, principalement des phospholipides de type phosphatidylcholine, assemblés en double couche, et de 10 % de protéines dont 2 à 3% de protéines spécifiques appelées Surfactant Protein (SP)-A, SP-B, SP-C, et SP-D, classées ainsi selon leur quantité respective (**Figure 3**). Les protéines SP-A et SP-D sont des protéines hydrophiles de la famille des collectines, impliquées dans l'immunité locale. Les protéines SP-B et SP-C sont hydrophobes et ont un rôle majeur dans la structure du film tensio-actif du surfactant.

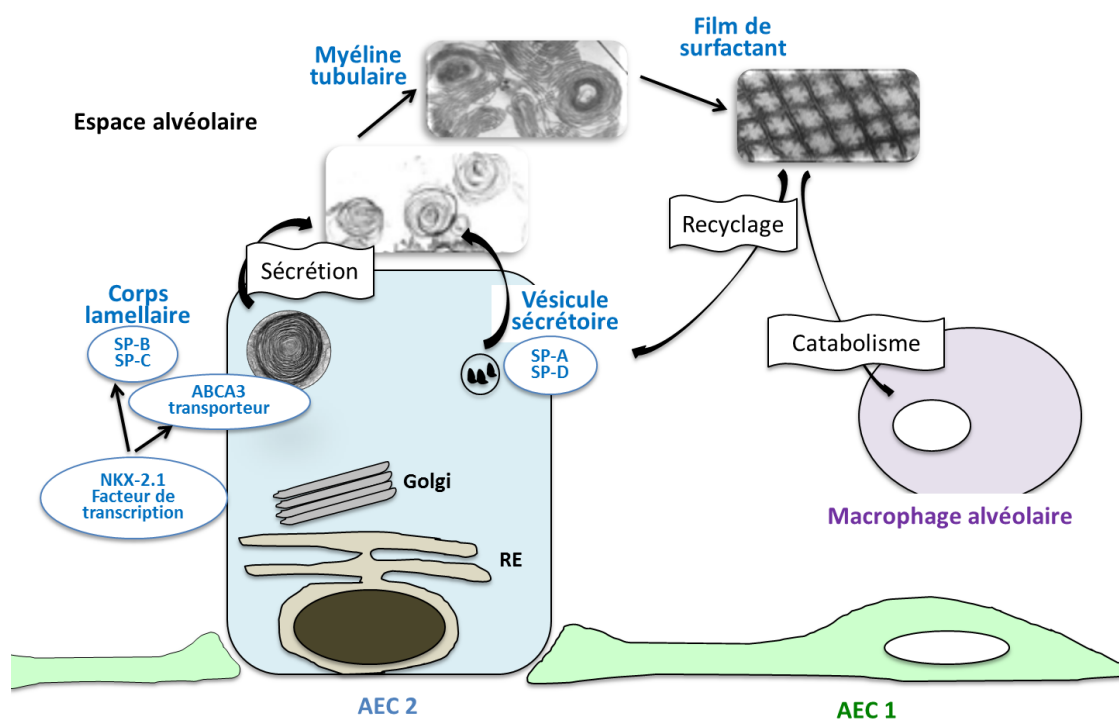
Figure 3 : Quantités relatives des protéines du surfactant alvéolaire



Les protéines hydrophiles SP-A et SP-D représentent 84% des SP sécrétées.

Les protéines SP sont majoritairement produites par les AEC2 où elles vont subir plusieurs étapes de maturation dans le réticulum endoplasmique (RE) puis le Golgi. Leur sécrétion et la formation du film de surfactant alvéolaire ainsi que sa dégradation et son recyclage sont détaillés dans la **Figure 4**.

Figure 4: Le système du surfactant alvéolaire



Les protéines hydrophobes SP-B et SP-C sont acheminées vers l'espace alvéolaire au sein de corps lamellaires grâce au transporteur lipidique ABCA3 (ATP-Binding Cassette, famille A, membre 3). La transcription des gènes codant pour ces 3 protéines est influencée par le facteur de transcription NKX2-1. Les protéines hydrophiles SP-A et SP-D transitent dans des vésicules sécrétoires vers l'espace alvéolaire. Les SP s'assemblent aux phospholipides du surfactant, après « débobinage » des corps lamellaires, formant ainsi une structure en mailles souples appelée myéline tubulaire. Le film de surfactant est en partie recyclé par les AEC2, et dégradé par les macrophages alvéolaires et la clairance muco-ciliaire.

L'épithélium alvéolaire constitue une barrière physique contre les agressions extérieures : bactéries, virus, allergènes, et autres substances toxiques. Le fluide alvéolaire, situé entre l'épithélium et le film de surfactant, est l'un des éléments de cette barrière. Il est constitué de composants issus du sérum, et limite les exsudats en direction de l'espace alvéolaire, permettant à ce dernier de rester relativement sec. Les jonctions serrées entre les AEC sont une structure essentielle de cette barrière physique. Elles empêchent le passage de molécules entre l'espace alvéolaire et l'espace interstitiel. Ce passage est régulé et contrôlé par les différents canaux et pompes ioniques de l'épithélium alvéolaire.

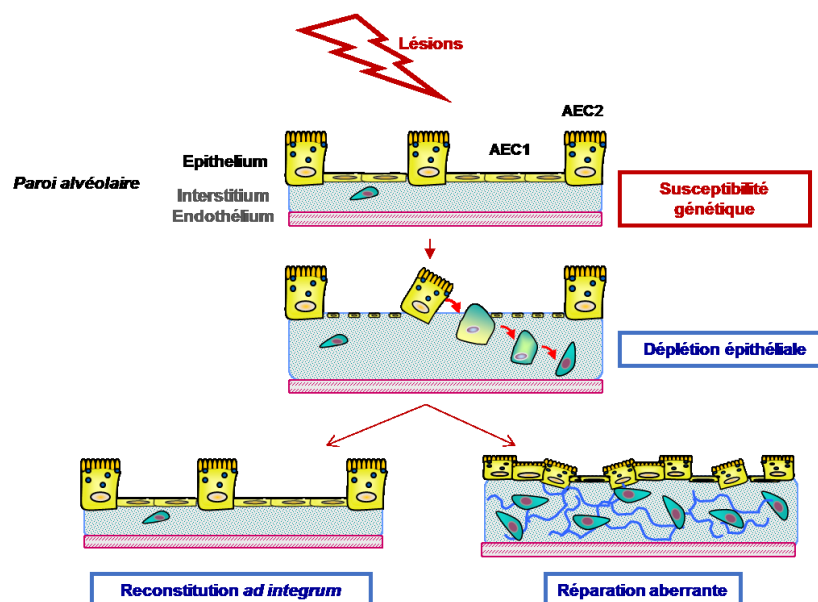
Enfin, l'épithélium alvéolaire participe activement à la réponse immunitaire locale pulmonaire. Cette fonction est assurée de manière différente par les AEC1 et les AEC2 (19). Les AEC1 sont surtout impliquées dans la réaction pro-inflammatoire par leur surface de contact importante avec les macrophages présents dans l'espace alvéolaire. Elles présentent à leur surface des Toll-like récepteurs

(TLR) et peuvent produire différentes cytokines pro-inflammatoires en réponse à la stimulation antigénique microbienne. Les AEC2, par leur production des SP-A et SP-D, ont des fonctions plus anti-inflammatoires et immunomodulatrices qui seront détaillées au chapitre 3.5.2. Les SP participent à la résolution de l'inflammation par des actions sur la phagocytose des cellules apoptotiques, et la sécrétion d'interleukine (IL)-10 et Transforming Growth Factor (TGF)- β (20).

3.2 Stress cellulaire et réparation épithéliale aberrante

L'épithélium pulmonaire est en contact direct avec l'environnement. Il est soumis à de nombreuses agressions telles que les infections virales, les polluants, les toxiques inhalés comme le tabac, ou encore les poussières, en particulier minérales. La capacité de l'épithélium alvéolaire à se reconstituer dépend de facteurs endogènes (génétiques) et exogènes (environnement et comorbidités). L'épithélium alvéolaire est considéré comme l'une des structures dont la vitesse de régénération est des plus lentes de l'organisme, estimée à 4 à 6 semaines. Celle-ci est encore ralentie par les lésions alvéolaires répétées qui entraînent une destruction épithéliale (13,21). Une réparation anormale de la surface épithéliale va provoquer une accumulation de fibroblastes et de composés de la matrice extra cellulaire dans l'interstitium pulmonaire, puis le développement de zones de fibrose (**Figure 5**).

Figure 5 : Etapes physiopathologiques de la réparation épithéliale alvéolaire



Après une lésion de l'épithélium alvéolaire on observe une déplétion épithéliale intéressant principalement les AEC1. La capacité de renouvellement des AEC2 peut permettre la reconstitution d'un épithélium normal. Cependant, lorsque les capacités de réparation de l'épithélium sont dépassées ou altérées, on observe une réparation aberrante avec une accumulation de matrice extra-cellulaire.

Les différentes étapes impliquées dans la réparation alvéolaire font donc intervenir de façon privilégiée les AEC2, les macrophages et les fibroblastes (10,22). La **Figure 6** résume la séquence physiopathologique de la fibrose pulmonaire dans laquelle des lésions alvéolaires répétées ou persistantes entraînent une réparation aberrante aboutissant à la constitution d'une fibrose au lieu d'une réparation de l'épithélium alvéolaire.

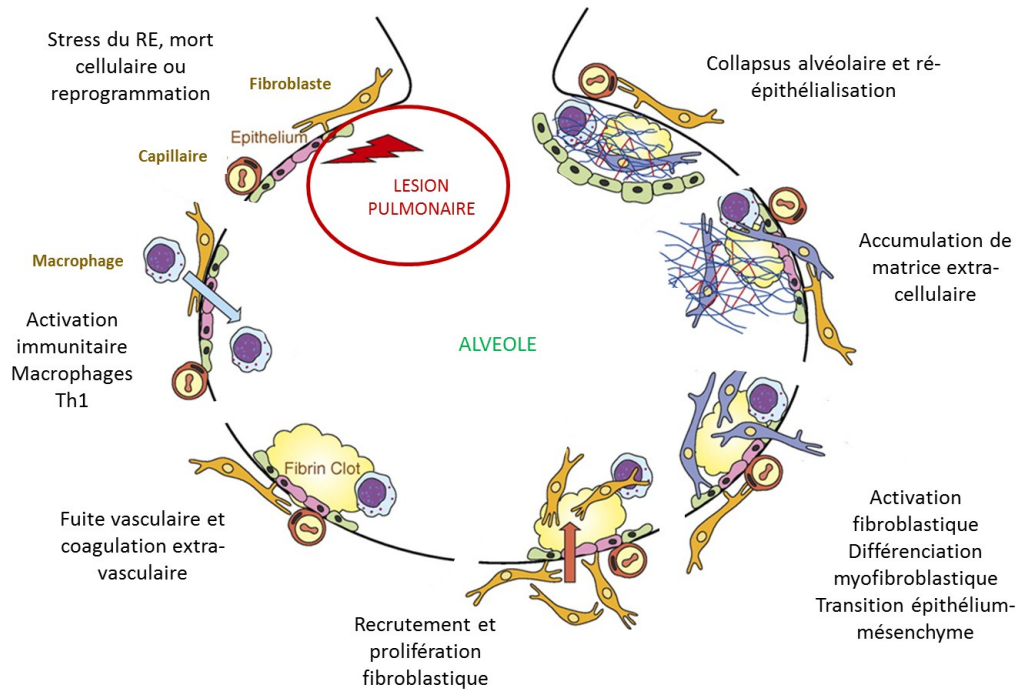
Les lésions alvéolaires induisent une activation de la réponse immunitaire innée. Les macrophages, en particulier les M2a-like, ont un rôle central dans cette réponse et dans la réparation alvéolaire. Ils sécrètent des cytokines profibrotiques et des facteurs de croissance tels que le TGF- β , le PDGF (platelet-derived growth factor), le FGF-2 (fibroblast growth factor), l'IGFBP-5 (insulin-like growth factor-binding protein), le CCL-18 (CC-chemokine ligand), et le Galectin-3. Paradoxalement, les macrophages régulateurs (Mreg/M2c-like) peuvent avoir un rôle anti-fibrotique par la production de cytokines comme l'IL-10. Après une lésion alvéolaire, l'évolution locale est donc fortement influencée par le phénotype des macrophages *in situ* de l'individu.

Le phénotype lymphocytaire influence aussi l'évolution locale : les lymphocytes Th2 et Th17 promeuvent le développement de la fibrose, alors que les lymphocytes Th1 et T régulateurs (Treg) auraient plutôt une action anti-fibrotique.

Biologiquement, la sévérité et l'évolutivité de la PID peuvent être évaluées par des biomarqueurs de l'homéostasie cellulaire tels que SP-A et SP-D, la métalloprotéinases (MMP)-7, le Krebs von den Lungen (KL)-6, le CCL-18, le chitinase 3-like (aussi appelé YKL-40) et la mucine MUC5B. Ces biomarqueurs et leurs implications dans l'évaluation et le suivi des patients ont fait l'objet d'une revue récente donnée en **Annexe 1** (23).

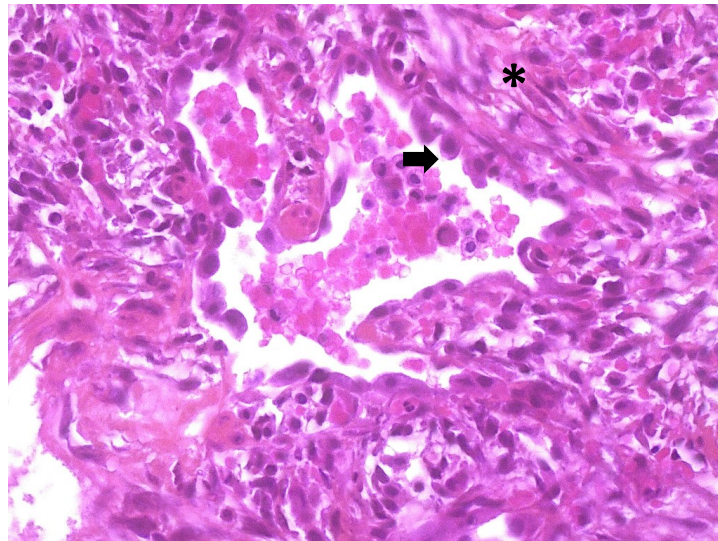
Au plan histologique, la phase précoce de la réparation alvéolaire est caractérisée par une augmentation de la perméabilité vasculaire. Ceci permet l'extravasation de facteurs de coagulation dans les tissus, créant une matrice temporaire constituée de fibrine, de fibronectine, et de plaquettes, dans laquelle migrent des cellules inflammatoires, des capillaires nouvellement formés et des fibroblastes produisant du collagène. La migration, la prolifération des fibroblastes, et leur différenciation en myofibroblastes sont favorisées par les composants de la matrice, et par la production de facteurs de croissance comme le TGF- β par les AEC et les myofibroblastes, créant ainsi une boucle auto-alimentée favorisant la progression fibrotique. Le déséquilibre entre les collagénases présentes dans l'espace interstitiel et les inhibiteurs des MMP participent au dépôt de la matrice extracellulaire. Le tissu fibrotique ainsi constitué, associé à une destruction des AEC, induisent un collapsus alvéolaire et une coalescence des septa alvéolaires. Ces éléments sont retrouvés sur les coupes histologiques de biopsies pulmonaires de patients présentant des fibroses pulmonaires, comme cela est montré sur la **Figure 7**.

Figure 6 : Etapes physiopathologiques de l'évolution vers la fibrose pulmonaire



Les étapes d'une réparation anormale de l'épithélium alvéolaire sont détaillées dans cette figure. Elles font intervenir les AEC2, au sein desquelles les mécanismes de réponse à un stress du RE jouent un rôle clé. On observe par ailleurs une activation des cellules immunitaires et endothéliales alvéolaires, et une activation fibroblastique aboutissant à une accumulation de matrice extra-cellulaire caractéristique des zones de fibrose pulmonaire. D'après Ahluwalia, et al. Am J Respir Crit Care Med. 2014 October 15;190(8):867-878 (10).

Figure 7 : Analyse histologique de biopsie pulmonaire d'un patient présentant une fibrose pulmonaire.

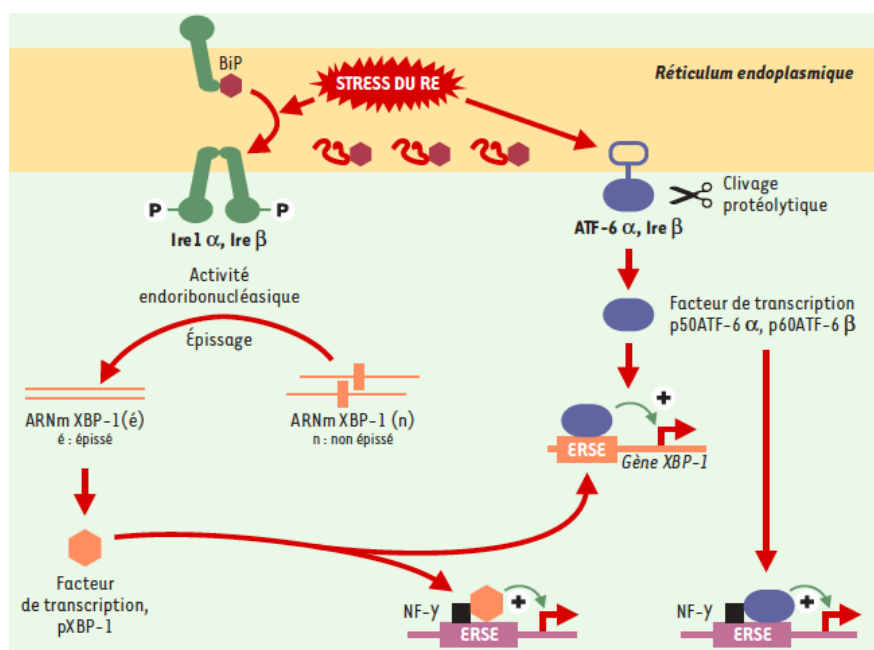


On observe un collapsus alvéolaire avec une desquamation intra-luminale de cellules et de matériel anormal. L'interstitium est le siège d'un envahissement fibroblastique avec des zones de fibrose (*). L'épithélium est épaissi, avec une hyperplasie des AEC2 (flèche) qui font hernie dans la lumière alvéolaire. Grossissement x 400, coloration HES.

L'agression de la surface alvéolaire induit un stress du réticulum endoplasmique (RE) en réponse à l'accumulation de protéines mal conformées dans le RE : la réponse UPR (unfolded protein response). L'UPR active la dégradation protéique par le protéasome et augmente la production de protéines chaperonnes, et en particulier la protéine BiP (Binding immunoglobulin Protein) aussi appelée GRP78, et la dégradation des protéines mal conformées. Si la cellule ne parvient pas à restaurer son homéostasie, les voies de l'apoptose sont activées (24).

Plusieurs voies de signalisation sont activées en cas de stress du RE pour déclencher l'UPR : la voie de l'ATF (Activating Transcription Factor)-6, la voie de l'inositol-requiring enzyme (Ire)-1 α , qui oligomérisse et épisse l'ARNm XBP (X-box Binding Protein)1, et la voie PERK (protein kinase RNA-like ER kinase) **Figure 8**.

Figure 8 : Réponse UPR du RE : rôles d'Ire1 et ATF-6



En situation normale, les protéines transmembranaires Ire1 α et Ire1 β sont gardée sous forme de monomères par leur liaison aux protéines chaperonnes BiP, majoritaires dans le RE. Lors d'un stress du RE, BiP se dissocie des protéines Ire1 pour interagir avec les protéines anormales. Les protéines Ire1 libérées s'oligomérisent et se phosphorylent, permettant l'activation de leur activité endoribonucléasique qui clive l'ARNm XBP-1(n) (n : non épissé) en ARNm XBP-1(é) (é : épissé). Le stress du RE induit un clivage protéolytique des protéines transmembranaires ATF-6, agissant comme facteur de transcription des XBP-1(n), qui seront épissées par les protéines Ire1 activées. L'ARNm XBP-1(é) est traduit en facteur de transcription pXBP-1, activant la transcription des gènes de l'UPR par liaison à des éléments de réponse au stress du RE (ERSE) et aux facteurs de transcription NF-Y. Les facteurs de transcription ATF-6 se lient aussi aux ERSE, activant la transcription des mêmes gènes cibles.

D'après Garlatti M et, Barouki R. Medecine Sciences 2002 ; 18 : 585-94 (25)

Parallèlement à l'activation de gènes de l'UPR, on observe une inhibition de la traduction protéique par la voie PERK, dont l'activation est aussi permise par la libération de la liaison PERK-BiP et l'oligomérisation de PERK.

3.3 Comorbidités associées au développement des PID

De nombreux facteurs de comorbidités interviennent dans le développement des PID, en particulier le reflux gastro-oesophagien (RGO) et les pathologies thromboemboliques (26,27).

Le RGO est un facteur aggravant de l'ensemble des pathologies pulmonaires. Il est plus souvent retrouvé chez les patients présentant une PID que dans la population générale. Les micro-aspirations

dues au RGO seraient associées à une augmentation de la perméabilité épithéliale et à une augmentation de la prolifération des fibroblastes. La présence d'*Helicobacter Pylori* dans le contenu gastrique des patients présentant un RGO pourrait également favoriser le développement d'une inflammation respiratoire. Une des conséquences est la survenue d'épisodes d'exacerbation des patients présentant une PID. Ces arguments ont donc conduit les cliniciens à recommander un traitement par inhibiteurs de la pompe à protons chez les patients présentant une FPI.

Les pathologies cardiovasculaires augmentent la morbidité et la mortalité des FPI. Les mécanismes restent discutés. La FPI pourrait favoriser les anomalies thrombo-emboliques par hypoxie chronique, angor et arythmie. La pathologie pro-thrombotique première pourrait participer à l'altération du processus de réparation de la surface alvéolaire observé dans la FPI, en favorisant le recrutement fibroblastique (28). Cependant, les traitements anticoagulants n'ont pas montré d'efficacité chez les patients présentant une FPI (29).

3.4 PID et cancers

Il est maintenant clairement démontré que la prévalence des cancers pulmonaires est augmentée en cas de FPI. En effet, il a été rapporté que 3 à 23 % des patients présentent un cancer pulmonaire lors du diagnostic de la FPI, et qu'un cancer pulmonaire est retrouvé dans l'histoire médicale de plus de la moitié des patients qui survivent au-delà de 10 ans après le diagnostic de FPI (27,30). Les types histologiques des cancers pulmonaires les plus fréquemment rencontrés en association avec une FPI sont le carcinome épidermoïde et l'adénocarcinome (31,32). La prise en charge des patients présentant une FPI et un cancer pulmonaire est très difficile, et leur mortalité est importante (33).

Sur le plan physiopathologique, la FPI et le cancer associent des altérations des processus de réparation pulmonaire après exposition à divers agents et une susceptibilité génétique (34). Les mêmes facteurs de risque exogènes sont identifiés pour ces deux pathologies : tabac, infections virales, expositions professionnelles et environnementales (35,36). Le vieillissement est également un facteur aggravant, la survenue des FPI et des cancers augmentant avec l'âge (37).

Les mécanismes physiopathologiques restent à préciser, mais ils associent une inflammation locale, un stress cellulaire, une mauvaise conformation protéique activant l'UPR, et une dysfonction du protéasome entraînant un stress du RE une apoptose cellulaire. L'intégrité épithéliale est alors menacée, et sa réparation aberrante peut conduire à la fibrose et à une prolifération cellulaire incontrôlée (38,39).

3.5 Facteurs génétiques dans les PID

Les facteurs génétiques impliqués dans le développement des PID restent peu documentés. Chez les patients adultes, les variants génétiques retrouvés concernent principalement les gènes du complexe des télomérases. Pour les PID de l'enfant, les mutations identifiées à ce jour ciblent en priorité les gènes du système du surfactant pulmonaire.

3.5.1 Gènes du complexe des télomérases

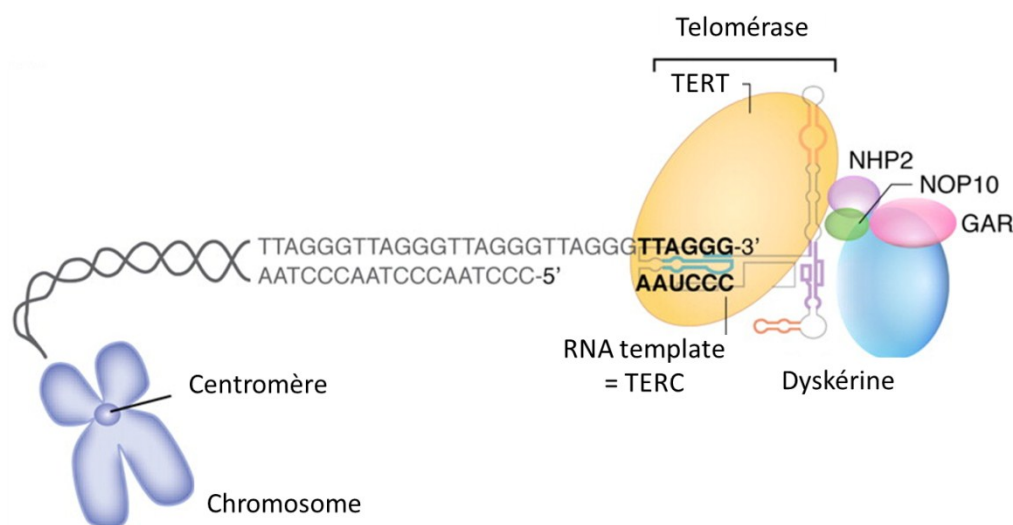
Les télomérases sont composées d'un complexe de protéines et d'ARN impliqué dans le maintien de la taille des télomères par l'addition de nucléotides à leur extrémité.

Les principaux éléments du complexe des télomérases sont la telomerase reverse transcriptase, codée par le gène *TERT*, son composant ARN, la telomerase RNA (*TERC*), et la dyskérine codée par la dyskeratosis congenita 1 dyskerin (*DKC1*) (**Figure 9**). Initialement, les mutations de *DKC1* ont été décrites chez des enfants présentant des troubles hématologiques et cutanés, la dyskératose congénitale, qui peut se compliquer de lésions de fibrose, notamment après greffe de moelle osseuse (40,41). Par la suite, il a été observé que les patients présentant des FPI avaient, dans un certain nombre de cas, des télomères plus courts que ceux analysés dans des populations contrôles. Des mutations des gènes *TERT*, puis *TERC* ont ainsi été identifiées dans des formes familiales et sporadiques de FPI de l'adulte : 15 à 20% des formes familiales de FPI de l'adulte sont associées à des mutations hétérozygotes du gène *TERT* (42). Dans les formes sporadiques de FPI, la prévalence des mutations du gène *TERT* est moindre, estimée à 1- 2,2 % (43). Les mutations du gène *TERC* sont environ 20 fois moins fréquentes.

Après 60 ans, 60% des patients porteurs d'une mutation du gène *TERT* ou du gène *TERC* développent une FPI. Dans cette population, 43% des patients présentent une macrocytose, 51% une thrombopénie, et 31% des anomalies hépatiques (44). La présence d'une de ces anomalies est ainsi prédictive de la présence d'une mutation *TERT* ou *TERC* au sein des cas index de fibrose familiale. De même, les patients présentant une mutation *TERT* ou *TERC* sont à risque de complications hématologiques (myélodysplasie, leucémie aigüe) après transplantation pulmonaire (45).

Parmi les patients présentant une mutation d'un gène des télomérases, 85% ont des télomères dont la taille est en dessous du 10^{ème} percentile. Cependant, 24% des patients atteints de FPI familiale présentent une diminution de la taille des télomères sans mutations des gènes *TERT* ou *TERC* identifiées (46). Une diminution de la taille des télomères (de 10 à 26%) est aussi rapportée dans les cas sporadiques de FPI (47). Ces résultats suggèrent que d'autres gènes impliqués dans le maintien de la taille des télomères pourraient être associés.

Figure 9 : Schématisation du complexe télomérase



Le complexe des télomérases comprend les éléments TERC et son composant ARN TERT, permettant l'ajout de répétitions de nucléotides TTAGGG à l'extrémité 3' des télomères. Les autres protéines (dyskérine, NOP10, NHP2, et GAR) se fixent également à TERC pour stabiliser le complexe.

D'après Calado, et al. Blood. 2008 May 1;111(9):4446-4455 (48)

Le Regulator of Telomere Elongation helicase 1, RTEL1, est une DNA hélicase impliquée notamment dans la réplication et la stabilité de l'ADN. Elle est codée par le gène *RTEL1* dont les mutations homozygotes ont été documentées dans des dyskératoses congénitales (49,50). Elles s'accompagnent aussi de télomères courts (51,52). Plus récemment, des mutations hétérozygotes du gène *RTEL1* ont aussi été associées à des FPI familiales chez des adultes n'ayant pas présenté d'anomalies hématologiques ou cutanées dans l'enfance, mais présentant des FPI sévères avec des télomères courts (53–55).

Le TERF1-interacting nuclear factor (TINF) 2, codé par le gène *TINF2*, fait aussi partie du complexe des télomérases. Les mutations de *TINF2* sont, avec celles de *DKC1*, les causes les plus fréquentes de dyskératose congénitale à expression pédiatrique. Récemment, deux mutations situées sur le même allèle (en cis) du gène *TINF2* ont été mises en évidence par analyse d'exome dans une famille dont les patients adultes présentaient une FPI et une infertilité, sans anomalies hématologiques ou cutanées. Cette observation n'ayant pas encore été rapportée dans d'autres familles, les mutations hétérozygotes de *TINF2* sont considérées comme des causes extrêmement rares de FPI.

Enfin, la Poly(A)-specific Ribonuclease, codée par le gène *PARN*, est une 3' exoribonuclease. Son implication, par analyse d'exome, dans des FPI familiales de l'adulte avec télomères courts a récemment été rapportée (55). Six mutations hétérozygotes du gène *PARN* ont été identifiées dans 6

familles, 5 d'entre elles étant des variants perte de fonction situés dans le domaine ribonucléase CAF1, domaine très conservé au cours de l'évolution des espèces.

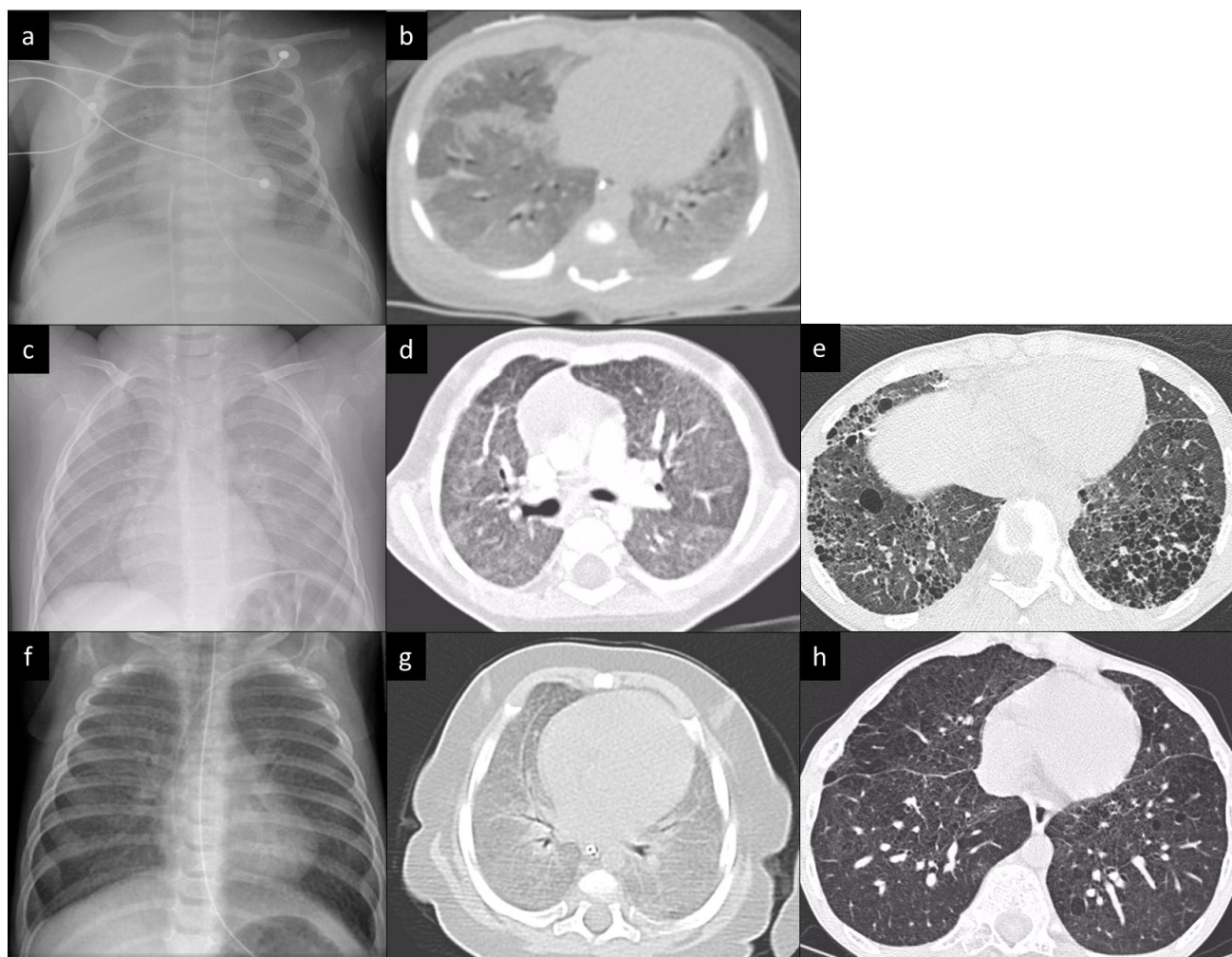
3.5.2 Gènes du système du surfactant

3.5.2.1 Les protéines hydrophobes SP-B et SP-C

La protéine SP-B mature est une protéine hydrophobe de 79 acides aminés, 18 kDa, sécrétée sous forme d'une pro-protéine de 381 acides aminés, qui subit plusieurs étapes de protéolyse entre le RE et les corps lamellaires. Elle interagit de façon étroite avec la double couche phospholipidique du surfactant dans laquelle elle est enchâssée (56). Elle est cruciale pour l'homéostasie du surfactant, en participant principalement à ses propriétés mécaniques tensio-actives. Elle semble aussi nécessaire à la maturation normale de la protéine SP-C. En effet, le déficit en SP-B, documenté dans le lavage broncho-alvéolaire (LBA) ou sur les tissus pulmonaires des patients, est accompagné d'une réduction de la forme mature et d'une accumulation de pro-SP-C (57).

Le gène *SFTPB* (NM_000542), situé sur le chromosome 2 (2p12-p11.2), est composé de 11 exons (exons 2 à 11 codants). Les mutations homozygotes ou hétérozygotes composites du gène *SFTPB* sont associées à un tableau de détresse respiratoire néonatale et à une PID sévère (15,58). Les patients présentent typiquement une détresse respiratoire immédiate post-natale, avec une hypoxémie rapidement réfractaire le plus souvent associée à une hypertension artérielle pulmonaire. Malgré une ventilation mécanique, l'évolution est le plus souvent létale en période néonatale, mais de rares cas de survie prolongée pendant quelques années après transplantation pulmonaire ont été rapportés (59–61). L'aspect radiographique est celui d'une pneumopathie alvéolaire diffuse dense (**Figure 10**). Les analyses histologiques de tissus pulmonaires de patients avec un déficit en protéine SP-B retrouvent un collapsus alvéolaire avec un épaississement interstitiel et une hyperplasie épithéliale (**Figure 11**) (15). Chez les patients adultes, il n'a pas été rapporté de PID avec des mutations de *SFTPB*, mais des variants hétérozygotes de *SFTPB* ont été associés à un risque plus élevé de bronchopneumopathie chronique obstructive chez des sujets fumeurs (62).

Figure 10 : Aspects radiologiques de patients présentant une mutation des gènes du système du surfactant



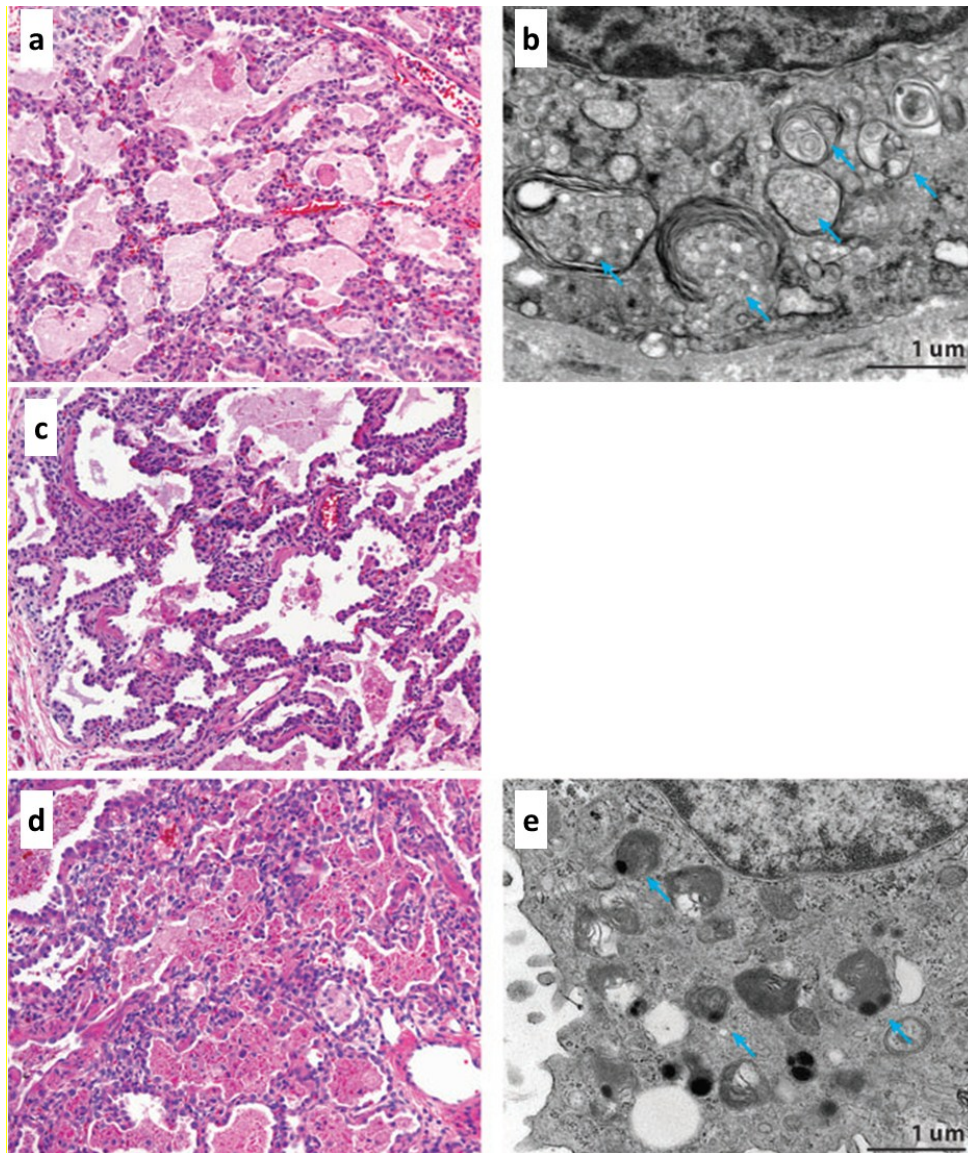
(a) et (b) Aspects radiologiques associés à une mutation du gène *SFTPB*. La radiographie thoracique (a) réalisée en période néonatale chez un nouveau-né ventilé retrouve un syndrome alvéolaire diffus avec une faible ampliation des champs pulmonaires. Cet aspect est confirmé par le TDM thoracique (b) retrouvant des opacités en verre dépoli dense diffuses et homogènes et des condensations alvéolaires.

(c), (d), (e) Aspects radiologiques associés à une mutation du gène *SFTPC*. La radiographie thoracique (c) réalisée chez un nourrisson retrouve des opacités alvéolo-interstitielles diffuses, sans distension pulmonaire. Le TDM thoracique (d) confirme la présence d'opacités en verre dépoli diffuses, ayant évolué à l'âge de 16 ans (e) vers un aspect de fibrose pulmonaire avec images en rayon de miel, et multiples kystes de traction à prédominance sous-pleurale.

(f), (g), (h) Aspects radiologiques associés à une mutation du gène *ABCA3*. La radiographie thoracique (f) réalisée chez un nourrisson retrouve des opacités alvéolo-interstitielles diffuses. Le TDM thoracique (g) précise la présence d'opacités en verre dépoli dense diffuses. Le scanner à l'âge de 15 ans (h) montre une diminution des images en verre dépoli et l'apparition de signes de fibrose avec des kystes de traction.

(f) D'après Doan et al. Clinical, radiological and pathological features of ABCA3 mutations in children. Thorax 2008;63:366-373 (63)

Figure 11 : Aspects histologiques de biopsies pulmonaires de patients présentant des mutations des gènes du système du surfactant



(a) et (b) Lésions associées à une mutation homozygote de *SFTPB*. Après une coloration HES (a), on observe une accumulation de matériel éosinophile dans les macrophages, qui apparaissent spumeux, et dans l'espace alvéolaire. L'épithélium alvéolaire est hyperplasique, en particulier les AEC2 qui bombent dans la lumière alvéolaire. L'interstitium est le siège d'une accumulation fibroblastique et d'une inflammation. Les espaces alvéolaires sont collabés, remplis de dépôts de surfactant, de macrophages, et de cellules épithéliales desquamées. En microscopie électronique (b), les corps lamellaires sont peu nombreux et présentent de larges vésicules. La myéline tubulaire est absente.

(c) Lésions associées à une mutation hétérozygote de *SFTPC* (coloration HES). On retrouve un épaississement des septa alvéolaires, un épithélium alvéolaire hyperplasique une inflammation lymphocytaire, et un collapsus alvéolaire avec une accumulation intra-alvéolaire de macrophages spumeux et de matériel éosinophile.

(d) et (e) Lésions associées à une mutation homozygote de *ABCA3*. Après une coloration HES (d) on observe un aspect comparable aux mutations de *SFTPC*. La microscopie électronique (e) retrouve des corps lamellaires aberrants comportant des inclusions denses.

D'après Whitsett et al. Alveolar surfactant homeostasis and the pathogenesis of pulmonary disease. Annu. Rev. Med. 2010. 61:105–19 (15)

La protéine SP-C est un petit peptide hydrophobe de 197 acides aminés qui est essentiel à la structure tensio-active du surfactant. Elle est sécrétée sous forme de pro-peptide avant d'être incorporée dans la double couche phospholipidique du surfactant et clivée. Elle est constituée d'un domaine NH₂ intra-lipidique, et d'un domaine chaperon, le domaine Brichos, très conservé au cours de l'évolution et qui permet l'adressage de la protéine. La présence d'une protéine SP-C anormale entraîne sa rétention dans le RE, l'activation de l'UPR, et une production accrue de protéines chaperones. Si cette voie est saturée, les protéines mal conformées sont déviées vers le protéasome pour être dégradées. L'absence d'élimination rapide de ces protéines anormales peut conduire à l'accumulation d'agrégats cytotoxiques et à l'apoptose.

Le gène *SFTPC* (NM_003018), situé sur le chromosome 8 (8p21), est composé de 6 exons (exons 1 à 5 codants). Les mutations hétérozygotes du gène *SFTPC* ont été initialement décrites chez des nouveau-nés à terme présentant des détresses respiratoires sévères (64,65). Chez l'enfant, ces mutations représentent l'étiologie la plus fréquente des PID, et environ 15% des PID sont associées à des mutations héritées ou *de novo* de *SFTPC* (59,66–68). Chez l'adulte, des mutations de *SFTPC* ont été impliquées dans de rares cas de PID familiales ou non, chez des jeunes adultes ainsi que chez des patients de plus de 50 ans au début des symptômes (69). Le phénotype clinique associé aux mutations de *SFTPC* est très hétérogène et le mode de révélation est variable. Le diagnostic peut être évoqué devant une détresse respiratoire néonatale chez un enfant à terme présentant un aspect radiologique de pneumopathie alvéolo-interstitielle diffuse (**Figure 10**). Cependant, les symptômes sont plus souvent insidieux, avec une polypnée et des difficultés à la prise alimentaire. Ils peuvent être aggravés par un épisode viral de la petite enfance. Chez le grand enfant et l'adulte, des lésions kystiques radiologiques et des aspects de fibrose pulmonaire peuvent apparaître au cours de l'évolution. Au plan histologique, on retrouve un épaississement des septa alvéolaires, un épithélium alvéolaire hyperplasique avec un certain degré d'inflammation en particulier lymphocytaire, et une accumulation intra-alvéolaire de macrophages spumeux et de matériel éosinophile (**Figure 11**).

3.5.2.2 Le transporteur lipidique *ABCA3*

ABCA3 est un transporteur lipidique de 1704 acides aminés comprenant 12 domaines transmembranaires, 2 domaines de liaison nucléotidiques (de liaison à l'ATP), NBD 1 et NBD 2, et des boucles extra-cellulaires et intra-cellulaires. *ABCA3* est principalement retrouvée au niveau de la membrane plasmique des AEC2. Elle est synthétisée et glycosylée dans le RE puis transportée via l'appareil de Golgi vers la membrane externe des corps lamellaires.

Le gène *ABCA3* (NM_001089), situé sur le chromosome 16 (16p13.3), comprend 33 exons (exons 4 à 33 codants). Plus de 150 variations du gène *ABCA3* ont été décrites à ce jour. Les mutations homozygotes ou hétérozygotes composites de *ABCA3* sont associées à des PID d'intensité variable, allant de détresses respiratoires sévères chez les nouveau-nés à terme, jusqu'à des PID de découverte tardive chez des adultes jeunes (70,71). Le diagnostic est néanmoins le plus souvent posé en période

néonatale, où l'imagerie met en évidence des opacités interstitielles diffuses denses en verre dépoli (**Figure 10**). Les mutations hétérozygotes d'*ABCA3* ont été retrouvées associées à une augmentation du risque de détresse respiratoire néonatale, chez des enfants nés avec une prématurité modérée (72). L'aspect anatomopathologique des biopsies pulmonaires des patients avec des mutations homozygotes du gène *ABCA3* est celui d'une pneumopathie interstitielle desquamative, avec un aspect histologique comparable à celui observé dans les tissus de patients porteurs de mutations du gène *SFTPC*. La microscopie électronique, en revanche, retrouve un aspect caractéristique de corps lamellaires aberrants avec inclusions denses (**Figure 11**).

3.5.2.3 *Le facteur de transcription NKX2-1*

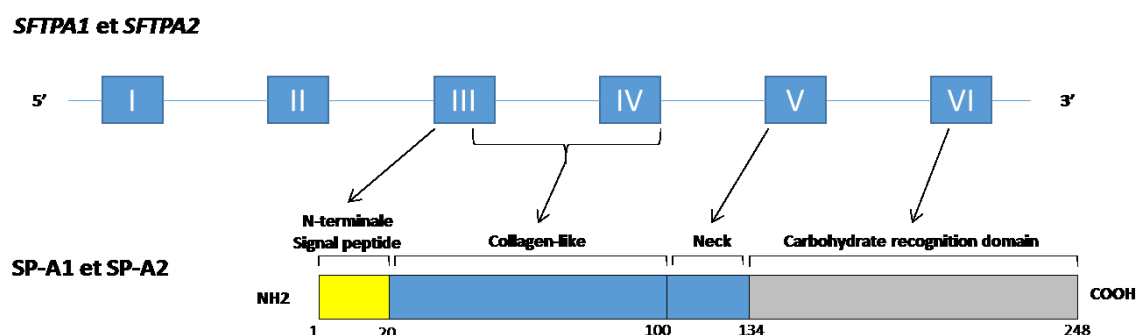
NKX2-1 est un facteur de transcription impliqué dans la formation du surfactant, dans la croissance et la fonction thyroïdienne, et dans le développement neurologique. La protéine NKX2-1, aussi appelée TTF-1, comprend 371 acides aminés. Elle se fixe, entre autres, au promoteur des gènes *SFTPB* et *SFTPC* pour activer leur transcription.

Le gène *NKX2-1* (NM_001079668), situé sur le chromosome 14 (14q13), comprend 3 exons codants. Des mutations hétérozygotes du gène *NKX2-1* ont été associées à un phénotype comprenant de façon inconstante et avec une sévérité variable une PID, une hypothyroïdie périphérique, et une atteinte neurologique à type d'hypotonie, de retard de développement ou de chorée bénigne. Ce syndrome est connu sous les nom anglosaxon de « brain – lung – thyroid syndrome » (73,74). Les PID liées aux mutations de *NKX2-1* peuvent évoluer vers une fibrose pulmonaire, et se révéler dans la petite enfance comme à l'âge adulte comme nous l'avons récemment rapporté dans un manuscrit donné en **Annexe 2**.

3.5.2.4 Les collectines hydrophiles SP-A et SP-D

La protéine SP-A est composée de deux protéines SP-A1 et SP-A2. Les protéines SP-A1 et SP-A2 sont membres de la famille des collectines. Ce sont des protéines de 248 acides aminés (26-37 kDa) hautement homologues, partageant 98 % de leur séquence protéique (alignement protéique donné en **Annexe 3**) (**Figure 12**).

Figure 12 : Représentation des domaines protéiques et des exons des gènes *SFTP1* et *SFTP2*



Les gènes *SFTP1* et *SFTP2* comprennent 6 exons, dont 4 codants (2 à 6). Leur structure incluent un peptide signal, un domaine collagène-like N-terminal constitué de triplets Gly-X-Y (Y étant souvent une hydroxyproline), un cou (domaine « Neck »), et les 115 derniers acides-amino constituant le domaine C-terminal lectine de reconnaissance des carbohydrates (CRD), caractéristique des collectines

Les protéines SP-A1 et SP-A2 sont exprimées principalement dans le poumon distal, par les AEC2 et les cellules de Clara (Ochs 2002). Cependant, leur expression a aussi été rapportée dans une plus faible mesure dans d'autres organes comme l'oreille moyenne, les sinus maxillaires, la prostate, le tube digestif, la rate, le thymus, la plèvre, le péricarde et le péritoine (75). La signification clinique de ces expressions extra-pulmonaires reste peu connue. Leur demi-vie est de 6,5 à 28 heures.

SP-A joue un rôle important dans les mécanismes de défense et l'homéostasie pulmonaire comme nous l'avons rapporté dans une revue sous presse, donnée en **Annexe 4**.

Les actions combinées des différentes SP permettent une régulation de la tension de surface des alvéoles. L'intégrité de SP-A dans ce processus semble cruciale pour la transformation des corps lamellaires en myéline tubulaire. En effet, les souris porteuses d'une invalidation du gène *SFTP* montrent une absence de myéline tubulaire (76). De plus, SP-A participe à l'adsorption des phospholipides dans le film de surfactant et au recyclage des lipides par les AEC2 (77).

Le domaine lectine de SP-A, très conservé au cours de l'évolution des espèces, leur permet de se lier aux monosaccharides des pathogènes, et donc de jouer un rôle majeur dans la réponse immunitaire

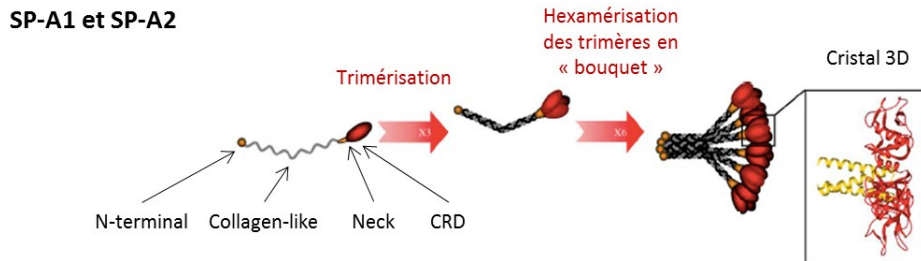
pulmonaire. La liaison aux endotoxines et au récepteur CD14 des pathogènes et l'interaction avec les TLR permet une activation de l'inflammation et la réponse immunitaire par la voie de NF κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells). La protéine SP-A intervient dans le contrôle des réponses anti-inflammatoires et anti-bactériennes par des rôles d'opsonisation, de stimulation de la phagocytose, de régulation de la réponse allergique et de résolution de l'inflammation (78–80). Les souris porteuses d'une invalidation homozygote du gène *SFTPA* ont une susceptibilité particulière aux infections.

SP-A joue aussi un rôle important dans la réparation pulmonaire. Les souris déficientes en SP-A présentent, après induction d'un processus de fibrose par la bléomycine, une survie réduite, une plus grande susceptibilité à développer une fibrose pulmonaire, une augmentation de l'inflammation pulmonaire, et une augmentation de la perméabilité vasculaire. De plus, il a été montré que l'administration de SP-A pourrait améliorer la fonction pulmonaire de ces souris (81). Le rôle de SP-A dans le développement tumoral a aussi été rapporté. Une hyper-expression de SP-A dans des cellules cancéreuses est associée à une augmentation du nombre de macrophages anti-tumeur de type 1 (Tumor associated macrophages), un recrutement de cellules NK (natural killer), et leur activation au sein du tissu cancéreux (82).

L'implication de SP-A dans les processus de réparation épithéliale pourrait faire intervenir le TGF- β . Le TGF- β est produit sous forme inactive (TGF- β latent), complexé au LAP (Latency Associated Peptide), et séquestré dans la matrice extra-cellulaire. Des études récentes indiquent un rôle de SP-A dans l'activation du TGF- β . La liaison de SP-A permettrait de maintenir le TGF- β sous forme active, et d'activer les mécanismes de prolifération et de différenciation impliqués dans les processus de réparation épithéliale, mais aussi de prolifération carcinologique, en intervenant dans des étapes clé de la progression du cycle cellulaire et de l'apoptose (83,84).

SP-A1 et SP-A2 s'oligomérisent en complexes de 6 jeux d'homotrimères en forme de bouquet (**Figures 13 et 14**) (79). Les trimères de SP-A sont stabilisés par deux ponts disulfure entre les cystéines 155 et 246, et entre les cystéines 224 et 238 du domaine de reconnaissance des carbohydrates (CRD) (87). Il a été suggéré que les homotrimères seraient formés de 2 monomères de SP-A1, et un monomère de SP-A2, chacune de ces 2 protéines étant nécessaire à la constitution d'un surfactant fonctionnel (88). Leur conformation permet aux octadecamères de SP-A de s'insérer à l'interface air-liquide de la myéline tubulaire, à la périphérie des doubles couches de phospholipides (**Figure 15**).

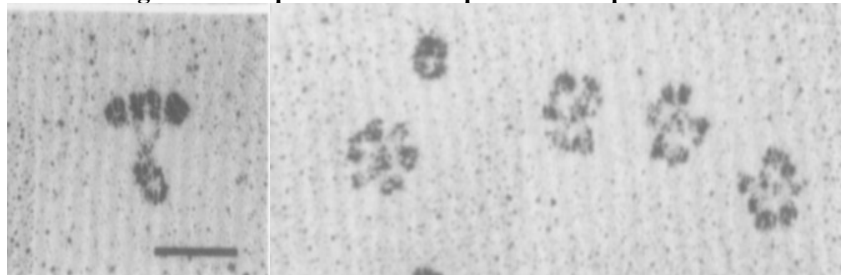
Figure 13 : Représentation schématique et cristallographie 3D des domaines protéiques de SP-A1 et SP-A2 et de leur mode de polymérisation.



Les monomères de SP-A se trimérisent puis les trimères s'hexamérisent formant des bouquets.

D'après Kishore U et al. 2006. Mol Immunol 43 (2006) 1293–1315 (79)

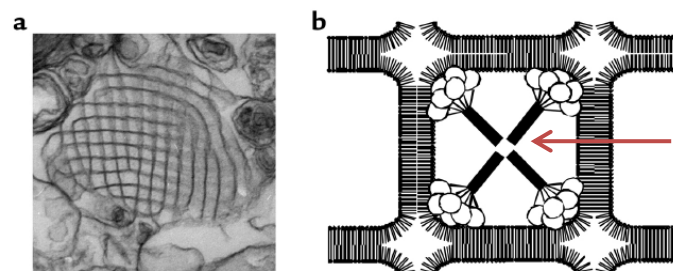
Figure 14 : Aspect en microscopie électronique de SP-A



Les octadécamères de SP-A forment des bouquets.

D'après Voss T. et al. 1988. J Mol Biol 201,219-227 (89)

Figure 15 : SP-A au sein du maillage phospholipidique de la myéline tubulaire



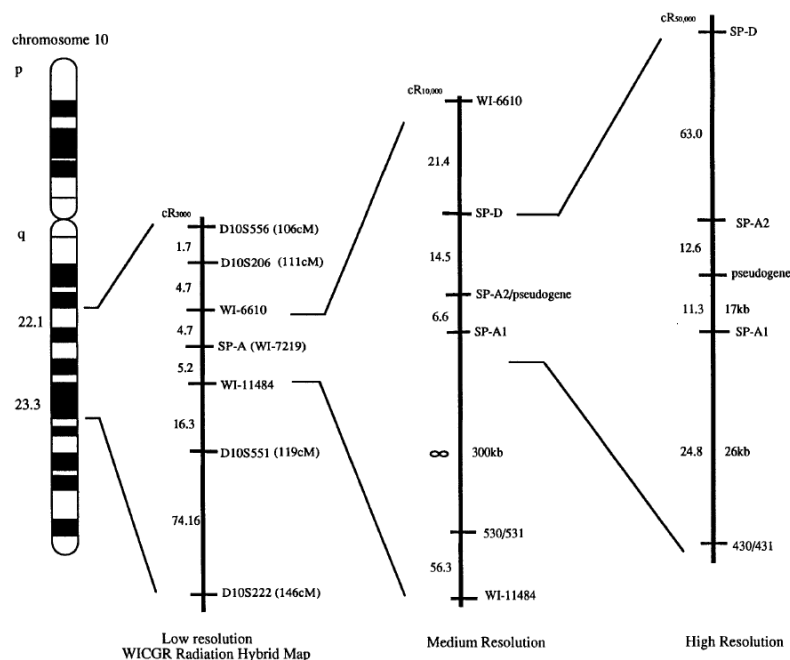
(a) Aspect en microscopie électronique de la myéline tubulaire, qui forme un maillage constitué principalement de phospholipides.

(b) Les octadécamères de SP-A (flèche) sont insérés entre des mailles de phospholipides, alors que les protéines hydrophobes SP-B et SP-C sont enchâssées dans la double couche phospholipidique. Cette disposition fait des collectines le premier rempart du surfactant contre les agents microbiologiques.

D'après McCormack. and Whitsett Jeffrey A. 2002. J. Clin. Invest. 109:707–712 (90)

Les protéines SP-A1 et SP-A2 sont codées par les gènes *SFTPA1* et *SFTPA2*. *SFTPA1* et *SFTPA2* sont 2 gènes très homologues localisés dans la région chromosomique 10q22-23 (85,86) (**Figure 16**).

Figure 16 : Positions génomiques relatives des gènes *SFTPA1*, *SFTPA2*, et *SFTPD* sur le chromosome 10



SFTPA1 et *SFTPA2* et sont distants d'environ 40 kb. Ils sont positionnés en opposition de phase, et sont séparés par un pseudogène de la même famille, *SFTA3P*. *SFTPD* est situé dans la même région chromosomique.

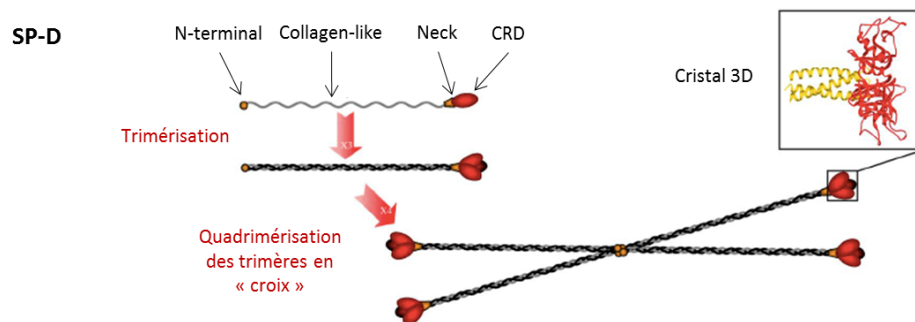
D'après Hoover R R, and Floros J. 1998. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 18:353–362 (85)

Plusieurs études ont montré que certains haplotypes de *SFTPA1* et *SFTPA2* étaient retrouvés fréquemment (>1%) dans la population générale, et que des haplotypes rares de *SFTPA1* et *SFTPA2* étaient associés à un risque plus élevé de cancers pulmonaires (carcinomes non à petites cellules, et d'adénocarcinomes pulmonaires) (91,92). Plus récemment, deux mutations de *SFTPA2*, situées dans le CRD de SP-A2 (F198S et G231V), ont été identifiées dans deux familles comprenant plusieurs individus adultes atteints de FPI et/ou de carcinomes bronchiolo-alvéolaires (93). Les études fonctionnelles réalisées ont montré que les protéines mutantes étaient séquestrées dans le RE des cellules et n'étaient pas sécrétées, contrairement à la protéine sauvage. Elles induiraient un stress du RE et une plus grande instabilité protéique conduisant à une activation du protéasome (94), avec possiblement une augmentation de la production de TGF- β 1, mais ceci n'a pas été clairement démontré (95,96). Les mutations (F198S et G231V) entraîneraient une diminution de la dimérisation et trimérisation des protéines SP-A (Song 2012). Plus récemment, quatre autres mutations de *SFTPA2*, dont 3 dans le CRD (c.35T>G, L12W ; c.511A>T, N171Y ; c.629A>C, N210T ; c.691G>A, G231R)

ont été décrites chez des adultes présentant des FPI et/ou des cancers broncho-pulmonaires, mais sans études fonctionnelles attestant de leur pathogénicité (97,98).

La protéine SP-D est une collectine de 43 kDa de structure similaire à SP-A (**Figure 17**). SP-D est capable de se fixer à différents pathogènes (virus, bactéries, champignons, parasites), via son CRD, et d’agir comme une opsonine en stimulant la réponse immunitaire. Cette interaction active la liaison des micro-organismes aux cellules phagocytaires (macrophages et neutrophiles), permettant ainsi leur élimination. SP-D peut également augmenter la perméabilité de la membrane des pathogènes et favoriser leur destruction (99).

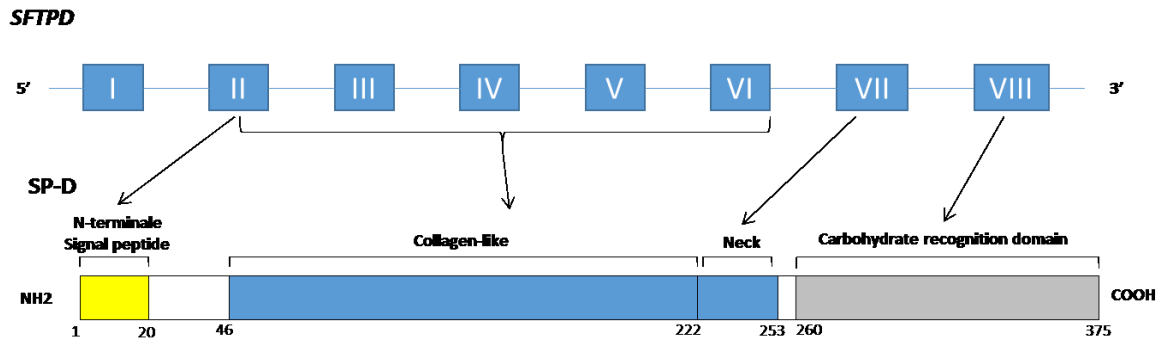
Figure 17 : Représentation schématique et cristallographie 3D des domaines protéiques de SP-D et de leur mode de polymérisation



Les monomères de SP-D s’assemblent en tétramères en « croix » puis en dodécamères.
D’après Kishore U et al. 2006. Mol Immunol 43 (2006) 1293–1315 (79)

La protéine SP-D est codée par le gène *SFTPD* (NM_003019) (**Figure 18**). Il est situé à environ 100 kb de *SFTPA1* et *SFTPA2* sur le chromosome 10 (10q22.23) (**Figure 16**). Chez l’homme, des variants génétiques de *SFTPD* (dont le polymorphisme p.Met11Thr) ont été associés à de nombreuses pathologies pulmonaires dont des infections virales sévères en particulier à VRS (100–102). A ce jour, leur implication dans les PID n’a pas été documentée.

Figure 18 : Représentation des domaines protéiques et des exons du gène *SFTPD*



Le gène *SFTPD* comprend 8 exons, dont 7 codants. La protéine SP-D comprend un peptide signal, deux domaines collagènes-like N-terminal constitué de triplets Gly-X-Y (Y étant souvent une hydroxyproline), un cou (domaine « Neck »), et un domaine C-terminal lectine CRD.

3.5.2.5 Résumé des caractéristiques des gènes impliqués dans les anomalies du métabolisme du surfactant

Les caractéristiques des différents gènes discutés ci-dessus sont résumées dans la **Table 1**.

Table 1 : Principaux gènes du système du surfactant dont des mutations ont été associées aux PID de l'enfant et/ou de l'adulte

Gène	Localisation Nombre d'exons codants	PID de l'enfant	PID de l'adulte	Mode de transmission
<i>SFTPA1</i>	10q22.3 4 exons	Non décrit au début de ce travail	Non décrit au début de ce travail	Non décrit au début de ce travail
<i>SFTPA2</i>	10q22.3 4 exons	Non décrit	Oui, associé à des adénocarcinomes	AD
<i>SFTPB</i>	2p12-p11.2 10 exons	Oui	Non décrit	AR
<i>SFTPC</i>	8p21.3 5 exons	Oui	Oui	AD
<i>SFTPD</i>	10q22.2 9 exons	Non décrit	Non décrit	Non décrit
<i>ABCA3</i>	16p13.3 32 exons	Oui	Oui	AR
<i>NKX2-1</i>	14q13.3 3 exons	Oui	Oui, associé à des atteintes thyroïdiennes et neurologiques « Brain-lung-thyroid syndrome »	AD

AD : autosomique dominant, AR : autosomique récessif

3.5.3 Autres gènes impliqués dans les PID

La protéine MUC5B est une glycoprotéine de la famille des mucines. Elle joue un rôle majeur dans la clairance muco-ciliaire et la défense anti-infectieuse au niveau de l'arbre respiratoire. Un polymorphisme fréquent (rs35705950), situé dans le promoteur du gène *MUC5B*, a été associé à un risque plus élevé de FPI et à une production augmentée de MUC5B. En effet, le risque de FPI était multiplié par 20 s'il était présent à l'état homozygote, et par 7 s'il était présent à l'état hétérozygote. Ce polymorphisme était retrouvé chez 34 à 38% des patients présentant une FPI familiale ou sporadique, comparé à 9% dans une population de sujets témoins. Le mécanisme d'action reliant MUC5B au développement de FPI est mal compris, mais il a été suggéré que l'accumulation de mucine puisse favoriser l'occlusion des voies aériennes et perturber l'homéostasie du parenchyme pulmonaire. L'expression anormale de MUC5B pourrait aussi être impliquée dans une altération des mécanismes de prolifération cellulaire et de réponse immunitaire locale (103,104).

La protéine STING est une protéine impliquée dans l'activation de la transcription des gènes codant pour les interférons (IFN) de type 1. Le gain de fonction de STING entraîne une levée d'inhibition pathologique de la voie JAK1/STAT aboutissant à une synthèse excessive d'IFN-1. La protéine STING est codée par le gène *TMEM173*. Ses mutations ont été identifiées dans des PID de l'adulte et de l'enfant dans le cadre d'un syndrome rare appelé SAVI (STING-associated vasculopathy with onset in infancy). Ce syndrome est caractérisé par une vasculopathie inflammatoire avec auto-immunité, fièvre récurrente, et fibrose pulmonaire, avec un mode de transmission autosomique dominante. A ce jour, seuls quelques cas pédiatriques et de l'adulte jeune ont été rapportés dans la littérature (105,106).

Plus récemment, le transporteur intra-cellulaire, COPA, codé par le gène *COPA*, a été impliqué dans les PID de l'enfant avec auto-immunité et saignements alvéolaires (107).

4. Objectifs du travail

Le travail réalisé a eu pour objectifs de :

(i) documenter, dans une cohorte de patients pédiatriques et adultes présentant une PID, les variations des gènes du surfactant, en ciblant plus particulièrement *SFTPA1*, *SFTPA2* et *SFTPD*

(ii) décrire les caractéristiques phénotypiques des patients et les corrélations génotype/phénotype

5. Patients, matériel et méthodes

5.1 Patients

5.1.1 Critères d'inclusion

Les critères d'inclusion ont été les suivants :

1/ Patients présentant une PID

La PID est définie selon les critères suivants d'anamnèse, cliniques, radiologiques, fonctionnels, et si possible histologiques :

- Cliniques : insuffisance respiratoire chronique avec au moins l'un des critères parmi dyspnée, polypnée, toux, cyanose au repos ou à l'effort
- Radiologiques : tomodensitométrie (TDM) thoracique retrouvant des images en verre dépoli ou alvéolaires diffuses et/ou réticulations, bronchiectasies de traction, images en rayons de miel, nodules
- Fonctionnels : gaz du sang objectivant une hypoxie de repos ou à l'effort, et épreuves fonctionnelles respiratoires (EFR) retrouvant des anomalies restrictives avec diminution de la capacité vitale fonctionnelle, de la capacité pulmonaire totale, et une altération de la diffusion du monoxyde de carbone.

Les types de PID étaient les suivants :

- PID sporadiques pédiatriques et adultes (avant l'âge de 50 ans)
- PID familiales pédiatriques et adultes
- PID associées à un antécédent personnel ou familial de cancer broncho-pulmonaire

2/ Absence de mutation des gènes du complexe des télomérases (pour les patients adultes)

3/ Signature du consentement éclairé aux analyses génétiques par le patient ou ses parents / responsables légaux.

5.1.2 Méthode de sélection des patients

L'étude est portée par la filière de santé des maladies respiratoires rares (RespiFIL) et ses centres de référence pédiatrique et adulte (**Annexe 5**). La participation à l'étude a été proposée aux patients lors d'une visite dans les centres de référence ou de compétence affiliés.

5.1.3 Recueil de données phénotypiques

A partir de la feuille d'information clinique, les données phénotypiques suivantes ont été recueillies.

- Nom, prénom, date de naissance, sexe
- Origine ethnique / géographique des deux parents
- Consanguinité
- Environnement
 - o Tabagisme
 - o Exposition professionnelle
- Paramètres cliniques
 - o Age au début des manifestations respiratoires
 - o Dyspnée
 - o Oxygénodépendance
 - o Cancer bronchopulmonaire
 - o Manifestations extra-pulmonaires
 - Articulaires
 - Cardiovasculaires
 - Cutanées, phanériennes ou muqueuses
 - Digestives
 - Hépatiques
 - Neurologiques
 - Onco-hématologiques
 - Autres
- Transplantation pulmonaire
- Examens complémentaires
 - o TDM thoracique
 - o LBA
 - o Biopsie pulmonaire
- Résultats des études génétiques du complexe des télomérases
- Histoire familiale
 - o Arbre généalogique
 - o Manifestation pulmonaires
 - PID/FPI
 - Cancer bronchopulmonaire
 - Transplantation pulmonaire
 - o Manifestations extra-respiratoires

5.2 Etudes génétiques

5.2.1 Matériel d'étude

Un prélèvement sanguin a été réalisé lors d'une consultation dans le centre de référence ou de compétence où le patient est suivi. Le prélèvement a été adressé dans le laboratoire avec le consentement signé et la feuille de renseignements cliniques.

5.2.2 Séquençage des gènes *SFTPA1*, *SFTPA2* et *SFTPD*

Les séquençages par méthode Sanger des gènes (exons et bornes introniques) *SFTPA1*, *SFTPA2* et *SFTPD* ont été réalisés.

Les amorces de PCR et de séquence ont été choisies de façon spécifique pour chaque gène, *SFTPA1* et *SFTPA2* étant hautement homologues (**Table 2**).

Table 2 : Amorces utilisées pour l'amplification par PCR des gènes *SFTPA1* (NM_005411), *SFTPA2* (NM_001098668) et *SFTPD* (NM_003019) et pour les réactions de séquences correspondantes

		Amorce 1	Amorce 2
<i>SFTPA1</i>			
PCR		5'-CCATGACTGACCACCTTGAG-3'(F)	5'-CCTGGCCTTCTAACCTCATG-3'(R)
	Exon 3	5'-CAGTGAGTGAGTGACCTGAC-3'(F)	5'-ACCTGCCCCACCCTGCTCAC-3'(R)
	Exon 4	5'-GCTATAGTAAGCTGGGTGGG-3'(F1)	5'-TGGAGAGTCTGTCCTCATAG-3'(F2)
	Exon 5	5'-GAAATGGTGCAATTCCTGG-3'(R1)	5'-GGGCCATTCAAAGACATCAG-3'(R2)
	Exon 6	5'-TTCCAGGAAATTGCACCATT-3'(F)	5'-TCAGTGATTATGGGGAAGAG-3'(R)
<i>SFTPA2</i>			
PCR		5'-CTGTGAGAGGGTCATCACCC-3'(F)	5'-TGATGGCACTGGGCAGGCAG-3'(R)
	Exon 3	5'-GGGCTGGCTCAGCTATCA-3'(F)	5'-GACTCGATGCCATTATCAC-3'(R)
	Exon 4	5'-TGATAGCTGAGCCAGCCC-3'(F1)	5'-TATGATGGCGCATCCTGGAG-3'(F2)
	Exon 5	5'-ATGAAAGGGCAGAGTTCAG-3'(R1)	5'-CCTAGGATTCAGTGGAAAGC-3'(R2)
	Exon 6	5'-AGGCAGAGATGGAGAGACTG-3'(F)	5'-CAAGTGAATTCTGTTGAAAG-3'(R)
<i>SFTPD</i>			
PCR	Exon 2	5'-CATGCTCTCCATCCAGACCT-3'(F)	5'-CCCACCCTTCATGCAGTAG-3'(R)
	Exons 3-5	5'-CATAGAAGGTCAGGCAGGTC-3'(F)	5'-CTCCCTAGATAGGAACAGTCCC-3'(R)
	Exons 6-7	5'-GGTTAGTTGTTGGGTGGCG-3'(F)	5'-TAGTTCAGGAGCCTGATGGC-3'(R)
	Exon 8	5'-GGGCTGTTCTGGAACAATCTC-3'(F)	5'-ATAGGGAAAGTAGGCTGGCC-3'(R)
Séquence	Exon 2	5'-TGGATTCCCTGCTGCTCTAGG-3'(F)	5'-AAACACGTCTCCAGACTCC-3'(R)
	Exon 3	5'-TTTCTGGATCACCCTGGG-3'(F)	5'-TGTTGTCCTCCCAACAGCAG-3'(R)
	Exon 4	5'-ACAGATGGGACCTGCTGTTG-3'(F)	5'-TGGCAAGCCTTTCAGCATC-3'(R)
	Exon 5	5'-ATTTCTCTCACCTCCAC-3'(F)	5'-ATTCTCTCCATGTTCCAGCG-3'(R)
	Exon 6	5'-CTGCCATTAATGGGGCACAC-3'(R)	5'-TGTCCGCTTTCCTGAGTT-3'(R)
	Exon 7	5'-GCCAGCTGTGTCAGTAGATG-3'(F)	5'-CTTGGATCTACTTTGAGCTCC-3'(R)
	Exon 8	5'-CTGTTTGGGAGGTCTGAAAG-3'(F)	5'-TGGCCACATTCTGGAGAGAA-3'(R)

Pour chaque gène, les amorces sens (Forward, F) et anti-sens (Reverse, R) sont fournies.

Les protocoles détaillés de PCR et de séquençage utilisés pour chacun des 3 gènes sont fournis en **Annexe 6**. Brièvement, l'ADN des patients a été extrait par méthode Flexigen (Quiagen). Les exons codants et leurs régions introniques flanquantes ont été séquencés. La réaction de PCR a été réalisée avec le Master Mix GreenGoTaq (Promega), et la réaction de séquence avec le Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystem) après une étape de purification par Exosap-IT.

A partir de juin 2015 un séquençage par méthode Next Generation Sequencing (NGS) a été réalisé en première intention. Le séquenceur utilisé est MiSeq ou NextSeq (Illumina), avec une capture NGS ciblée SeqCap EZ Choice (Roche Nimblegen). Les données ont été analysées selon un double pipeline informatique. Les régions codantes et leurs régions introniques flanquantes sont couvertes avec une profondeur $\geq 50X$. Dans le cas contraire, ces régions sont mentionnées ou analysées par séquençage Sanger.

En cas de nouvelle variation identifiée, un contrôle par séquençage Sanger a été systématiquement réalisé et une étude de sa pathogénicité a été réalisée *in silico* et par des études fonctionnelles.

5.2.3 Autres études génétiques

L'analyse des gènes *SFTPB*, *SFTPC*, *ABCA3*, *NKX2-1* a été réalisée pour les patients par méthode Sanger ou par NGS, avec vérification par méthode Sanger des variations retrouvées. Le gène *NKX2-1*, a été analysé par méthode Sanger.

Les gènes du complexe des télomérases ont été analysés dans le service de génétique de l'hôpital Bichat (Dr Caroline Kannengiesser, Pr Catherine Boileau) pour les patients adultes inclus.

5.3 Etudes in silico

La pathogénicité de chaque variant identifié a été étudiée « *in silico* » selon plusieurs critères :

- sa localisation dans la structure protéique (domaine conservé, domaine de liaison)
- le changement d'acide aminé, de polarité, de charge induit
- son effet sur l'épissage en utilisant le logiciel MaxEntScan et en comparant les éventuels sites donneurs ou accepteurs d'épissage créés aux sites usuels
- sa description, dans les bases de données de polymorphismes (ExAC, NCBI, 1000 genomes, Ensembl, EVS), et le cas échéant, à quelle fréquence allélique et dans quel groupe de population
- sa description dans la littérature
- pour certains variants, une modélisation cristallographique 3D des modifications structurales et électrostatiques induites a été étudiée. Les modélisations 3D du domaine de reconnaissance des carbohydrates de la protéine SP-A1 sauvage et des variants ont été générées à partir des résidus 201 à

248 de la protéine SP-A1 murine issus de la Protein Data Bank (PDB ID :3PAK). Les modélisations des structures protéiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Modeller version 9.10. L'exactitude des structures générées par Modeller a été vérifiée par le logiciel Procheck version 3.5.4 (108,109). Les modifications conformationnelles induites par les variations protéiques ont été évaluées par une comparaison entre les valeurs de RMSD du cristal sauvage et du cristal variant grâce au logiciel SuperPose version 1.0 (Maiti 2004). La modélisation électrostatique des surfaces protéiques a été générée grâce au logiciel PyMOL plug-in version 0.99.

5.4 Etudes fonctionnelles cellulaires

5.4.1 Génération de vecteurs d'expression plasmidiques

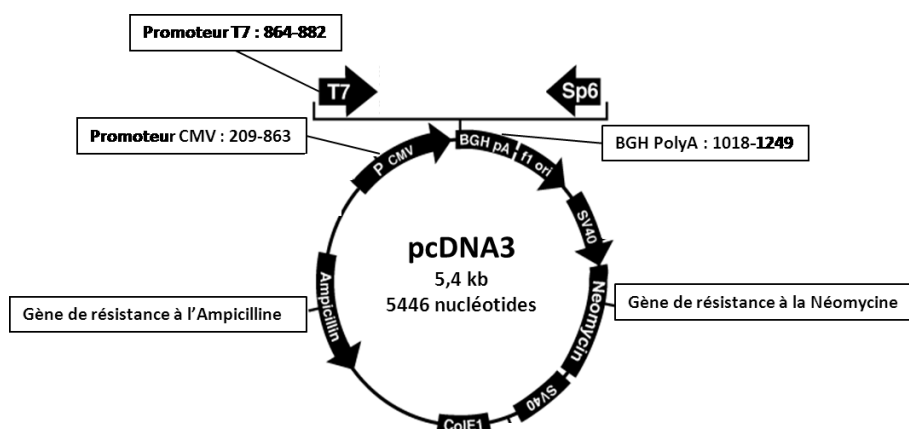
5.4.1.1 Clonage et mutagenèse

Les cDNA WT et mutants de *SFTPA1*, *SFTPA2* et *SFTPD* ont été obtenus à partir d'ARN humain universel par clonage.

Les cDNA ont été amplifiés par Taq Q5 High Fidelity Master Mix 2X (New England Biolabs) et un couple d'amorces spécifique de chaque cDNA. Après vérification de la présence d'une bande à la taille attendue, les cDNA ont été purifiés par Wizard SV Gel and PCR Clean-up system (Promega). Les cDNA ainsi obtenus ont été polyadénylés avant mutagenèse des vecteurs d'expression pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, CA) par Taq Q5 High Fidelity Master Mix 2X (New England Biolabs).

Les cDNA ont été insérés en aval du promoteur Cytomegalovirus (CMV) de plasmides pcDNA3 (**Figure 19**).

Figure 19 : Schéma du vecteur d'expression pcDNA3, d'après les données fabricant (Invitrogen, Carlsbad, CA)



Les plasmides pcDNA3 comprennent un gène de résistance à l'ampicilline et à la néomycine, un promoteur CMV, des promoteurs T7 et BGH.

5.4.1.2 Transformation bactérienne, mini et maxi-prep

La transformation bactérienne a été réalisée dans des bactéries *Escherichia Coli* $\alpha 5$ (New England Biolabs). Les colonies bactériennes choisies ont été placées en pré-culture dans un milieu contenant de l'ampicilline, puis des réactions de mini-prep (Plasmid DNA purification, NucleoBond – Macherey-Nagel, S1:740516.1, S2:740517.1, S3:740518.1) et Maxi-prep (EndoFree® Plasmid Purification Qiagen – 12362) ont été réalisées.

A chaque étape, les constructions plasmidiques ont été séquencées grâce à des amorces T7 et BGH, et de l'enzyme Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystem). Enfin, les dosages d'ADN ont été vérifiés au NanoDrop et dilués à 200 ng/ μ l.

Par le même procédé, des TAG HA et FLAG ont été ajoutés aux différents clones entre le peptide signal et la protéine SP-A1, SP-A2 ou SP-D. Un TAG HA de 27 nucléotides (TATCCATACGATGTTCCAGATTACGCT) a été utilisé pour les constructions *SFTPA1* et *SFTPD*. Un TAG FLAG de 24 nucléotides (GATTACAAGGATGACGACGATAAG) a été utilisé pour les constructions *SFTPA2*.

5.4.2 Transfection de cellules HEK293T humaines

Les constructions plasmidiques générées ont été transfectées de façon transitoire dans des cellules HEK293 humaines. Ces cellules, issues de cellules embryonnaires rénales, ne sécrètent pas de façon native de SP-A ni SP-D. Elles ont été cultivées dans un milieu DMEM (Thermo Fisher Scientific) contenant 10% de sérum de veau fœtal et des antibiotiques (pénicilline + streptomycine).

La transfection a été réalisée par méthode FuGENE (Promega) dans des plaques de 6 puits. Chaque puits contenait 600 000 cellules et un ratio de 6 μ l le FuGENE pour 1 μ g de plasmide. Ces conditions de transfections ont été choisies après avoir testé plusieurs conditions de transfection utilisant des plasmides transfectés avec un fluorochrome, la GFP (green fluorescent protein).

Après 24 h de culture cellulaire, les cellules ont été cultivées dans un milieu sans sérum pour éliminer les protéines SP-A et SP-D présentes dans le sérum de veau fœtal. Après 48 h, les cellules et le surnageant ont été récupérés (travail dans la glace, 4°C) pour analyse.

5.4.3 Western Blot (WB), et marquage anticorps (Ac)

Les cellules ont été lavées avec du PBS 1X puis centrifugées 10 min à 13 000 RPM. Elles ont ensuite été lysées puis traitées par une anti-protéase. Le surnageant a été centrifugé et filtré afin de ne conserver que les protéines de plus de 10 kDa. Les protéines ont été conservées à -20°C.

Des extraits protéiques de 15 µg de chaque échantillon ont été déposés sur gel à 12% d'acrylamide. La migration s'est faite à 150 V pendant 1 h 30 (avec marqueur de taille Biorad Kaleidoscope).

Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose préalablement activée dans du méthanol (Thermo Scientific Pierce G2 Fast Blotter). Après transfert, les membranes ont été bloquées dans du lait à 5%.

Les membranes ont été incubées 1 h avec les Ac suivants, en fonction des échantillons protéiques utilisés :

- Ac monoclonal anti-HA souris (Roche 3F10) couplé à la peroxydase, concentration 1/1000
- Ac monoclonal anti-FLAG souris (Sigma-Aldrich M2 A8592) couplé à la peroxydase, concentration 1/1000

L'alpha-tubuline a été utilisée comme contrôle de dépôt protéique des lysats cellulaires. Pour les produits de sécrétion, les gels et les membranes de nitrocellulose ont été colorés respectivement au bleu de Coomassie et dans une solution de Ponceau S.

Les Ac suivants ont été utilisés pour l'alpha-tubuline : Ac monoclonal anti alpha-tubuline (Santa Cruz SC-32293), concentration 1/500, et Ac secondaire anti-mouse peroxydase (Southern Biotech 1070-05), concentration 1/2000.

5.4.4 Immunofluorescence

Les études en immunofluorescence ont été réalisées sur des plaques de 24 puits avec lamelles (150 000 cellules par puits), selon le même protocole de transfection que précédemment.

Après aspiration du milieu de culture, les cellules ont été fixées au PFA puis perméabilisées à l'IGEPAL (Sigma-Aldrich CA 630) 0,25% avant blocage dans du lait à 5% et de l'Albumine de sérum bovin (BSA) à 3%.

Les Ac suivants ont été utilisés, chacun pendant 1 h d'incubation (Ac primaire / Ac secondaire) :

Ac de chèvre anti-SP-A, concentration 1/1000 / Anti chèvre vert (Alexa 488), concentration 1/2000

Ac de souris anti-Golgi, concentration 1/1000 / Anti souris rouge (Alexa 594), concentration 1/2000

Ac de souris anti-cathepsine D (lysosome), concentration 1/1000 / Anti souris rouge (Alexa 594), concentration 1/2000

Ac de lapin anti-BiP (RE), concentration 1/1000 / Anti lapin rouge (Alexa 594), concentration 1/2000.

Le marquage nucléaire a été réalisé au DAPI 1X (4',6-diamidino-2-phenylindole).

5.4.5 Etude du stress du RE

Plusieurs gènes impliqués dans le stress du RE ont été étudiés par PCR quantitative (qPCR). Le kit MESA BLUE MasterMix Plus (Eurogentec) a été utilisé. Le même protocole de transfection cellulaire que précédemment a été utilisé. Les lysats cellulaires ont été traités au β -mercaptoéthanol puis congelés à -80°C . Les ARN ont ensuite été purifiés puis transformés en cDNA par RT-PCR.

Les expressions des gènes suivants ont été étudiées par mesure du nombre d'amplicons de leur cDNA : *XBP-1* total, *XBP-1*(é), *BiP*, *DDIT3* (*DNA* Damage Inducible Transcript), *ATF3*, ainsi qu'un gène « de ménage » *RPL*. La thapsigargine et la tunicamycine ont été utilisées pour induire un stress du RE. La production de la protéine BiP a aussi été étudiée par WB.

5.5 Analyses tissulaires

Les études tissulaires ont été réalisées dans le service d'Anatomopathologie de l'hôpital Trousseau (Dr Linda Dainese, Pr Aurore Coulomb l'Hermine).

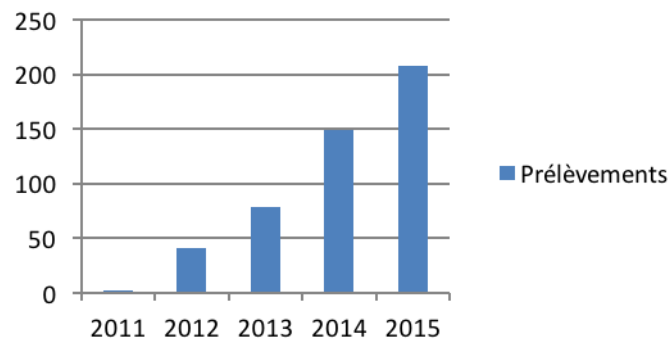
Des échantillons pulmonaires issus de biopsie pulmonaire d'un patient présentant une PID et de témoins appariés sur l'âge (un témoin sain et un témoin présentant une mutation de *SFTPC*) ont été analysés par microscopie à fort grossissement (x 400). Une coloration à l'HES a été réalisée et l'expression de la protéine SP-A a été étudiée par un marquage par un Ac anti-SP-A monoclonal à une concentration de 1/200 (Abcam 32E12). Cette expression a été comparée à celle de la protéine SP-C (Ac polyclonal anti-SP-C (Santa Cruz-13979, concentration 1/100)).

6. Résultats

6.1 Caractéristiques de la cohorte de patients

La cohorte d'étude constituée pour ce travail a été de 345 cas index (436 prélèvements). Le graphique des inclusions est présenté ci-dessous (**Figure 20**).

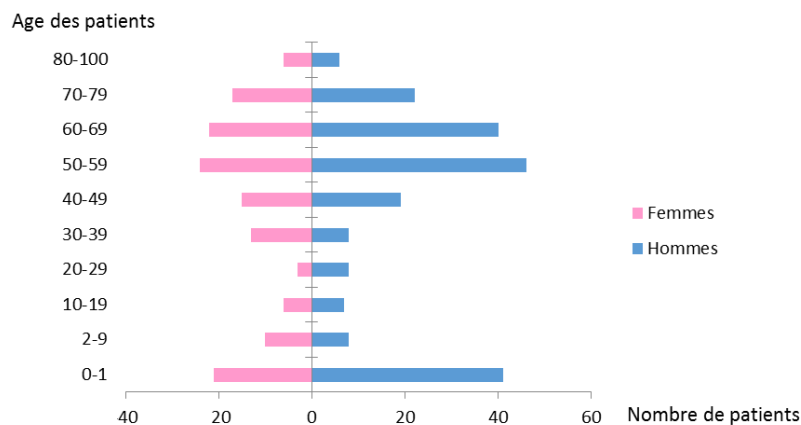
Figure 20 : Schéma des inclusions



Histogramme représentant le nombre de prélèvements reçus par année depuis le début de l'étude

Les données phénotypiques des 345 cas index, issus de 345 familles indépendantes ont été recueillies. L'âge moyen au moment de l'étude était de 42 ans, avec des extrêmes allant de 0 à 91 ans (**Figure 21**). Les enfants représentaient 101 patients (29%).

Figure 21 : Pyramide des âges des patients inclus



Deux pics d'âge à l'inclusion des patients sont individualisés : l'un dans les 2 premières années de vie, et l'autre entre 50 et 70 ans

Les hommes représentaient 61% des individus inclus, et le sexe ratio était comparable chez les enfants et les adultes (1,4 homme / femme) (**Table 3**). Trente patients étaient issus d'une union consanguine parmi les 200 patients pour lesquels cette donnée était renseignée, soit 15% des patients. L'histoire familiale de PID et/ou de cancer a pu être documentée pour 183 patients. Pour 152 des 244 patients adultes, les données concernant une exposition environnementale étaient disponibles. La majorité concernait le tabac, et on retrouvait une exposition à l'amiante pour 10 patients, et une autre exposition (autres métaux, poussières de bois, travail dans l'industrie automobile, la boulangerie, l'agriculture, l'imprimerie) pour 25 patients.

Table 3 : Caractéristiques épidémiologiques et phénotypiques des 345 cas index

	Total n (%)	Enfants n (%)	Adultes n (%)
Patients	345 (100)	101 (29)	244 (71)
Hommes	211 (61)	60 (59)	142 (58)
Femmes	134 (39)	41 (41)	102 (42)
Origine géographique			
Europe	64 (18,5)		
Afrique du Nord	44 (12,7)		
Afrique Sub-Saharienne	13 (3,8)		
Inde et Caraïbes	12 (3,4)		
Antilles	5 (1,4)		
Asie	5 (1,4)		
Amérique du Sud	1 (0,3)		
Non renseignée	201 (58,2)		
Forme familiale	87 (25)		
Antécédent personnel ou familial de cancer pulmonaire	24 (6,9)		
Exposition environnementale	115 (33,3)		115 (47,1)
Tabac	80 (23,2)		80 (32,8)
Autre	35 (10,1)		35 (14,3)

Des manifestations extra-pulmonaires étaient retrouvées pour 191 patients (55%). Elles sont résumées dans la **Table 4**. L'atteinte articulaire était la plus fréquente (90 patients (47,1%), dont une majorité de polyarthrites rhumatoïdes (81 patients (42,4%)).

Table 4 : Manifestations extra-pulmonaires associées à la PID des 345 patients index

Signes extra-pulmonaire	Cas index		
	(n)	(% des 191 patients présentant une manifestation extra-pulmonaire)	(% de l'ensemble des 345 cas index inclus)
Rhumatologiques (dont PR)	90	47,1	26,1
Digestifs (RGO, cirrhose, cholestase)	30	15,7	8,7
Hématologiques	11	5,7	3,1
Cardiovasculaires	9	4,7	2,6
Thyroïdiens	5	2,6	1,4
Rénaux	3	1,5	0,8
Carcinologiques	3	1,5	0,8
Autre	40	20,9	11,5
Total des manifestations auto-immunes (PR (n=81), dysthyroïdie (n=5), autres (n=14))	100	52,3	28,9
TOTAL	191	100	55

PR : polyarthrite rhumatoïde, RGO : reflux gastro-oesophagien

6.2 Etude de SP-A1

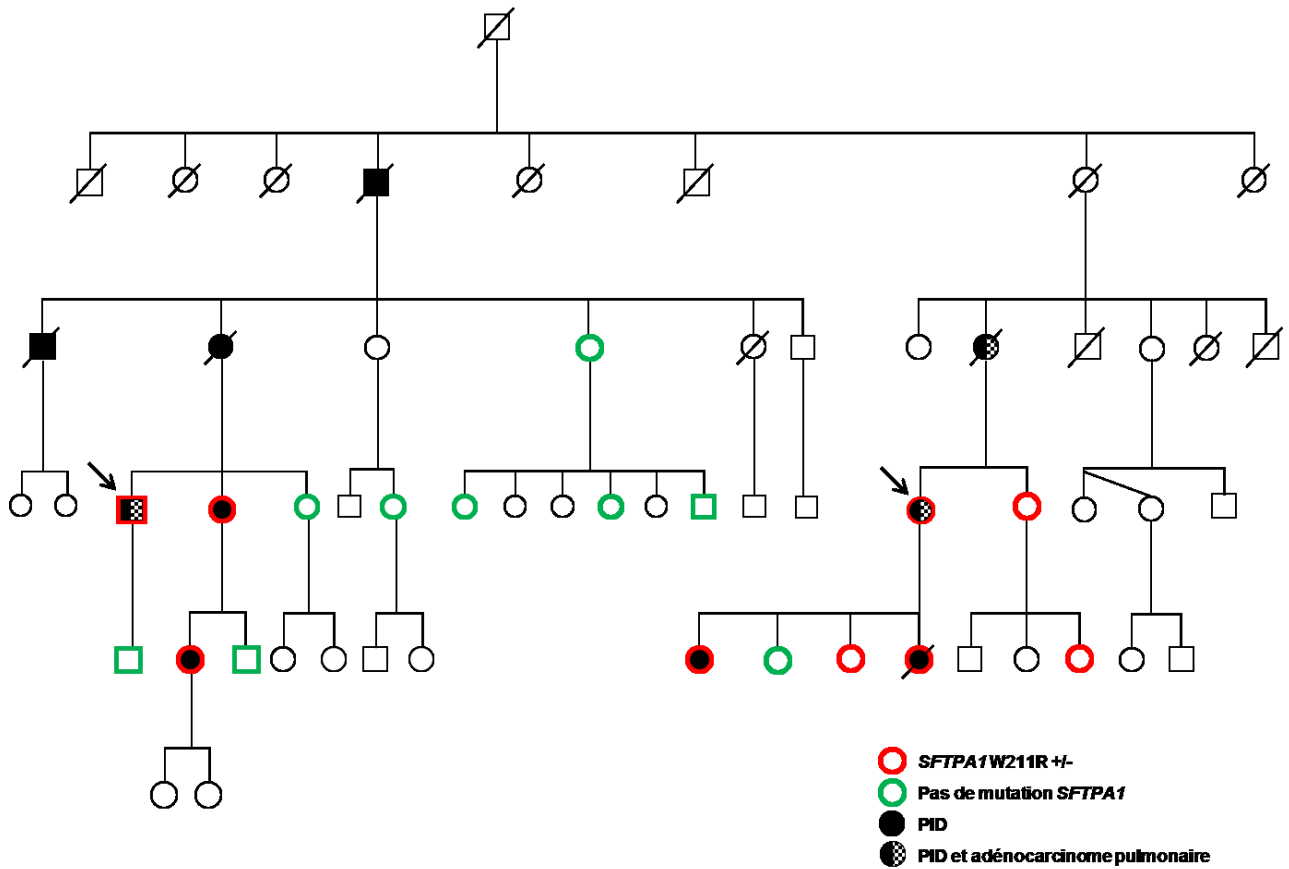
6.2.1 Etude génétique et protéique

Au cours de ce travail, le gène *SFTPA1* a été impliqué pour la première fois dans les PID par notre équipe. Ce résultat très nouveau a fait l'objet d'une publication récente fournie ci-après :

« **Nathan N**, Giraud V, Picard C, Nunes H, Dastot-Le Moal F, Copin B, Galeron L, de Ligniville A, Kuziner N, Reynaud-Gaubert M, Valeyre D, Couderc LJ, Chinet T, Borie R, Crestani B, Simansour M, Nau V, Tissier S, Duquesnoy P, Mansour-Hendili L, Legendre M, Kannengiesser C, Coulomb L'Hermine A, Gouya L, Amselem S, Clement A. Germline *SFTPA1* mutation in familial idiopathic interstitial pneumonia and lung cancer. **Hum Mol Genet. 2016 Apr 15;25(8):1457-67**» (110).

La mutation c.631T>C (W211R) (p.Trp211Arg) (NM_005411) a pu être mise en évidence chez 9 individus d'une même famille, âgés de 7 mois à 57 ans (**Figure 22**). La mutation W211R ségrégeait selon un mode de transmission dominant avec un phénotype associant des PID, des FPI, et/ou des adénocarcinomes pulmonaires.

Figure 22 : Arbre généalogique de la famille dans laquelle une mutation de *SFTP1* a été mise en évidence



La flèche indique un cas index. Les patients présentant une PID sont schématisés par un symbole noir plein. Les symboles moitié-noirs et moitié-damiers correspondent à des patients présentant l'association d'une PID et d'un cancer pulmonaire. Les individus porteurs de la mutation W211R sont cerclés de rouge, et ceux qui ne la portent pas sont cerclés de vert.

La publication jointe ci-après résume les résultats de génotypage, les analyses *in silico*, les études fonctionnelles de production et sécrétion protéique, et les études en immunohistochimie sur biopsie pulmonaires réalisées pour le variant W211R de *SFTP1*.

ORIGINAL ARTICLE

Germline *SFTPA1* mutation in familial idiopathic interstitial pneumonia and lung cancer

Nadia Nathan^{1,2}, Violaine Giraud³, Clément Picard⁴, Hilario Nunes⁵, Florence Dastot-Le Moal⁶, Bruno Copin⁶, Laurie Galeron², Alice De Ligniville², Nathalie Kuziner², Martine Reynaud-Gaubert⁷, Dominique Valeyre⁵, Louis-Jean Couderc⁴, Thierry Chinet³, Raphaël Borie⁸, Bruno Crestani⁸, Maud Simansour¹, Valérie Nau⁶, Sylvie Tissier⁶, Philippe Duquesnoy¹, Lamisse Mansour-Hendili⁶, Marie Legendre^{1,6}, Caroline Kannengiesser⁹, Aurore Coulomb-L'Herminie¹⁰, Laurent Gouya¹¹, Serge Amselem^{1,6,†,*} and Annick Clement^{1,2,†}

¹INSERM UMRS933, Université Pierre et Marie Curie (Paris 6), Sorbonne Universités, Paris 75012, France, ²Service de Pneumologie Pédiatrique, Hôpital Armand Trousseau, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Centre National de Référence des Maladies Respiratoires Rares RespiRare, Paris 75012, France, ³Service de Pneumologie et Oncologie Thoracique, Hôpital Ambroise Paré, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Boulogne 92110, France, ⁴Service de Pneumologie, Hôpital Foch, Suresnes 92150, France, ⁵Service de Pneumologie, Hôpital Avicenne, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Université Paris 13, COMUE Sorbonne Paris Cité, EA 2363, Bobigny 93000, France, ⁶Service de Génétique et d'Embryologie Médicales, Hôpital Armand Trousseau, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris 75012, France, ⁷Service de Pneumologie et Transplantation Pulmonaire, CHU Nord Faculté de Médecine, URMITE—CNRS-UMR 6236, Aix Marseille Université, Marseille 13000, France, ⁸Service de Pneumologie A, Hôpital Bichat, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Centre de Compétence des Maladies Pulmonaires Rares, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, DHU FIRE, Paris 75018, France, ⁹Service de Génétique, Hôpital Bichat, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris 75018, France, ¹⁰Service de Cytologie et Pathologie, Hôpital Armand Trousseau, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Université Pierre et Marie Curie, Sorbonne Universités, Paris 75012, France and ¹¹Centre Français des Porphyries, Hôpital Louis Mourier, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, INSERM U1149, CNRS ERL 8252, Centre de Recherche sur L'inflammation, Laboratoire d'excellence, GR-Ex, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Colombes 92700, France

*To whom correspondence should be addressed at: Service de Génétique et Embryologie Médicales, Hôpital Armand Trousseau, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris 75012, France. Tel: +33 144735295; Fax: +33 144735219; Email: serge.amselem@inserm.fr

†These authors contributed equally to the work.

Received: November 17, 2015. Revised and Accepted: January 14, 2016

© The Author 2016. Published by Oxford University Press. All rights reserved. For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com

Abstract

Idiopathic interstitial pneumonias (IIPs) comprise a heterogeneous group of rare lung parenchyma disorders with high morbidity and mortality, which can occur at all ages. In adults, the most common form of IIPs, idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), has been associated with an increased frequency of lung cancer. The molecular basis of IIPs remains unknown in most cases. This study investigates IIP pathophysiology in 12 families affected by IPF and lung cancer. We identified, in a multigenerational family, nine members carrying a heterozygous missense mutation with evidence of pathogenicity in *SFTPA1* that encodes the surfactant protein (SP)-A1. The mutation (p.Trp211Arg), which segregates with a disease phenotype characterized by either isolated IIP/IPF, or IPF associated with lung adenocarcinoma, is located in the carbohydrate recognition domain (CRD) of SP-A1 and involves a residue invariant throughout evolution, not only in SP-A1, but also in its close paralog SP-A2 and other CRD-containing proteins. As shown through functional studies, the p.Trp211Arg mutation impairs SP-A1 secretion. Immunohistochemistry studies on patient alveolar epithelium showed an altered SP-A expression pattern. Overall, this first report of a germline molecular defect in *SFTPA1* unveils the key role of SP-A1 in the occurrence of several chronic respiratory diseases, ranging from severe respiratory insufficiency occurring early in life to the association of lung fibrosis and cancer in adult patients. These data also clearly show that, in spite of their structural and functional similarities, SP-A1 and SP-A2 are not redundant.

Introduction

Idiopathic interstitial pneumonias (IIPs) (MIM263000) comprise a heterogeneous group of rare disorders that affect the distal part of the lung and are characterized by a progressive remodeling of the alveolar interstitium. IIPs are diseases that can be observed at all ages, although they are more frequently diagnosed in adults (1,2). The most common and severe form of IIPs is idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) (MIM178500), a condition mainly observed in older adults with a median survival of 3–5 years after diagnosis (3–5). Noteworthy, compared with control populations, IPF has been shown to be associated with an increased risk of developing lung cancer (with reported prevalences ranging from 3 to 23%) (6).

The pathogenesis of IIP remains puzzling. The current understanding suggests a multiple hit model, with ongoing or repetitive insults of a vulnerable alveolar epithelium resulting in aberrant lung repair and progressive fibrosis (7–9). Observations of familial clustering of the disease have provided arguments for a genetic component to alveolar susceptibility and to the risk of IIP (10–13). To date, genetic factors involved in the development of IIP include genes encoding molecules of the telomerase complex (such as *TERT*, *TERC*, *RTEL1*, *DKC1*, *TINF2* and *PARN*) in adult IIP (14–20), and genes encoding proteins that play a critical role in surfactant metabolism (*SFTPB*, *SFTPC* and *ABCA3*), mainly in pediatric cases (21,22). So far, little attention has been paid to the other surfactant proteins (SPs), despite their broad role in lung homeostasis. The most abundant SP is SP-A, which is structurally homologous to the collectins, a family of innate immune response components. It has indeed important roles, not only in surfactant production through its involvement in tubular myelin formation (23), but also in pulmonary host defense and in the repair processes of the lung parenchyma (24–27). In humans, SP-A is encoded by *SFTPA1* (NM_005411) and *SFTPA2* (NM_001098668). These two genes, located in chromosomal region 10q22 and composed of six exons (4 coding), are separated by a pseudogene (*SFTPA3P*). They encode two very similar 35–37 kDa proteins (SP-A1 and SP-A2) that share a highly conserved carbohydrate recognition domain (CRD). SP-A1 and SP-A2 are secreted in the alveolar space and assembled as a flower-like bouquet structure of six heterotrimeric (28–30). In two families in which lung cancer and IPF were shown to co-segregate in an autosomal dominant manner, two heterozygous mutations have been identified in *SFTPA2* (F198S and G231V) (31). More recently, four new *SFTPA2* mutations have been reported in adult cases of IPF and lung

cancer (32,33). The potential implication of *SFTPA1* in IIP and lung cancer is, however, so far unknown. To further investigate the implication of SP-A in the pathogenesis of IIP, we sequenced *SFTPA1* and *SFTPA2* in a cohort of patients with familial forms of IIP and a personal and/or family history of lung cancer.

Results

Identification of a germline mutation in *SFTPA1*

Twelve patients met the patients' selection criteria (Supplementary Material, Fig. S1). The study group of 12 patients belonged to 12 apparently unrelated families (Table 1, and Supplementary Material, Fig. S2). Patients were aged 30–78 years at the time of IIP diagnosis (median age: 57 years). The medical records documented the presence of a lung cancer in seven of them (four were smokers), and a first-degree family history of lung cancer in six patients. No *SFTPA2* mutations were identified in all these patients. In two patients (Patients 1 and 4, Table 1), who presented with IPF and lung adenocarcinoma, the screening of *SFTPA1* revealed two sequence variations in the heterozygous state. The first one is a C-to-T transition located within exon 6 (c.655C>T; rs4253527; NM_005411.4) and predicting an amino-acid substitution at codon 219 (p.Arg219Trp). This missense variation, which involves a residue that is not conserved throughout evolution and is predicted as a benign variation by the PolyPhen2 software, is reported in polymorphism databases with an allele frequency of 2–25% (Exome Variant Server, dbSNP, Ensembl, 1000 Genomes, ExAC), thereby arguing against its involvement in disease development. The other sequence variation is a T-to-C transition (c.631T>C; p.Trp211Arg; W211R) (Fig. 1A), also located in exon 6, which is predicted as probably damaging by PolyPhen-2. It has not been described in polymorphism databases (1000 Genomes, Ensembl, dbSNP, Exome Variant Server, ExAC). It predicts the replacement at codon 211 of an apolar residue (tryptophane) by a polar and charged amino acid (arginine). At the protein level (Fig. 1B), this missense variation (p.Trp211Arg; W211R) is located in the CRD of SP-A1 and involves a residue that is invariant throughout evolution not only in SP-A1 and SP-A2, but also in proteins with a SP-A-like or a lectin domain containing a CRD. Such a high degree of conservation of tryptophan 211, therefore, strongly suggests that amino-acid substitutions at this position could be detrimental to protein function.

Table 1. Characteristics of the study group patients

Patient	Family	Gender	Age at IIP diagnosis (years)	Personal history of lung cancer, no/yes (type of cancer)	First-degree family history of lung cancer, no/yes	Exposure, No/Yes (type)	SFTPA1 c.631T>C mutation (W211R)	SFTPA1 c.655C>T variant (R219W)
1	1	M	45	Yes (adenocarcinoma)	No	Yes (tobacco, barge worker)	Yes	Yes
2	2	M	70	Yes (epidermoid carcinoma)	NA	Yes (tobacco, wood dust)	No	No
3	3	M	40	Yes (epidermoid carcinoma)	No	Yes (tobacco)	No	No
4	4	F	52	Yes (adenocarcinoma)	Yes	No	Yes	Yes
5	5	F	43	Yes (adenocarcinoma)	No	NA	No	No
6	6	M	78	Yes (epidermoid carcinoma)	No	Yes (tobacco, metal dust)	No	No
7	7	M	68	Yes (NA)	No	No	No	No
8	8	F	72	No	Yes	No	No	No
9	9	M	65	No	Yes	Yes (tobacco)	No	No
10	10	M	30	No	Yes	Yes (tobacco)	No	No
11	11	M	50	No	Yes	Yes (tobacco)	No	No
12	12	F	62	No	Yes	Yes (tobacco, firewood)	No	No

IIP, Idiopathic interstitial pneumonia; NA, not available.

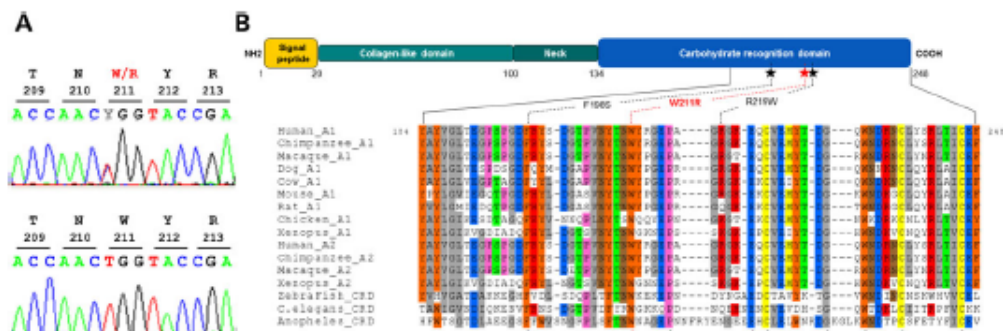


Figure 1. Identification of a SFTPA1 mutation c.631T>C (W211R) in the CRD of SP-A1 and conservation of the involved residue throughout evolution. (A) SFTPA1 electropherograms corresponding to the direct Sanger sequencing of the PCR products for affected individual IV.3 from family 1 (upper panel) and a control (lower panel). The T-to-C transition at position 631 of the SFTPA1 sequence predicts a heterozygous missense variation replacing a tryptophan by an arginine residue at codon 211 (W211R). (B) (top) Domain organization model of SP-A1 showing the location of the studied SFTPA1 variants in the CRD. The W211R mutation is shown by a red asterisk. The R219W variation, as well as the F198S mutation previously identified in SP-A2 (31) are also represented (bottom). Partial protein sequence alignment of the CRD from SP-A (A1 or A2) or from proteins with a C-type lectin domain containing a CRD in different species. Invariant residues are shown by an asterisk. Tryptophan at position 211 in humans (red asterisk) is one of those invariant residues. IIP, Idiopathic interstitial pneumonia.

Intrafamilial segregation of the SP-A1 W211R variation

In order to study the intrafamilial segregation of the SFTPA1 W211R missense variation with the patients' phenotype, the pedigrees of the two probands were then constructed (i.e. Patients 1 and 4 in Table 1, corresponding to individuals IV.3 and IV.16, respectively, in Fig. 2). Unexpectedly, additional information from the two family records and their history revealed similar geographic origins and professional orientations (mainly barge workers), and allowed us to assemble their members into a unique family (hereafter named family 1/4) with a common forefather (individual I.1). The genotyping of 13 intragenic non-coding single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the family showed that the individuals carrying the W211R variation share the same SFTPA1 haplotype (hereafter named H1), confirming

the unicity of family 1/4 (Fig. 2 and Supplementary Material, Table S1). Phenotypic characteristics of the family 1/4 members that could be investigated are summarized in Table 2. In addition to Patients IV.3 and IV.16, eight individuals (II.4, III.1, III.2, III.8, IV.4, V.2, V.8 and V.11) had a diagnosis of IIP. These patients were aged 7 months to 69 years at onset of symptoms. Analysis of SFTPA1 and SFTPA2, that could be performed in four of them (IV.4, V.2, V.8 and V.11), showed the absence of SFTPA2 mutations, but the presence, in all of them, of the SFTPA1 W211R missense variation in the heterozygous state.

The disease phenotypes of the six patients carrying the SP-A1 W211R variation are listed in Table 2. The W211R missense variation was first identified in a 53-year-old male patient (IV.3), who was a former smoker and worked as bargeman. He was

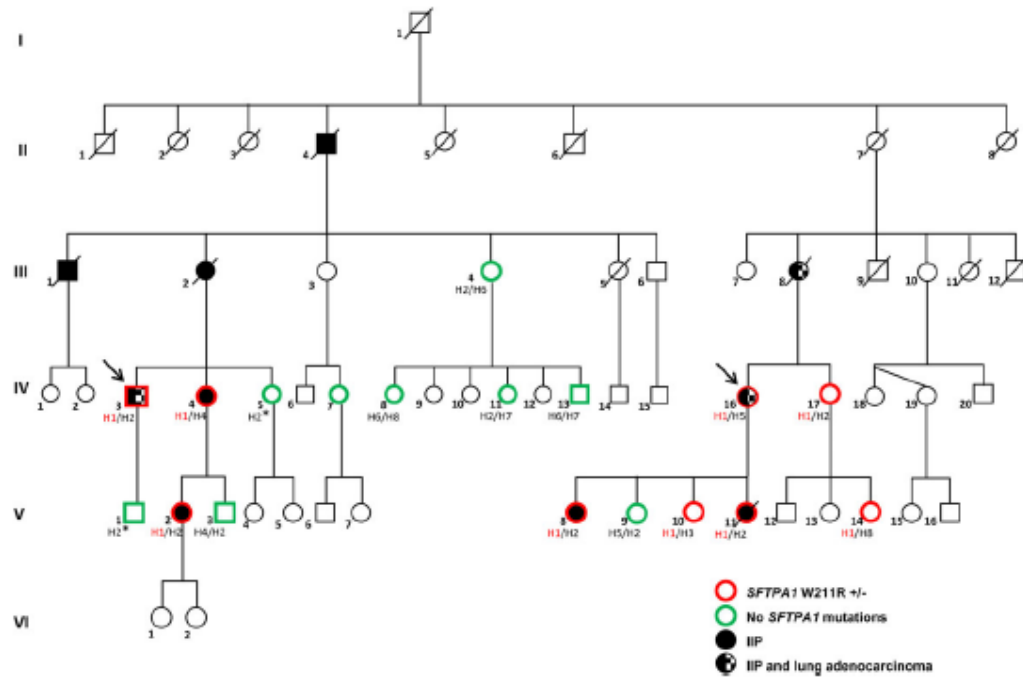


Figure 2. Pedigree of the family with the identified *SFTPA1* mutation c.631T>C (W211R). The arrows indicate the two index cases (individuals 1 and 4, see Table 3). Individuals with IP are indicated by a black symbol. Symbols that are half black and half checkerboard indicate individuals with IP and lung cancer. A red outline indicates the presence of the SP-A1 W211R mutation in the heterozygous state, and a green outline indicates a wild-type sequence at codon 211. Each individual is identified by his generation (Roman numbers) and its number (Arabic number). *SFTPA1* haplotypes are mentioned (see Supplementary Material, Table S1), the H1 haplotype (in red) corresponding to the allele that carries the W211R mutation. The asterisk (*) indicates that the haplotype-analysis led to the identification of a H2 haplotype in the homozygous (or hemizygous) state.

diagnosed at age 45 with IPF complicated at age 50 by lung adenocarcinoma (Fig. 3, IV.3 A and B). The second proband (IV.16) is a 58-year-old non-smoker woman, diagnosed with IPF at age 52 and with lung adenocarcinoma at age 54 (Fig. 3, IV.16 A and B). Individual IV.4, who was a tobacco-smoker barge worker, was diagnosed at the age of 40 with IPF. She experienced worsening of her IPF with no evidence of lung cancer during 18 years of follow-up (Fig. 3, IV.4 A and B). For Patients V.2 and V.8, the diagnostic of IPF was established when they were in their early thirties. The youngest patient (V.11), who was the daughter of Patient IV.16, presented at the age of 7 months with a severe respiratory insufficiency. An infection was first suspected, but was not confirmed by microbiologic investigations. Her respiratory condition progressively deteriorated and she died 2 months later. A recent pathological review of her lung biopsy performed when she was 8 months was in favor of pre-existing fibrosing IP (Fig. 4). Genetic studies could then be undertaken from a stored frozen white blood cell sample and revealed the presence of the SP-A1 W211R missense variation.

After informed consent and medical evaluation, genetic testing could be performed in 12 other family members (Fig. 2). Eleven of them were free of respiratory symptoms at the time of the study and no abnormalities could be observed on their chest high-resolution computed tomography (HRCT) scans (III.4, IV.5, IV.7, IV.8, IV.11, IV.13, IV.17, V.1, V.3, V.9, V.10). One member (IV.14), a 14-year-old girl, had a mental retardation and

frequent bronchitis. Review of her clinical and radiological record was in favor of respiratory complications of her neurological condition associated with aspiration and lung infection. The SP-A1 W211R missense variation was identified in three of them (IV.17, V.10 and V.14). The family study also revealed the presence, in the heterozygous state, of the *SFTPA1* polymorphism c.655C>T (R219W) in all the individuals carrying the SP-A1 W211R variation (Fig. 2). As shown by the haplotype analysis (Fig. 2 and Supplementary Material, Table S1), the R219W polymorphism and the W211R missense variation are located on the same *SFTPA1* allele (haplotype H1). Noteworthy, individual IV.8, who did not carry the W211R mutation, carried the R219W polymorphism in the heterozygous state. However, as shown by haplotype analysis, the R219W polymorphism was carried by a different *SFTPA1* haplotype in this individual (haplotype H8) (Fig. 2, Supplementary Material, Table S1). Similarly, individual V.14, who carried the W211R mutation in the heterozygous state, was found to be homozygous for the R219W polymorphism (Fig. 2). In fact, in this latter case, one *SFTPA1* allele carried the R219W polymorphism together with the W211R mutation on a H1 haplotype, and the other *SFTPA1* allele carried the R219W polymorphism on a different haplotype (H8). Given the allele frequency of the R219W variation in polymorphism databases (up to 25% in ExAC), such finding is not surprising. Taken together, these intrafamilial segregation data strongly support the involvement of the W211R variation in a disease expression that is not

Table 2. Phenotypic features of the members of family 1/4 in whom the SP-A1 W211R mutation was identified

Family member	Gender	IP no/yes (age at diagnosis, years)	Age at the time of the study (years)	Personal history of cancer, no/yes (age at cancer diagnosis, type of cancer)	Exposure and comorbidity, no/yes (type)	SFTPA1 c.631T>C mutation (W211R)	SFTPA1 c.655C>T variant (R219W)
II.4	M	Yes	*	No	Yes (barge worker)	NA	NA
III.1	M	Yes	*	No	NA	NA	NA
III.2	F	Yes (50)	*	No	Yes (barge worker)	NA	NA
III.4	F	No (84)	85	No	Yes (barge worker, tobacco)	No	No
III.8	F	Yes (69)	*	Yes (69, adenocarcinoma)	Yes (barge worker, tobacco)	NA	NA
IV.3	M	Yes (45)	53	Yes (50, adenocarcinoma)	Yes (barge worker, tobacco)	Yes	Yes
IV.4	F	Yes (40)	57	No	Yes (barge worker)	Yes	Yes
IV.5	F	No	57	No	No	No	No
IV.7	F	No	56	No	No	No	No
IV.8	F	No	61	No	Yes (barge worker)	No	Yes
IV.11	F	No	57	No	No	No	No
IV.13	M	No	51	No	Yes (barge worker, tobacco)	No	No
IV.16	F	Yes (52)	58	Yes (54, adenocarcinoma)	No	Yes	Yes
IV.17	F	No	49	No	Yes (tobacco)	Yes	Yes
V.1	M	No	23	No	Yes (tobacco)	No	No
V.2	F	Yes (33)	36	No	No	Yes	Yes
V.3	M	No	35	No	NA	No	No
V.8	F	Yes (31)	31	No	Yes (tobacco)	Yes	Yes
V.10	F	No	27	No	No	Yes	Yes
V.9	F	No	29	No	No	No	No
V.11	F	Yes (0.6)	*	No	No	Yes	Yes
V.14	F	No	14	No	No	Yes	Yes

IP, idiopathic interstitial pneumonia; NA, not available.
*Deceased patient.

fully penetrant, while excluding the implication of the R219W variation.

Modeling of structural and electrostatic changes induced by the SP-A1 W211R mutation

With the aim of assessing the effect of the W211R missense variation on SP-A1 conformation, we generated wild-type and mutated SP-A1 3D structures using the rat SP-A1 crystal structure (residues 201–248) as template. When compared with wild-type SP-A1 CRD domain, prediction of the 3D structure of the protein carrying the W211R missense variation disclosed no major conformational changes in the vicinity of the mutated residue, with moderate consequences on the overall domain structure (similar root mean square deviation (RMSD) values of wild-type (WT) and mutated SP-A1 domains: 0.8 using SuperPose Version 1.0) (Fig. 5A) (34). However, electrostatic modeling of the protein domain surface showed a strong polarity change in the region surrounding residue 211, when compared with the corresponding wild-type SP-A1 domain (Fig. 5B), a result in keeping with the location of the lateral chain of residue 211 at the surface of this domain.

Impact of the SP-A1 W211R mutation on protein production and secretion

To further evaluate the functional consequences of the W211R substitution at the protein level, we compared the expression of wild-type SP-A1 (SP-A1_WT) and SP-A1 carrying the W211R variation (SP-A1_W211R) both in cellular lysates and in the medium of HEK293T cells transfected with the wild-type or mutated

expression plasmid. Similar experiments were performed with SP-A1 proteins carrying the R219W variation (SP-A1_R219W) or the F198S mutation previously identified in SFTPA2.

As shown in Figure 6A, the SFTPA1 variants had no effects on protein expression. To determine whether the W211R missense variation identified in SP-A1 could impair protein secretion, similar experiments were performed on the medium of cells transfected with an expression plasmid encoding SFTPA1_W211R and the results were compared with those obtained on the medium of cells transfected with the other SFTPA1 expression plasmids. A single molecular species of expected molecular weight (35–37 kDa) was found in the secreted material from WT SP-A1-expressing cells. This molecular species was also present in the medium of cells expressing the R219W variant. In contrast, no SP-A1 protein could be detected in the medium of cells transfected with the SFTPA1 expression plasmids carrying the W211R or the F198S missense variation (Fig. 6C). Taken together, these data show that the W211R missense variation identified in family 1/4 is a deleterious mutation resulting in the absence of SP-A1 secretion. The key importance of residue 211 for a proper release of SP-A1 is also supported by the fact that similar data were obtained with a mutant form of SP-A2 carrying the W211R mutation (Fig. 6B and D).

Surfactant protein A expression pattern in the lung tissue of a patient carrying the SP-A1 W211R mutation

To provide further support to an altered parenchymal expression of SP-A1 in patients with the SP-A1 W211R mutation, tissue samples from the lung biopsy of Patient V.11 were studied by means

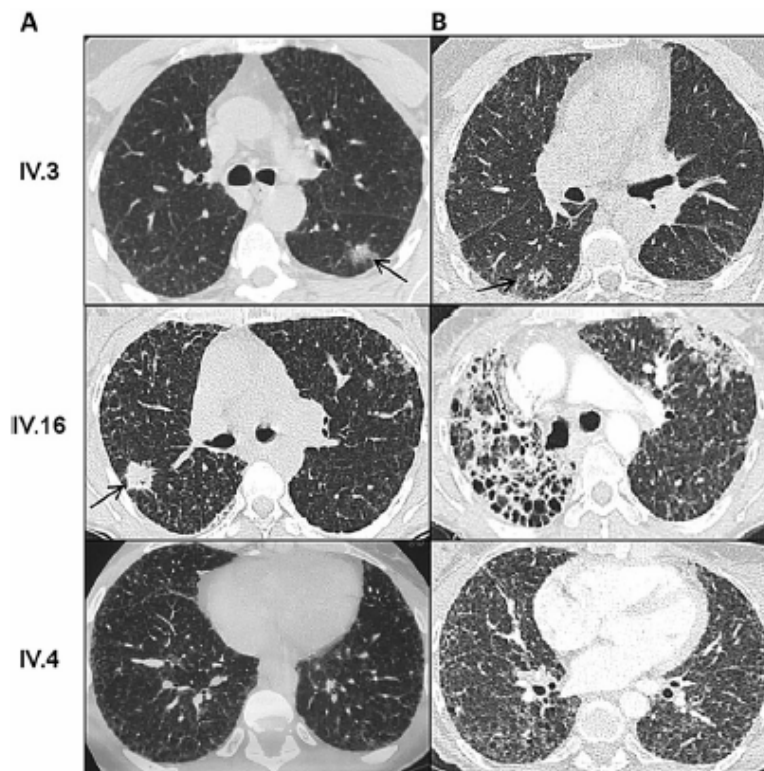


Figure 3. Representative thoracic HRCT scans of affected individuals carrying the SP-A1 W211R mutation. Thoracic HRCT scans of Patient IV.3, IV.16, IV.4 at diagnosis (A), and during follow-up (B). Individual IV.3 presented at age 50 with a severe fibrosis in interstitial lung disease and a left lung adenocarcinoma that was surgically removed (-) (IV.3, A). After 4 years, the patient experienced a worsening of his clinical condition that was associated on the chest HRCT scan with an extension of the lung fibrosis and an adenocarcinoma relapse located on the right lung (-) (IV.3, B). Individual IV.16's HRCT scan at age 54 (IV.16, A) showed a severe interstitial lung disease with subpleural fibrosis, and a right adenocarcinoma (-) that was surgically removed. After 4 years of follow-up, the chest imaging revealed a progression of the disease with an extensive and asymmetric fibrosis (IV.16, B). Individual IV.4 had a first HRCT scan at age 40, showing a mild interstitial lung disease (IV.4, A). After 18 years of follow-up, her pre-transplantation HRCT scan showed a severe diffuse fibrosis without evidence of adenocarcinoma (IV.4, B).

of hematoxylin and eosin (HE) staining and immunohistochemistry analyses using a mouse anti-SP-A monoclonal antibody (Fig. 4, A and B). For comparison, similar studies were performed on lung samples from two age-matched controls, one without respiratory disease (Fig. 4, D and E) and one with a SFTPC mutation associated lung disease (Fig. 4, G and H). The lung parenchyma from Patient V.11 displayed a severe diffuse interstitial fibrosis with collapse of most alveolar spaces. This was associated with a discontinuous and mostly intra-cytoplasmic SP-A staining of the hyperplastic pneumocytes. This expression contrasted with the continuous linear layer of SP-A at the alveolar surface of the two control specimens, which has been previously reported and documented as a labeling of the intra-alveolar surfactant material (35). To document whether the expression of other SP proteins could also be impaired, we performed immunohistochemistry analysis using an anti-SP-C antibody. The results showed that similar patterns of alveolar SP-C expression were found in the lung tissues from Patient V.11 and from the control individual without respiratory disease (Fig. 4, C and F). These findings contrasted with the altered pattern of SP-C expression in the tissue from the individual with a SP-C disorder (Fig. 4, I).

Discussion

In this study, we identified SFTPA1 as a novel gene involved in the development of IIP. Focusing on IIP patients with a personal and/or a family history of lung cancer, we identified a large family with several members heterozygous for the SFTPA1 c.631T>C (W211R) mutation.

A striking observation is the large variability in patient age at the time of diagnosis, ranging from infancy to elderly. This is well illustrated by the medical history of individual V.11 who developed early in life a severe respiratory disease with a dramatic and fatal outcome. In contrast, the diagnosis of IPF was established in her mother (IV.16) at the age of 52, thereby suggesting that altered SP-A1 expression could impact on lung parenchyma homeostasis from the early postnatal period to the elderly. We also found this mutation in asymptomatic family individuals at the time of the study, in keeping with an incomplete penetrance. Such phenotypic heterogeneity may be explained by the number of molecular processes involved in IIP pathophysiology. It is currently believed that IIP is the result of complex interactions between genetic and environmental factors, with exposures to

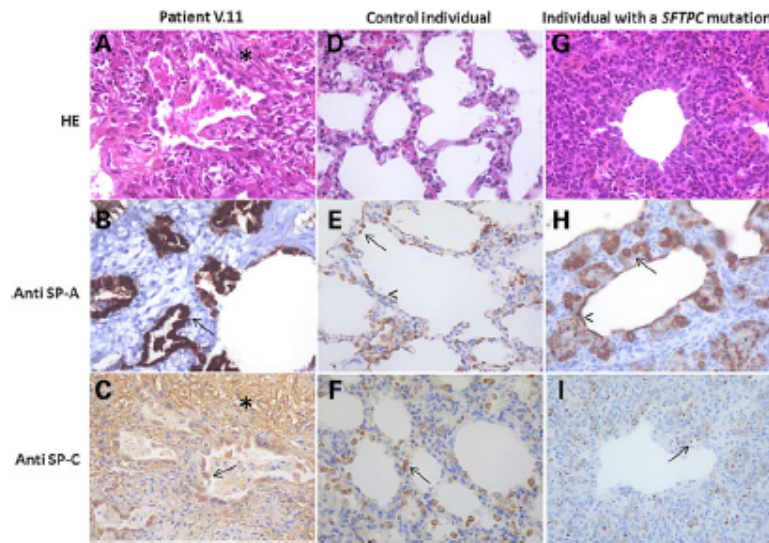


Figure 4. SP-A expression on lung tissue from a patient carrying the SP-A1 W211R mutation. Histologic examination ($\times 400$) was performed on lung tissues from Patient V.11 with the W211R mutation (A–C), and from two age-matched individuals, one corresponding to a boy with normal lung (control individual) (D–F), and the other one to a female patient with a SFTPC mutation (G–I). HE staining was performed, and SP-A and SP-C expression were analyzed by immunohistochemistry. In Patient V.11, HE staining of the lung parenchyma (A) showed a severe diffuse interstitial fibrosis (*) with collapse of most alveolar spaces, and residual alveoli with type II pneumocytes hyperplasia, contrasting with the normal lung parenchyma structure of the control individual (D). SP-A staining of Patient V.11 tissue samples (B) documented a strong expression by hyperplastic pneumocytes of the collapsed alveoli (→), but this expression was heterogeneous and without the continuous secreted SP-A linear layer observed in the control individual (E). In Patient V.11, cytoplasmic SP-C expression by type II pneumocytes (→) was similar to that of the control individual (C and F). In the individual with a SFTPC mutation, HE staining (G) showed a typical IP pattern characterized by diffuse septal thickening, type II pneumocyte hyperplasia and intra-alveolar macrophages. In this individual, SP-A analysis (H) revealed a pattern of expression located on the hyperplastic type II pneumocytes and associated with a thin continuous secreted SP-A linear layer on the alveolar border (→), similar to the expression observed in the control individual (E). As expected, in the tissue specimens from the individual with a SP-C disorder, SP-C expression (I) was dramatically decreased with a dot pattern (→), which contrasted with the homogeneous expression of SP-C on type II pneumocytes (→) observed in the materials from the control individual and Patient V.11 (F and C).

inhaled agents and virus being important risk factors (36,37). In familial IPF, cigarette smoking was reported as the strongest risk factor for disease development (10,38). In the present family, exposure to cigarette smoke was documented in several members. Also, some individuals shared similar professional situations as barge workers, suggesting an important dust exposure.

The genetic and functional data reported herein strongly support a pathogenic role of the W211R mutation identified in SFTPA1 and its involvement in the development of various forms of IIP. As for the R219W missense variation, it was found in all the individuals carrying the SFTPA1 c.631T>C (W211R) mutation, in close linkage disequilibrium with the disease-causing mutation. Although one cannot exclude the possibility that the R219W variation may act as a modifier factor in IP, its high frequency in control populations and its presence in a healthy relative of the large family studied here (individual IV.8) argue against its involvement as a disease-causing mutation. In addition, functional assays performed in cells expressing SFTPA1_R219W or the SFTPA1 isoform carrying both the R219W and W211R variations, there was no detectable deleterious effect of the R219W variation expressed alone or in association with the W211R mutation (data not shown).

The present results indicate that the SP-A1 W211R mutation is associated with an impaired SP-A1 secretion and an abnormal expression pattern of SP-A in the lung parenchyma. SP-A1 contributes to the surfactant homeostasis, through its implication in

the production and secretion of the phospholipid materials by the type 2 pneumocytes, as well as in the formation of the myelin structure at the air-liquid interface of the lung (39–41). It also participates, through several signaling pathways, in the regulation of the pulmonary immune response (24–27,42,43). In addition, it is implicated in the alveolar repair process including the fibroproliferative response (8,44). The altered secretion of SP-A1 in the alveolar space may, therefore, alter a number of lung alveolar functions, thereby explaining the spectrum of pathological consequences, ranging from a severe respiratory disease occurring early in life to the clinical association of lung fibrosis with lung cancer in adult patients. These data raise the question of the respective contribution of SP-A1 and SP-A2 in the various SP-A biological functions. SFTPA2, which encodes a protein that is 96% identical to SP-A1, was sequenced in all the study group patients, and no mutations were identified. When introduced into SP-A1, the F198S mutation, previously identified in SFTPA2 (27) and that was shown to interfere with SP-A2 secretion, had similar consequences on SP-A1 secretion. Reciprocally, when introduced into SP-A2, the W211R mutation also impaired SP-A2 secretion. Taken together, these data demonstrate that, in spite of these structural and functional similarities, SP-A1 and SP-A2 are not redundant. Accordingly, it has been speculated that the overall SP-A activity depends not only on the total amount of SP-A but also on the ratio of SP-A1 to SP-A2, with an inadequate ratio contributing to an altered parenchyma homeostasis (40). Further

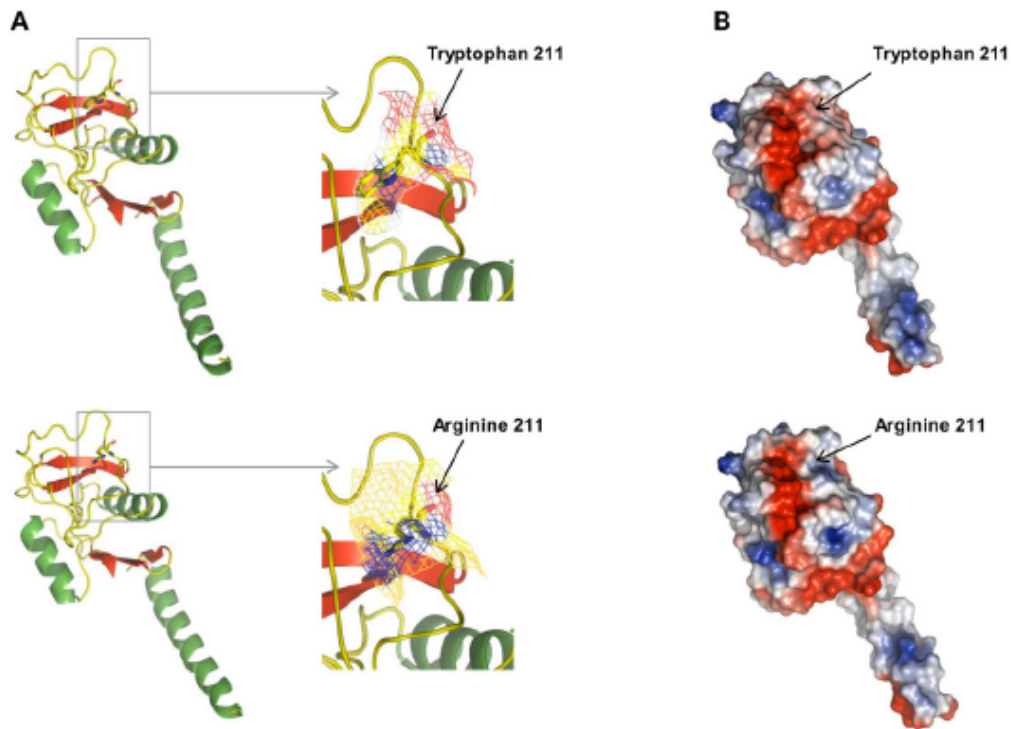


Figure 5. Modeling of structural and electrostatic changes induced by the SP-A1 W211R mutation on the CRD. (A) 3D structures of wild-type and mutated SP-A1 proteins. The secondary structure is colored according to the following code: beta-sheets in red, alpha helices in green and loops in yellow. Residue 211 is represented with sticks. Oxygen and nitrogen atoms are shown in red and blue, respectively. The arrow indicates Tryptophan 211 and Arginine 211 in the wild-type and mutant proteins, respectively. (B) Electrostatic properties of wild-type and mutated SP-A1 proteins. Electrostatic potentials are mapped on the surface of the SP-A1 3D structure. Blue color indicates regions of positive potential, whereas red depicts negative potential values. The position of residue 211 is indicated by a black arrow.

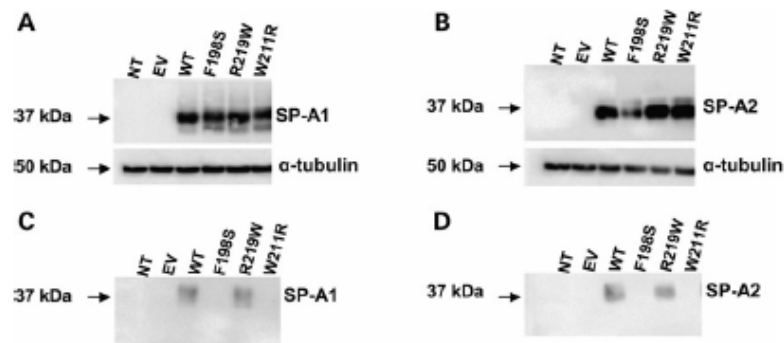


Figure 6. Effects of SFTPA1 and SFTPA2 variants on protein production and secretion. A 35–37-kDa molecular species consistent with the tagged SP-A1 or SP-A2 proteins is observed in lysates of cells expressing the wild-type or mutant SP-A isoforms (A and B). A similar 35–37-kDa molecular species is also observed in the medium of cells expressing the wild-type proteins, but not in the medium of the cells transfected with either the W211R or the F198S constructs in SP-A1 (C), or in SP-A2 (D) (representative of three independent experiments). NT, not transfected; WT, wild-type; EV, empty vector.

molecular investigations on SP-A1 and SP-A2 should help deciphering the influence of sequence variants found in each of these proteins in disease expression.

In summary, this study, which identifies SFTPA1 as a gene involved in IIP, shows that altered SP-A1 expression is associated with a large spectrum of phenotypic pulmonary manifestations

ranging from severe respiratory insufficiency occurring early in life to lung fibrosis and cancer in adult patients.

Materials and Methods

Patients' selection

Patients with familial forms of IIP were retrieved from the database of the French national network of reference centers for rare lung diseases. A total of 220 patients (pediatric and adult) from 172 unrelated families were identified. Ascertainment of IIP diagnosis was performed by review of the medical records. The clinical features that include lung function, imaging and pathology were collected using a standardized form. From this IIP cohort, the criteria for patient enrollment into the SFTPA1-SFTPA2 study were as follows: a personal or a first-degree relative history of lung cancer; and the absence of identified mutations in SFTPB, SFTPC, ABCA3 and telomerase genes. The study was approved by the French 'Comité de Protection des Personnes', and each patient (or the parents for minor individuals) gave his/her written informed consent.

SFTPA1 and SFTPA2 sequencing

Patient DNA was isolated from blood using the Flexigene (Qiagen) method. The four coding exons of SFTPA1 and SFTPA2, and their flanking intronic junctions were sequenced. NM_005411.4 isoform was used for SFTPA1 analysis, and NM_001098668.2 isoform was used for SFTPA2 analysis. As SFTPA1 and SFTPA2 cDNA are 98% identical, PCR primers were designed in order to specifically amplify SFTPA1 and SFTPA2 (Supplementary Material, Table S2 and Supplementary Material, Fig. S3). PCR were performed with Master Mix GreenGoTaq (Promega) and sequencing with Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) after an Exoap-IT purification step.

Modeling of structural and electrostatic changes induced by the SP-A1 W211R mutation on the CRD

The 3D structures of WT SP-A1 and SP-A1 carrying the W211R mutation were generated using the rat SP-A1 crystal structure (residues 201-248) from the Protein Data Bank (PDB ID: 3PA1K) as template. Briefly, homology modeling was performed using Modeller software v.9.10. Accuracy of output structures from Modeller was further assessed using Procheck v.3.5.4 (45,46). Conformational changes were evaluated by a RMSD value comparison between the WT and the mutated SP-A1 domains using SuperPose Version 1.0 (34). Electrostatic modeling of the protein domain surface was generated with the use of the vacuum electrostatics PyMOL plugin (v0.99).

Plasmid constructs

The WT SFTPA1 cDNA and the SFTPA2 cDNA, obtained from human universal RNA, were inserted into the pcDNA3 expression vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) downstream of the CMV promoter. A 27 amino-acid HA tag was subsequently added to generate the plasmids pSFTPA1-WT. pSFTPA1-W211R was then obtained by site-direct mutagenesis. Following a similar procedure, additional SFTPA expression plasmids that were used as controls were generated: pSFTPA1_R219W, and pSFTPA1_F198S that encodes the mutation previously identified in the close paralog SFTPA2 (31); SP-A2-encoding plasmids carrying a 24 amino-acid FLAG tag and the corresponding same three sequence variations

(i.e. pSFTPA2_W211R, pSFTPA2_219W and pSFTPA2_F198S) were also generated.

Transfections and western blotting

The above-mentioned plasmid constructs encoding various SP-A1 and SP-A2 isoforms were transfected into HEK293T human cells by the FuGENE method, and protein production was studied 48 h after transfection. Aliquots of 15 µg of proteins extracted from the cellular lysates and from the cell culture medium were analyzed by western blotting. To assess SP-A1 expression and secretion, the membranes were first incubated for 1 h, either with a monoclonal anti-HA high affinity antibody (Roche 3F10®), or a monoclonal anti-FLAG high affinity antibody (Sigma-Aldrich anti-FLAGM2®A8592), followed by a 1 h incubation with an anti-mouse peroxidase antibody (Southern Biotech 1070-05). For the data obtained on cell culture medium, as loading controls, the gels and the nitrocellulose membranes were stained, respectively, with Coomassie blue and Ponceau S solution (data not shown). Results are representative of three independent experiments.

Immunohistochemistry

Tissue samples from lung biopsies were analyzed by microscopic evaluation coupled with computerized image analysis of stained materials and studied by means of immunohistochemistry (35). A mouse SP-A monoclonal antibody (Abcam-32E12, 1/200) was used, according to manufacturer's protocol. As a control, a rabbit polyclonal anti-SP-C antibody (Santa Cruz-13979, 1/100) was used, according to the manufacturer's protocol.

Supplementary Material

Supplementary Material is available at HMG online.

Acknowledgements

We thank the patients and their families for their participation to the study; Jean-François Bemaudin for his valuable expertise in surfactant and lung physiology and Michel Feuchmaur and Capucine Picard for their help in collecting patient samples. We also thank Ecole Doctorale 394, Physiologie Physiopathologie et Thérapeutique, UPMC, Sorbonne Universités, Paris; and Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Centre National de Référence des Maladies Respiratoires Rares RespiRare.

Conflict of Interest statement. None declared.

Authors' contributions

N.N. designed the study, performed experiments, analyzed and interpreted the data, wrote and revised the manuscript; V.G., C.P. and H.N. were in charge of the involved patients, collected and analyzed the clinical data; L.Go., D.V., L.-J.C., T.C., R.B., B.C. and M.R.-G. were in charge of the involved families; A.C.-L. collected and analyzed the pathological data; F.D.-L., L.Ga., A.L., N.K., M.S., P.D., V.N., S.T., L.M.-H., M.L. and C.K. contributed to the DNA sample collection and analysis, as well as to the functional studies; B.Co performed the modeling of structural and electrostatic changes induced by the identified mutation; S.A. and A.C. designed the study, analyzed and interpreted the data, wrote and revised the manuscript.

Funding

This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et la Recherche Médicale (INSERM), the Legs Poix from the Chancellerie des Universités, Paris (grants 1305 and 1405), as well as fundings from the patient organisations Respirer c'est Grandir and Belleherbe Association.

References

- Travis, W.D., Costabel, U., Hansell, D.M., King, T.E. Jr, Lynch, D. A., Nicholson, A.G., Ryerson, C.J., Ryu, J.H., Selman, M., Wells, A.U. et al. (2013) An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **188**, 733–748.
- Nathan, N., Abou Taam, R., Epaud, R., Delacourt, C., Deschildre, A., Reix, P., Chiron, R., de Pontbriand, U., Brouard, J., Fsyon, M. et al. (2012) A national Internet-linked based database for pediatric interstitial lung diseases: the French network. *Orphanet J. Rare Dis.*, **7**, 40.
- Nathan, N., Thouvenin, G., Fauroux, B., Corvol, H. and Clement, A. (2011) Interstitial lung disease: physiopathology in the context of lung growth. *Paediatr. Respir. Rev.*, **12**, 216–222.
- Raghu, G., Collard, H.R., Egan, J.J., Martinez, F.J., Behr, J., Brown, K.K., Colby, T.V., Cordier, J.-F., Flaherty, K.R., Lasky, J. A. et al. (2011) An official ATS/ERS/RS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **183**, 788–824.
- Kim, H.J., Perlman, D. and Tomic, R. (2015) Natural history of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir. Med.*, **109**, 661–670.
- Raghu, G., Amatto, V.C., Behr, J. and Stowasser, S. (2015) Comorbidities in idiopathic pulmonary fibrosis patients: a systematic literature review. *Eur. Respir. J.*, **46**, 1113–1130.
- Selman, M. and Pardo, A. (2014) Revealing the pathogenic and aging-related mechanisms of the enigmatic idiopathic pulmonary fibrosis. An integral model. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **189**, 1161–1172.
- Ahluwalia, N., Shea, B.S. and Tager, A.M. (2014) New therapeutic targets in idiopathic pulmonary fibrosis. Aiming to rein in runaway wound-healing responses. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **190**, 867–878.
- Vancheri, C. (2013) Common pathways in idiopathic pulmonary fibrosis and cancer. *Eur. Respir. Rev.*, **22**, 265–272.
- Steele, M.P., Speer, M.C., Loyd, J.E., Brown, K.K., Herron, A., Sliker, S.H., Burch, L.H., Wahidi, M.M., Phillips, J.A. 3rd, Sporn, T. A. et al. (2005) Clinical and pathologic features of familial interstitial pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **172**, 1146–1152.
- Borie, R., Kannengiesser, C. and Crestani, B. (2012) Familial forms of nonspecific interstitial pneumonia/idiopathic pulmonary fibrosis: clinical course and genetic background. *Curr. Opin. Pulm. Med.*, **18**, 455–461.
- García-Sancho, C., Buendía-Roldán, I., Fernández-Plata, M.R., Navano, C., Pérez-Padilla, R., Vargas, M.H., Loyd, J.E. and Selman, M. (2012) Familial pulmonary fibrosis is the strongest risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir. Med.*, **105**, 1902–1907.
- van Moorsel, C.H., van Oosterhout, M.F., Barlo, N.P., de Jong, P. A., van der Vis, J.J., Ruven, H.J., van Es, H.W., van den Bosch, J. M. and Gutters, J.C. (2010) Surfactant protein C mutations are the basis of a significant portion of adult familial pulmonary fibrosis in a dutch cohort. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **182**, 1419–1425.
- Armanios, M.Y., Chen, J.J., Cogan, J.D., Alder, J.K., Ingersoll, R. G., Markin, C., Lawson, W.E., Xie, M., Vulto, I., Phillips, J.A. 3rd et al. (2007) Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *N. Engl. J. Med.*, **356**, 1317–1326.
- Tsakiri, K.D., Cronkhite, J.T., Kuan, P.J., Xing, C., Raghu, G., Weissler, J.C., Rosenblatt, R.L., Shay, J.W. and Garcia, C.K. (2007) Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 7552–7557.
- Cogan, J.D., Kropski, J.A., Zhao, M., Mitchell, D.B., Rives, L., Markin, C., Gamett, E.T., Montgomery, K.H., Mason, W.R., McKean, D.F. et al. (2015) Rare variants in RTEL1 are associated with familial interstitial pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **191**, 646–655.
- Kannengiesser, C., Borie, R., Ménard, C., Réocreux, M., Nitschké, P., Gazal, S., Mal, H., Taillé, C., Cadranet, J., Nunes, H. et al. (2015) Heterozygous RTEL1 mutations are associated with familial pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. J.*, **46**, 474–485.
- Alder, J.K., Parry, E.M., Yegnasubramanian, S., Wagner, C.L., Lieblich, L.M., Auerbach, R., Auerbach, A.D., Wheelan, S.J. and Armanios, M. (2013) Telomere phenotypes in females with heterozygous mutations in the dyskeratosis congenita 1 (DKC1) gene. *Hum. Mutat.*, **34**, 1481–1485.
- Alder, J.K., Stanley, S.E., Wagner, C.L., Hamilton, M., Hamumanthu, V.S. and Armanios, M. (2015) Exome sequencing identifies mutant TINF2 in a family with pulmonary fibrosis. *Chest*, **147**, 1361–1368.
- Stuart, B.D., Choi, J., Zaidi, S., Xing, C., Holohan, B., Chen, R., Choi, M., Dharwadkar, P., Torres, F., Girod, C.E. et al. (2015) Exome sequencing links mutations in PARN and RTEL1 with familial pulmonary fibrosis and telomere shortening. *Nat. Genet.*, **47**, 512–517.
- Whitsett, J.A., Wert, S.E. and Weaver, T.E. (2015) Diseases of pulmonary surfactant homeostasis. *Annu. Rev. Pathol.*, **10**, 371–393.
- Turcu, S., Ashton, E., Jenkins, L., Gupta, A. and Mok, Q. (2013) Genetic testing in children with surfactant dysfunction. *Arch. Dis. Child.*, **98**, 490–495.
- Palaniyar, N., Ridsdale, R.A., Hearn, S.A., Possmayer, F. and Hamuz, G. (1999) Formation of membrane lattice structures and their specific interactions with surfactant protein A. *Am. J. Physiol.*, **276**, L642–L649.
- Herrem-Ramos, E., López-Rodríguez, M., Ruiz-Hernández, J.J., Horcajada, J.P., Borderías, L., Lema, E., Blanquer, J., Pérez-González, M.C., García-Laorden, M.I., Florido, Y. et al. (2014) Surfactant protein A genetic variants associate with severe respiratory insufficiency in pandemic influenza A virus infection. *Crit. Care*, **18**, R127.
- Floros, J. and Thomas, N.J. (2011) Surfactant protein genetics in community-acquired pneumonia: balancing the host inflammatory state. *Crit. Care*, **15**, 156.
- Löfgren, J., Rämert, M., Renko, M., Marttila, R. and Hallman, M. (2002) Association between surfactant protein A gene locus and severe respiratory syncytial virus infection in infants. *J. Infect. Dis.*, **185**, 283–289.
- Goto, H., Ledford, J.G., Mukherjee, S., Noble, P.W., Williams, K. L. and Wright, J.R. (2010) The role of surfactant protein A in bleomycin-induced acute lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **181**, 1336–1344.
- Floros, J., Wang, G. and Mikerov, A.N. (2009) Genetic complexity of the human innate host defense molecules, surfactant protein A1 (SP-A1) and SP-A2-impact on function. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, **19**, 125–137.

29. Hoover, R.R. and Floros, J. (1998) Organization of the human SP-A and SP-D loci at 10q22-q23. Physical and radiation hybrid mapping reveal gene order and orientation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **18**, 353–362.
30. Silveyra, P. and Floros, J. (2013) Genetic complexity of the human surfactant-associated proteins SP-A1 and SP-A2. *Gene*, **531**, 126–132.
31. Wang, Y., Kuan, P.J., Xing, C., Cronkhite, J.T., Torres, F., Rosenblatt, R.L., DiMaio, J.M., Kinch, L.N., Grishin, N.V. and Garcia, C.K. (2009) Genetic defects in surfactant protein A2 are associated with pulmonary fibrosis and lung cancer. *Am. J. Hum. Genet.*, **84**, 52–59.
32. Coghlan, M.A., Shifren, A., Huang, H.J., Russell, T.D., Mitra, R. D., Zhang, Q., Wegner, D.J., Cole, F.S. and Hamvas, A. (2014) Sequencing of idiopathic pulmonary fibrosis-related genes reveals independent single gene associations. *BMJ Open Respir. Res.*, **1**, e000057.
33. van Moorssel, C.H.M., Ten Klooster, L., van Oosterhout, M.F.M., deJong, P.A., Adams, H., Wouter van Es, H., Ruven, H.J.T., van der Vliet, J.J. and Grutters, J.C. (2015) SFTPA2 mutations in familial and sporadic idiopathic interstitial pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **192**, 1249–1252.
34. Maiti, R., Van Domselaar, G.H., Zhang, H. and Wishart, D.S. (2004) SuperPose: a simple server for sophisticated structural superposition. *Nucleic Acids Res.*, **32**, W590–W594.
35. Ochs, M., Johnen, G., Müller, K.-M., Wahlers, T., Hawgood, S., Richter, J. and Brasch, F. (2002) Intracellular and intraalveolar localization of surfactant protein A (SP-A) in the parenchymal region of the human lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **26**, 91–98.
36. Molyneaux, P.L. and Maher, T.M. (2013) The role of infection in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. Rev.*, **22**, 376–381.
37. Gulati, M. and Redlich, C.A. (2015) Asbestosis and environmental causes of usual interstitial pneumonia. *Curr. Opin. Pulm. Med.*, **21**, 193–200.
38. Yang, I.V. and Schwartz, D.A. (2015) Epigenetics of idiopathic pulmonary fibrosis. *Transl. Res.*, **165**, 48–60.
39. Klein, J.M., McCarthy, T.A., Dagle, J.M. and Snyder, J.M. (2002) Antisense inhibition of surfactant protein A decreases tubular myelin formation in human fetal lung in vitro. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **282**, L386–L393.
40. Wang, G., Taneva, S., Keough, K.M.W. and Floros, J. (2007) Differential effects of human SP-A1 and SP-A2 variants on phospholipid monolayers containing surfactant protein B. *Biochim. Biophys. Acta*, **1768**, 2060–2069.
41. Wang, G., Guo, X., DiAngelo, S., Thomas, N.J. and Floros, J. (2010) Humanized SFTPA1 and SFTPA2 transgenic mice reveal functional divergence of SP-A1 and SP-A2: formation of tubular myelin in vivo requires both gene products. *J. Biol. Chem.*, **285**, 1198–2010.
42. Tolosa, M. and Palariyar, N. (2014) Severe respiratory insufficiency during pandemic H1N1 infection: prognostic value and therapeutic potential of pulmonary surfactant protein A. *Crit. Care Lond. Engl.*, **18**, 479.
43. Zhu, B., Zheng, F., Liu, N., Zhu, M.-H., Xie, J., Ye, J.-R., Zhang, J., Jiang, D.-Q., Yang, C. and Jiang, Y. (2014) Diagnostic value of surfactant protein-A in severe acute pancreatitis-induced acute respiratory distress syndrome. *Med. Sci. Monit.*, **20**, 1728–1734.
44. Selman, M., Lin, H.-M., Montaño, M., Jenkins, A.L., Estrada, A., Lin, Z., Wang, G., DiAngelo, S.L., Guo, X., Umstead, T.M. et al. (2003) Surfactant protein A and B genetic variants predispose to idiopathic pulmonary fibrosis. *Hum. Genet.*, **113**, 542–550.
45. Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S. and Thornton, J. M. (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.*, **26**, 283–291.
46. Rullmann, J.A.C. (1996) AQUA, Computer Program, Department of NMR Spectroscopy, Bijvoet Center for Biomolecular Research, Utrecht University, The Netherlands.

6.2.2 Etudes complémentaires

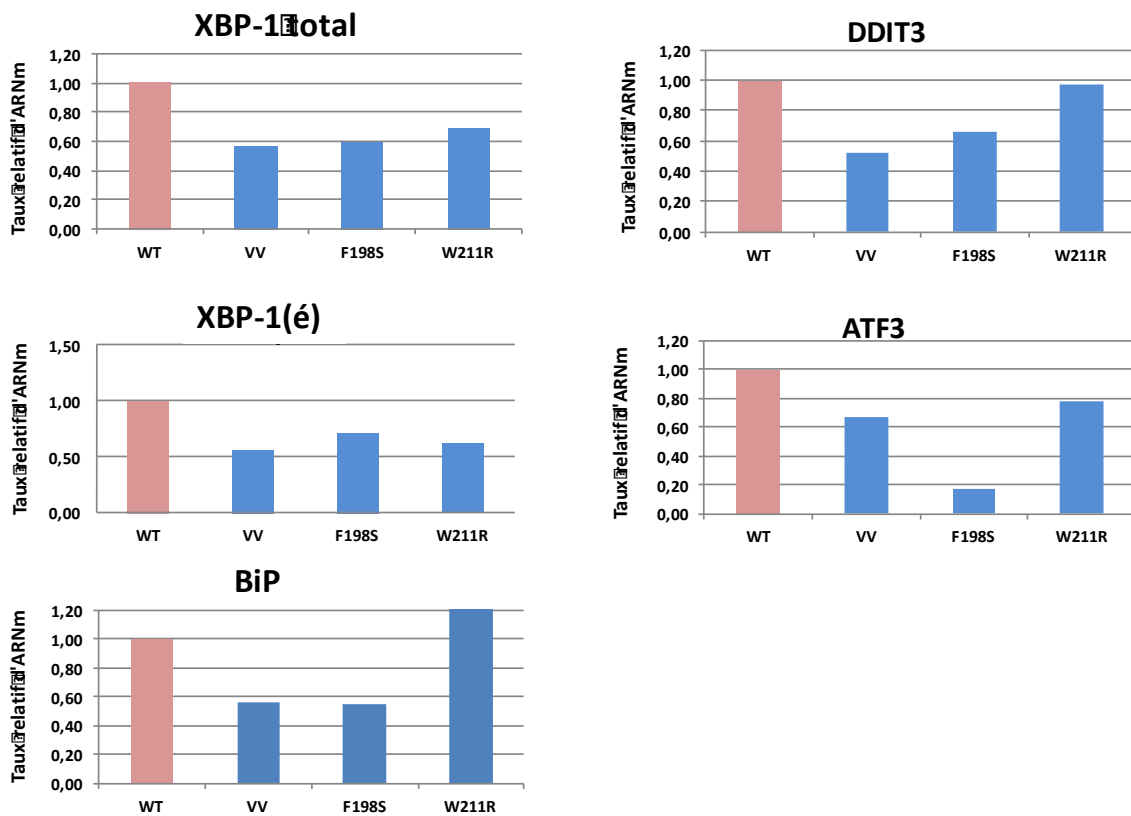
6.2.2.1 Etude du stress du RE

A partir des lysats cellulaires de cellules HEK293T transfectées, les expressions des gènes impliqués dans le stress du RE ont été comparées entre les constructions mutantes et WT de *SFTP1A1*.

La variation F198S, décrite par Wang et al. et pour laquelle un stress du RE a été mis en évidence par Maitra et al. 2010, a été utilisée comme témoin positif. Le polymorphisme P62L a été utilisé comme témoin négatif, en plus du vecteur vide et du DMSO.

Comme le montre la **Figure 23**, représentative de 3 expériences différentes, aucune différence n'a pu être mise en évidence entre les différentes conditions utilisées.

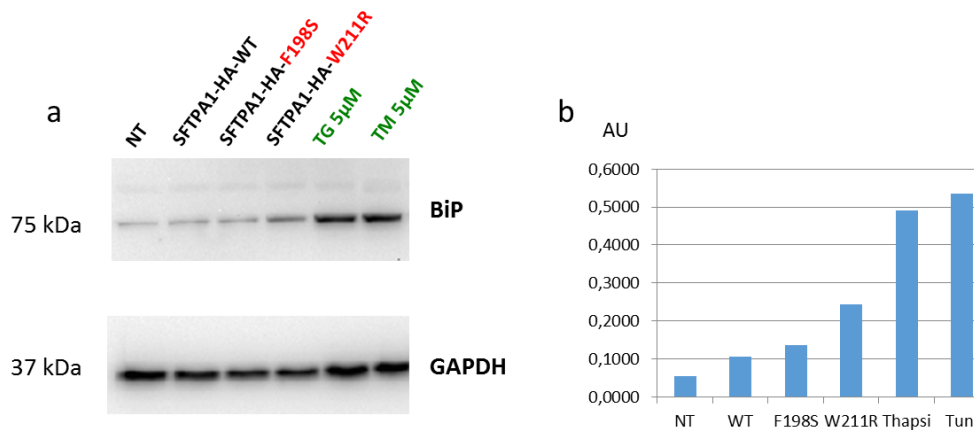
Figure 23 : Taux relatifs d'ARNm de plusieurs marqueurs de stress du RE par PCR quantitative



Des constructions plasmidiques comprenant les gènes *SFTP1A1*-WT, ou les mutants *SFTP1A1*-F198S et *SFTP1A1*-W211R ont été transfectés dans ces cellules HEK293T. Leurs taux relatifs d'ARNm de XBP-1 total et épissé (é), DDIT3, ATF3, et BiP issus des différents lysats cellulaires sont rapportés.

Ces résultats ont été confirmés par l'étude en WB de la production de BiP par des cellules HEK293T transfectées par des constructions plasmidiques WT et mutées (**Figure 24**). Cette expérience a confirmé que les conditions expérimentales étaient valides, mais que nous n'avions pas pu mettre en évidence de différence significative des marqueurs de stress du RE entre les formes sauvages et mutées.

Figure 24 : Etude protéique de la production de BiP



(a) Western Blot. La thapsigargine (TG, Thapsi), qui inhibe la pompe à calcium du RE, et la tunicamycine (TM, Tuni), qui inhibe la N-glycosylation des protéines en cours de synthèse dans le RE, sont des molécules qui induisent un stress du RE. Le marqueur de dépôt protéique était la GAPDH. Les Ac utilisés ont été les suivants : Ac anti Bip lapin, concentration 1/1000, Ac anti lapin HRP, concentration 1/1000, Ac anti GAPDH-HRP, concentration 1/1000.

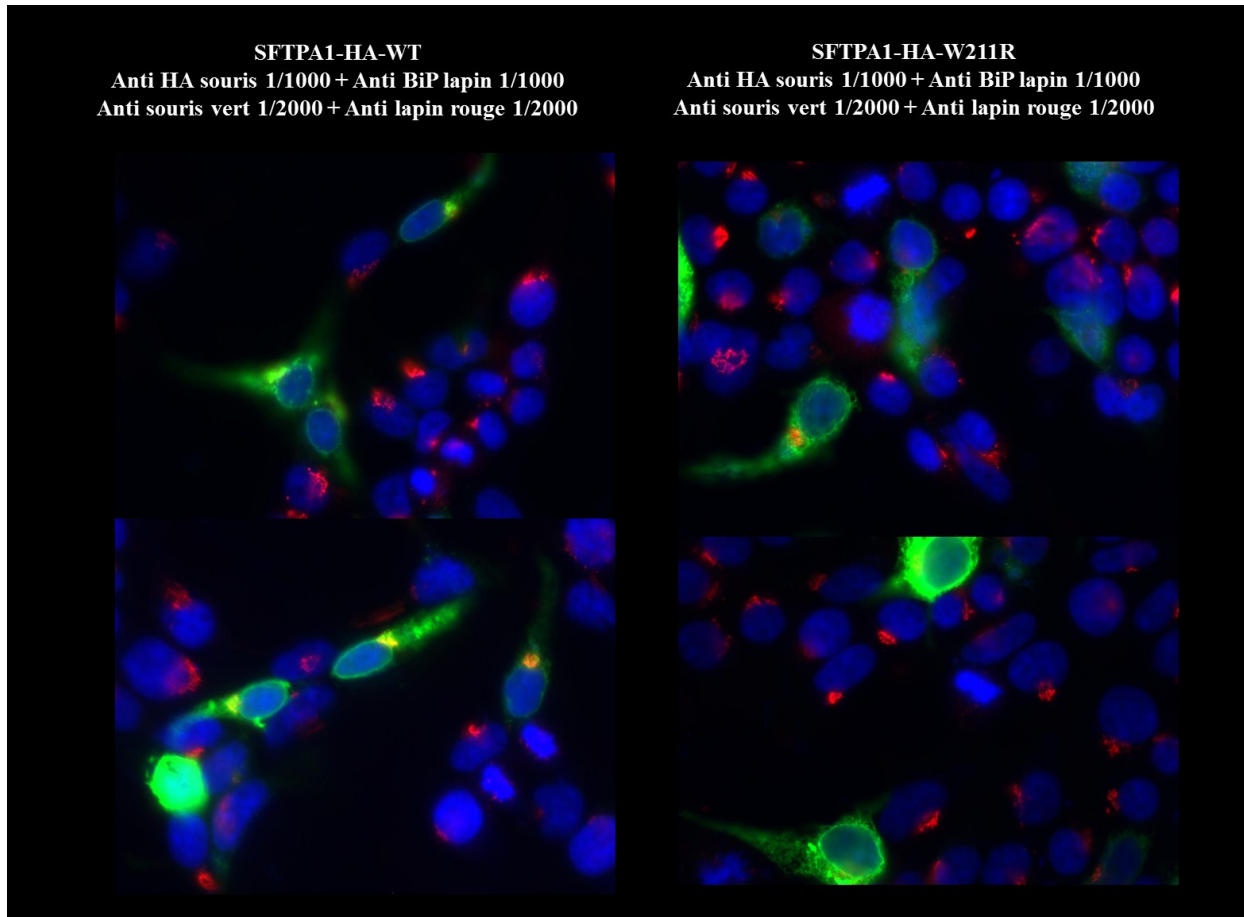
(b) Histogramme quantitatif de la production de protéine BiP. Les témoins positifs (Thapsi et Tuni), induisaient bien un stress du RE. Les modèles utilisant les constructions porteuses des mutations W211R et F198S ne montrent pas d'augmentation significative de la protéine BiP. AU : unité arbitraire

6.2.2.2 Etudes de la localisation cellulaire de SP-A1 en immunofluorescence

La protéine SP-A1 WT est localisée dans le cytoplasme des cellules HEK293T (**Figure 25**, panel gauche, marquage vert). La protéine SP-A1 mutée W211R (**Figure 25**), panel droit, marquage vert) a également une localisation cytoplasmique, et ne co-localise pas avec le RE (marqué en rouge). On retrouve les mêmes résultats avec la protéine SP-A1 mutée F198S (**Figure 26**, panel de droite). Ceci n'est donc pas en faveur d'une séquestration des protéines SP-A1 mutantes dans le RE.

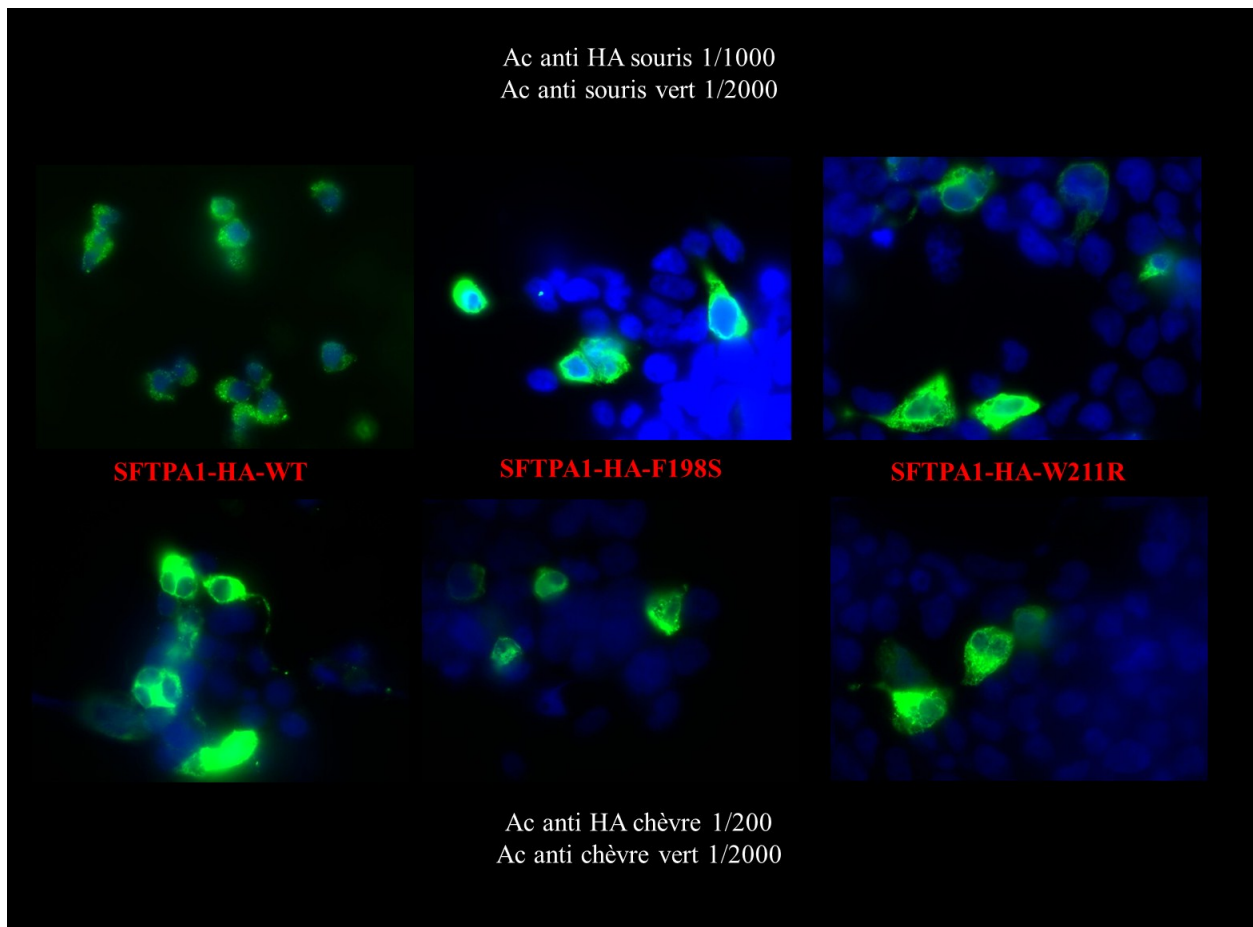
Les mêmes résultats ont été retrouvés en modifiant le couple d'Ac utilisés pour la réalisation de l'immunofluorescence (**Figure 26**).

Figure 25 : Etude en immunofluorescence de cellules HEK293T transfectées avec des vecteurs d'expression de protéines SP-A1 sauvage (SFTPA1-HA-WT) et mutées (SFTPA1-HA-W211R)



Les noyaux sont marqués en bleu au DAPI, les protéines SP-A1-WT et SP-A1-W211R sont marquées en vert, les protéines BiP du RE sont marquées en rouge. Images au grossissement x 100. Les protéines sauvages et mutées ont une localisation cytoplasmique diffuse.

Figure 26 : Etude en immunofluorescence de cellules HEK293T transfectées avec des vecteurs d'expression de protéines SP-A1 sauvage (SFTPA1-HA-WT) et mutées (SFTPA1-HA-F198S et SFTPA1-HA-W211R)



Les noyaux sont marqués en bleu au DAPI, les protéines SP-A1-WT, SP-A1-F198S et SP-A1-W211R sont marquées en vert. Images au grossissement x 100. Les protéines sauvages et mutées ont une localisation cytoplasmique diffuse.

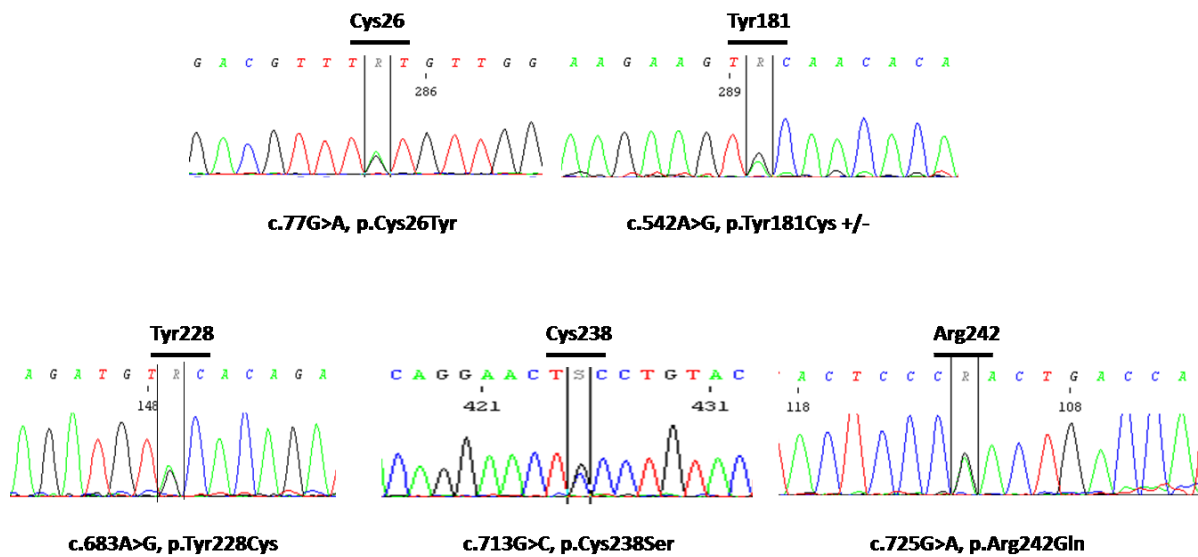
6.3 Etude de SP-A2

Nous avons pu identifier 5 nouvelles variations dans le gène *SFTPA2*, dont 4 sont situées dans le CRD de la protéine SP-A2 (**Table 5**, et **Figure 27**). Chaque variation a été retrouvée dans une seule famille à l'état hétérozygote. Tous les patients avaient une FPI, dont le début variait entre 29 et 59 ans. Deux d'entre eux présentaient une forme familiale de FPI, et 4 ont rapporté un antécédent au premier degré de cancer pulmonaire (**Figure 28**).

Table 5 : Variations retrouvées dans le gène *SFTP2*

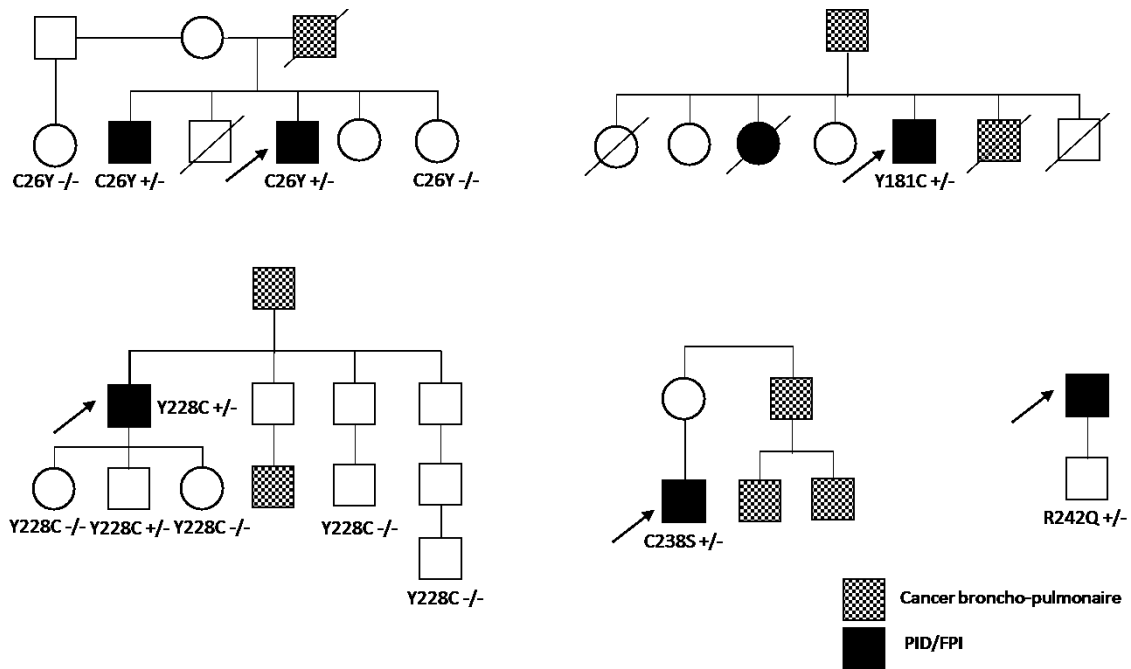
Variant		Exon	Domaine protéique
Position génomique	Position protéique		
c.77G>A	p.Cys26Tyr	3	N-terminal
c.542A>G	p.Tyr181Cys	6	CRD
c.683A>G	p.Tyr228Cys	6	CRD
c.713G>C	p.Cys238Ser	6	CRD
c.725G>A	p.Arg242Gln	6	CRD

Figure 27 : Electrophoregrammes des prélèvements des patients présentant une variation du gène *SFTP2*



Résultats issus du séquençage Sanger et lus avec le logiciel SeqScape.

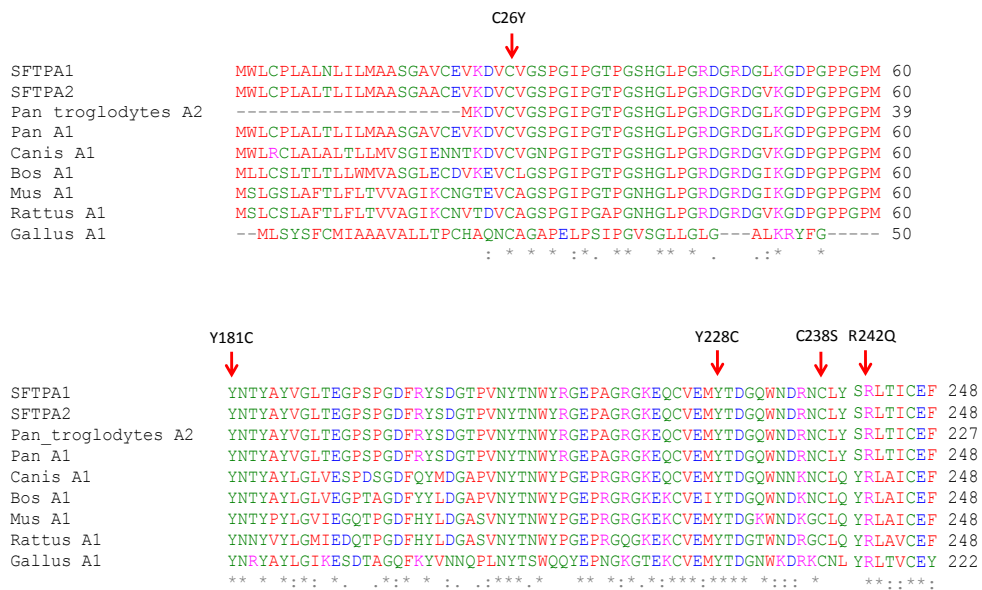
Figure 28 : Arbres généalogiques des individus index porteurs d'une variation du gène *SFTPA2*



La flèche indique un cas index. Les patients présentant une PID sont schématisés par un symbole noir plein. Les symboles colorés en damier correspondent à des patients présentant un cancer pulmonaire.

Aucune des variations retrouvées n'a été décrite dans la littérature ni dans les bases de données de polymorphismes. Toutes concernaient un acide aminé invariant ou très conservé au cours de l'évolution (**Figure 29**).

Figure 29 : Alignements homologues et interespèces de SP-A1 et SP-A2



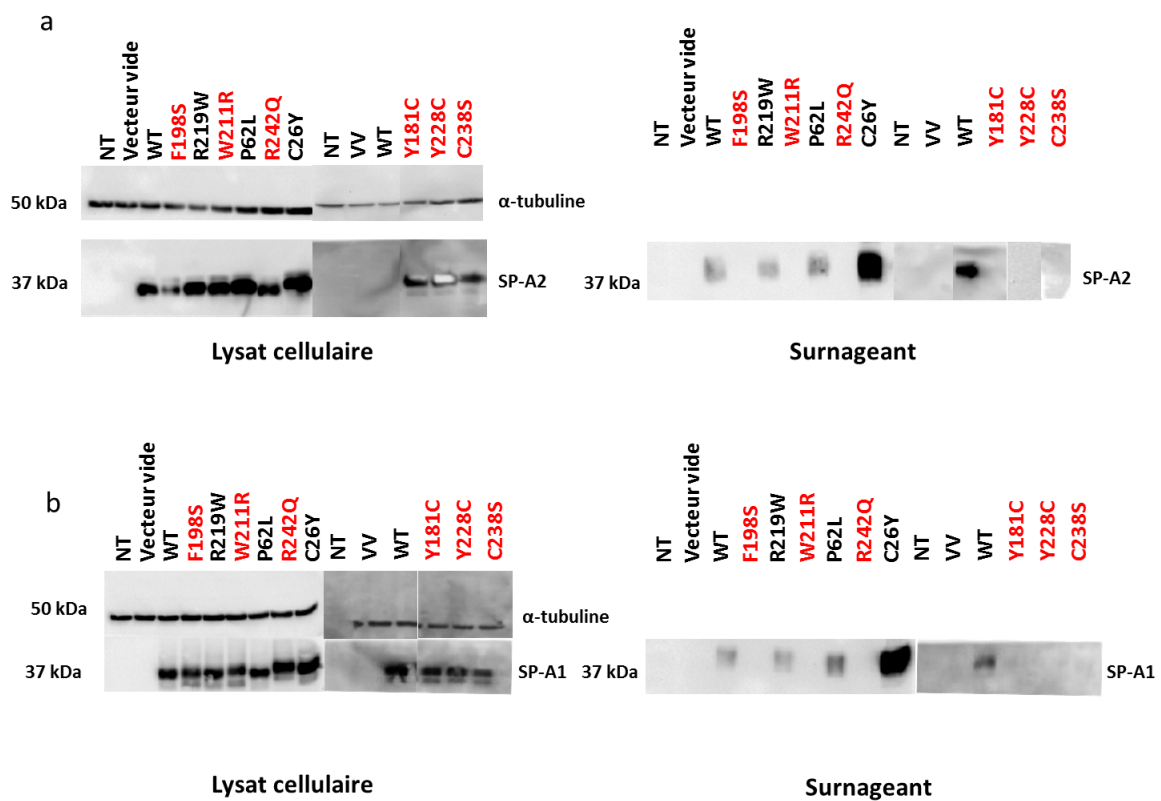
Les acides aminés concernés par les variations de SP-A2 retrouvées sont indiquées par des flèches. On observe la conservation des acides aminés impliqués, non seulement au cours de l'évolution, mais aussi entre SP-A1 et SP-A2

Les études fonctionnelles des variants identifiés dans *SFTP2* ont été réalisées à l'aide de constructions plasmidiques.

Lorsque les variants sont introduits dans des systèmes cellulaires, on observe une production similaire des protéines sauvages et mutées. En revanche, on constate une altération de la sécrétion des protéines mutées pour les variants Y181C, Y228C, C238S et R242Q (**Figure 30 (a)**).

Les mêmes résultats sont retrouvés lorsque la variation est introduite dans un vecteur d'expression *SFTP1* (**Figure 30 (b)**).

Figure 30 : Effets des variants R242Q, C26Y, Y181C, Y228C et C258S, retrouvés dans le gène *SFTP2*, sur la production et la sécrétion de SP-A2 et SP-A1



- (a) Une bande protéique correspondant à SP-A2 est observée à 35-37-kDa dans les lysats cellulaires des cellules HEK293T exprimant les formes sauvage et mutantes des protéines SP-A2 taguées. Une bande similaire est observée dans les surnageants des constructions cellulaires sauvages et exprimant le variant C26Y, mais aucune sécrétion n'est observée pour les mutants R242Q, Y181C, Y228C et C238S décrits dans *SFTP2*. On observe le même profil de production et de sécrétion pour les variants précédemment décrits (W211R dans *SFTP1* et F198S décrits dans *SFTP2*).
- (b) Les mêmes résultats sont observés en utilisant des constructions plasmidiques *SFTP1*.

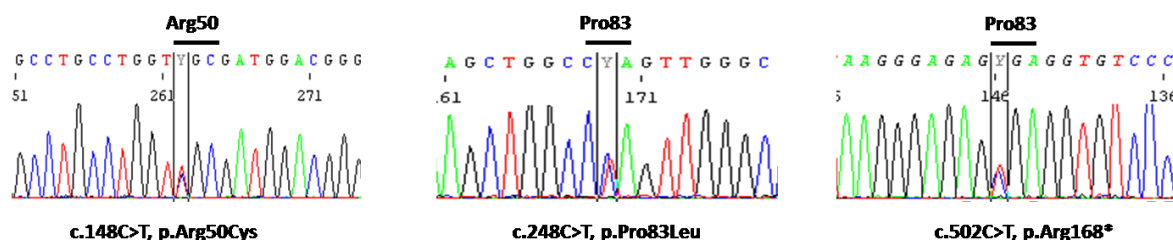
6.4 Analyse pour *SFTPD*

Trois variants de *SFTPD* ont été identifiés à l'état hétérozygote (**Table 6** et **Figure 31**) chez deux adultes et un enfant.

Table 6 : Variations retrouvées dans le gène *SFTPD*

Variant		Exon	Domaine protéique
Position génomique	Position protéique		
c.148C>T	p.Arg50Cys	2	1 ^{er} domaine collagène
c.248C>T	p.Pro83Leu	3	1 ^{er} domaine collagène
c.502C>T	p.Arg168*	5	2 ^{ème} domaine collagène

Figure 31: Electrophoregrammes des prélèvements des patients présentant une variation du gène *SFTPD*



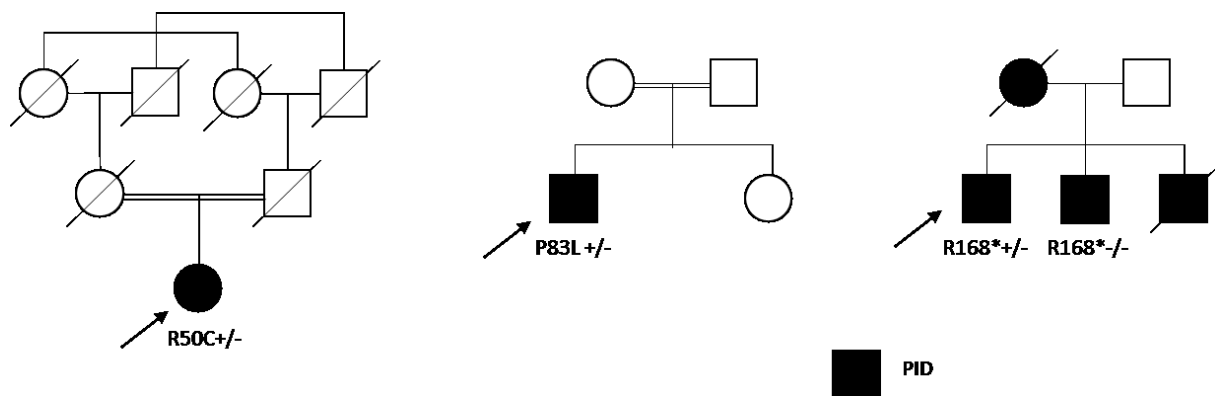
Résultats issus du séquençage Sanger et lus avec le logiciel SeqScape.

- La variation R50C a été identifiée chez une femme de 61 ans issue d'une union consanguine, fumeuse, présentant une PID non familiale (**Figure 32**). Cette variation, non décrite dans la littérature et dans les bases de données de polymorphismes, concerne un acide aminé peu variant au cours de l'évolution (**Figure 33**). La variation R50C ajoute une cystéine à la protéine SP-D, lui conférant alors un chiffre impair de cystéine qui pourrait déstabiliser la structure tertiaire de la protéine. Cependant, les études de production et de sécrétion protéique n'ont pas retrouvé de différence avec les modèles cellulaires transfectés avec des plasmides *SFTPD*-WT (**Figure 34**). Le caractère pathogène de la variation R50C n'a donc pas pu être confirmé à ce stade.

- **La variation P83L** a été retrouvée chez un enfant de 1 an issu d'une union consanguine et présentant une PID non familiale (**Figure 32**). Cette variation, non décrite dans la littérature et dans les bases de données de polymorphismes, concerne un acide aminé invariant au cours de l'évolution (**Figure 33**). Comme précédemment, les études de production et de sécrétion protéique n'ont pas retrouvé de différence avec les modèles cellulaires transfectés avec des plasmides SFTPD-WT (**Figure 34**). Le caractère pathogène de la variation P83L n'a donc pas pu être confirmé à ce stade. Il est à noter que l'évolution du patient a permis de mettre en évidence une cause métabolique à sa PID.

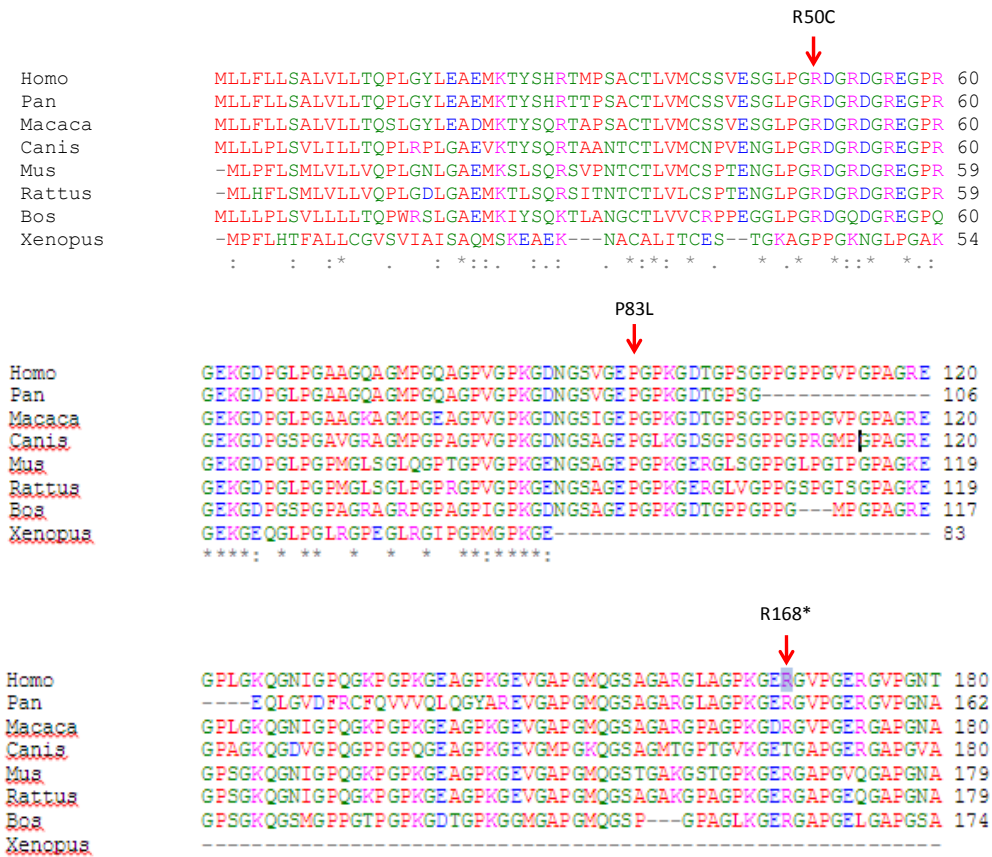
- **La variation R168*** a été retrouvée chez un patient de 70 ans présentant une FPI familiale (**Figure 32**). Elle concerne un acide aminé peu variant au cours de l'évolution (**Figure 33**). Cette variation était décrite dans la littérature mais à une fréquence très faible (2 allèles sur 121236 allèles contrôles). Les études fonctionnelles n'ont pas mis en évidence de production de SP-D, ni de sécrétion (**Figure 34**). Cette variation n'a pas été retrouvée chez le frère du cas index présentant lui aussi une FPI (**Figure 32**). Malgré les arguments précédemment cités qui pouvaient être en faveur de sa pathogénicité, l'absence de ségrégation de la variation avec le phénotype de FPI est en défaveur de sa pathogénicité.

Figure 32 : Arbres généalogiques des individus index chez qui une variation du gène *SFTPD* a été mise en évidence



La flèche indique un cas index. Les patients présentant une PID sont schématisés par un symbole noir plein.

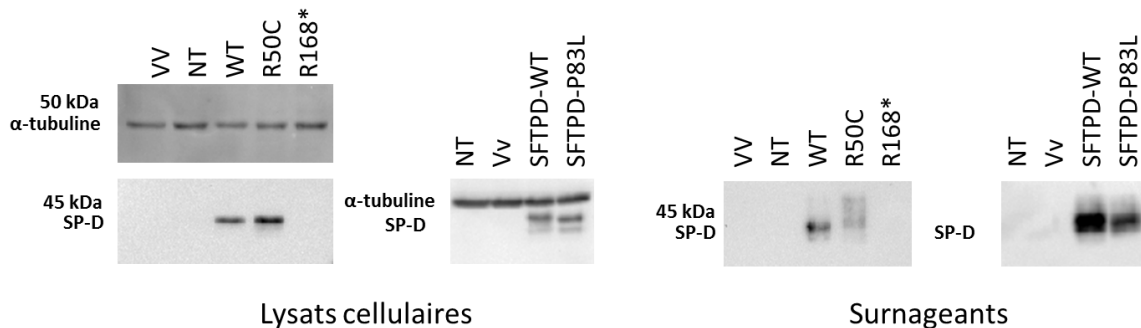
Figure 33 : Alignements interspèces montrant la conservation des acides aminés de la protéine SP-D au cours de l'évolution



Les acides aminés concernés par les variations de SP-D retrouvées sont indiquées par des flèches. On observe la relative conservation des acides aminés impliqués au cours de l'évolution des espèces.

Les effets des variants R50C, P83L et R168* de *SFTPD* sur la production et la sécrétion protéique de SP-D sont présentés sur la **Figure 34**.

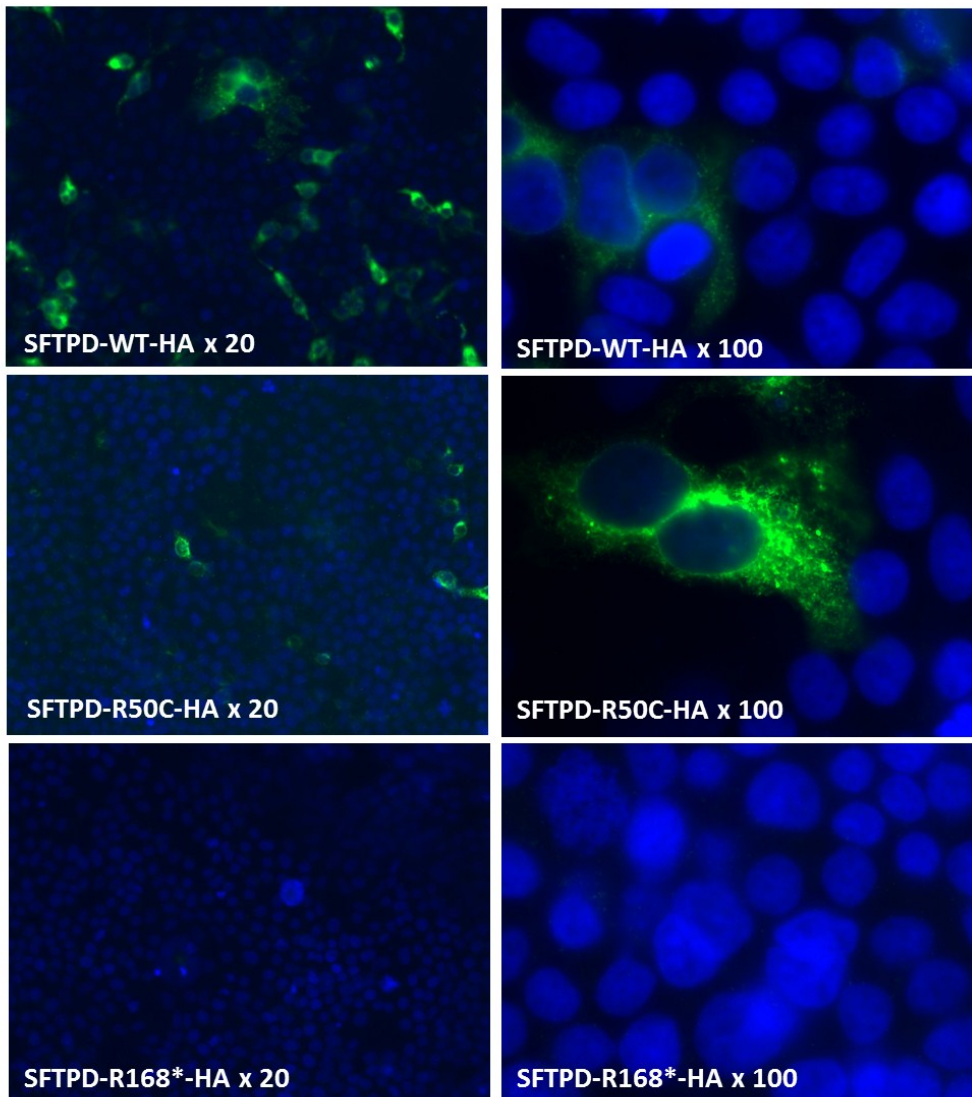
Figure 34 : Effets des variants retrouvés dans *SFTPD* sur la production et la sécrétion de SP-D



Une bande protéique correspondant à SP-D est observée à 45-kDa dans les lysats cellulaires des cellules HEK293T exprimant les formes sauvages et mutantes des protéines SP-D. Une bande similaire est observée dans les surnageants des constructions cellulaires sauvages et exprimant les variants R50C et P83L. Aucune sécrétion n'est observée pour les mutants R168*.

Les études en immunofluorescence pour la variation R50C n'ont pas pu retrouver de différence de localisation cellulaire entre le variant et la protéine sauvage, les protéines étant toutes deux localisées dans l'espace cytoplasmique. En revanche, aucune protéine SP-D-R168* n'a pu être visualisée en immunofluorescence (**Figure 35**).

Figure 35 : Etude en immunofluorescence de cellules HEK293T transfectées avec des vecteurs d'expression de protéines SP-D WT (SFTPD-WT-HA) et mutées (SFTPD-R50C-HA et SFTPD-R168*-HA)



Les noyaux sont marqués en bleu au DAPI, les protéines SP-D-WT, SP-D-R50C et SP-D-R168* sont marquées en vert. Colonne de gauche : grossissement x 20, colonne de droite : grossissement x 100. Les protéines sauvages et mutées ont une localisation cytoplasmique diffuse.

6.5 Etude des autres gènes

6.5.1 *SFTP B*

Une variation homozygote ou hémizygotte du gène *SFTP B* (Q206= (c.618G>A)), qui semble avoir un effet sur l'épissage, a été mise en évidence chez un patient adulte (**Table 7**). Son caractère pathogène est actuellement en cours d'analyse. Une mutation hétérozygote a aussi été mise en évidence chez un autre patient adulte.

6.5.2 *SFTP C*

Douze mutations hétérozygotes de *SFTP C* ont été mises en évidence : 5 chez des patients adultes et 7 chez des enfants, dont 6 âgés de moins de 2 ans.

6.5.3 *ABCA3*

Sept mutations homozygotes ou hétérozygotes composites d'*ABCA3* ont été mises en évidence (6 chez des enfants et 1 chez un adulte). Dix-neuf mutations hétérozygotes d'*ABCA3* ont été identifiées.

6.5.4 *NKX2-1*

Un diagnostic de « brain lung thyroïd » syndrome a été fait chez une femme de 42 ans présentant une FPI, une chorée bénigne et une hypothyroïdie. La variation non-sens H90Afs*349 a été mise en évidence chez cette patiente.

6.6 Synthèse

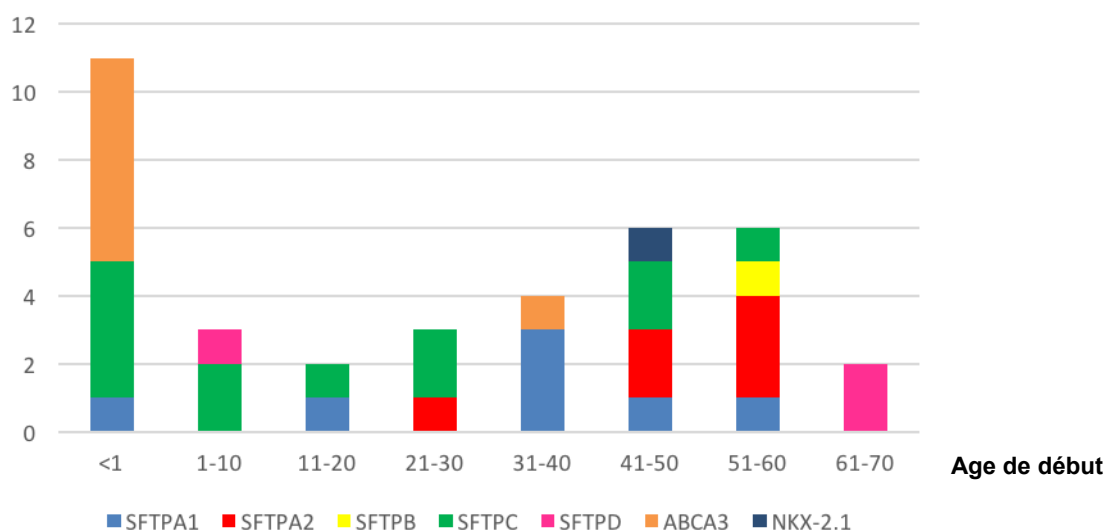
6.6.1 *Synthèse des résultats originaux*

Les résultats de génotypage obtenus sont résumés dans les **Table 7** et **Table 8**, et dans la **Figure 35**. Ils ont fait l'objet de communications aux congrès de l'European Respiratory Society en septembre 2015 (**Annexe 7**), aux Assises de Génétique en février 2016 (Prix de Poster de la Fédération Française de Génétique Humaine) (**Annexe 8**), et au congrès de l'American Thoracic Society en mai 2016 (**Annexe 9**).

Les variations ont été décrites chez des enfants et des adultes, et pour chaque gène étudié, une très grande dispersion des âges de révélation de la PID a pu être documentée (**Figure 36**).

Figure 36 : Age de début de la PID des patients pour lesquels une mutation d'un gène du système de surfactant a été identifiée

Nombre de patients



Répartition des gènes impliqués selon l'âge des patients de la cohorte.

Au total, une mutation a été retrouvée pour 27 cas index (7,5%). Huit patients présentaient une forme familiale de PID et 19 une forme sporadique de PID.

Des variations hétérozygotes des gènes *SFTPA1* et *SFTPA2* ont été mises en évidence dans 6 familles. Des mutations dans des gènes *SFTPB*, *SFTPC*, *ABCA3*, et *NKX2-1* ont été retrouvées dans 21 familles. Des mutations hétérozygotes du gène *ABCA3* ont été mises en évidence pour 19 patients. Cependant, les variations du gène *ABCA3* s'exprimant classiquement selon un mode autosomique récessif, nous avons volontairement séparé ces résultats dans la **Table 7**.

Table 7: Résumé des variations génétiques impliquant un gène du système du surfactant dans la cohorte de 345 individus indépendants

	Patients n (%)	Enfants (101 patients) n (%)	Adultes (244 patients) n (%)
<i>SFTPA1</i> hétérozygote	1 (0,2)	0 (0)	1 (0,4)
<i>SFTPA2</i> hétérozygote	5 (1,4)	0 (0)	5 (2)
<i>SFTPB</i> homozygote ou hétérozygote composite	1 (0,2)	0 (0)	1 (0,4)
<i>SFTPC</i> hétérozygote ou homozygote	12 (3,5)	7 (7)	5 (2)
<i>ABCA3</i> homozygote ou hétérozygote composite	7 (2)	6 (6)	1 (0,4)
<i>NKX2-1</i> hétérozygote	1 (0,2)	0 (0)	1 (0,4)
TOTAL 1	27 (7,5)	13 (13)	14 (5,7)
<i>ABCA3</i> hétérozygote	19 (5,5)	11 (11)	8 (3,2)
TOTAL 2	46 (13,3)	24 (24)	22 (9)

Table 8 : Variations identifiées dans les familles de la cohorte

Gène	Variations	Position (Exon)	Nombre d'individus / nombre de familles
<i>SFTPA1</i>	W211R hétérozygote	6	9 / 1
<i>SFTPA2</i>	C26Y hétérozygote	3	2 / 1
	Y181C hétérozygote	6	1
	Y228C hétérozygote	6	2 / 1
	C238S hétérozygote	6	1
	R242Q hétérozygote	6	1
<i>SFTPB</i>	Y138D hétérozygote	5	1
	Q206= (c.618G>A) homozygote ou hémizygote	6	1
<i>SFTPC</i>	G4S hétérozygote	1	1 / 1
	M60I hétérozygote	2	1 / 1
	I73T hétérozygote	3	5 / 5
	V102M homozygote	3	1 / 1
	Y113C hétérozygote	4	1 / 1
	R167Q hétérozygote	5	2 / 2
	L194P hétérozygote	5	1 / 1
<i>SFTPD</i>	R50C hétérozygote	2	1 / 1
	P83L hétérozygote	3	1 / 1
	R168* hétérozygote	5	1 / 1
<i>ABCA3</i>	D115E et D253H 2 mutations homozygotes	6 et 8	1 / 1
	G202R homozygote	7	1 / 1
	D253H homozygote	8	1 / 1
	R208W et R1521W hétérozygote composite	8 et 30	1 / 1
	E292V et E690K hétérozygote composite	9 et 17	1 / 1
	G974D et A1027P 2 mutations homozygotes	22	1 / 1
	F1077I homozygote	21 et 22	1 / 1
	R106* hétérozygote	5	1 / 1
	V129M hétérozygote	6	1 / 1
	P138T hétérozygote	6	1 / 1
	L212M hétérozygote	8	1 / 1
	R288K hétérozygote	8	2 / 2
	E292V hétérozygote	9	5 / 5
	V337M hétérozygote	10	1 / 1
	V473I hétérozygote	12	1 / 1
	R709W hétérozygote	17	1 / 1
	T1036M hétérozygote	22	1 / 1
	V1125M hétérozygote	23	1 / 1
	A1166V hétérozygote	24	1 / 1
	R1305Q hétérozygote	26	1 / 1
	R1474Q hétérozygote	29	1 / 1
<i>NKX2-1</i>	H90Afs*349	1	1 / 1

En rouge, les variations identifiées pour la première fois dans le laboratoire (non décrites dans la littérature ni dans les bases de données de polymorphismes)

6.6.2 Synthèse des publications en cours

Ce travail a permis la publication du manuscrit donné à la section 6.2.1.

Deux autres publications originales sont en cours de préparation :

La première est une présentation des phenotypes et des histoires naturelles associés aux variations identifiées dans les gènes du système du surfactant de l'enfant à l'adulte. Le manuscrit décrira l'ensemble des nouvelles variations identifiées dans la population d'étude, les âges au diagnostic, les aspects cliniques et radiologiques des patients. Il rapportera le nombre total de variations identifiées dans la cohorte, chez les enfants et les adultes, et insistera sur l'intérêt d'une analyse des gènes du système du surfactant dans les PID de tous âges, sporadiques ou familiales, sans diagnostic retrouvé.

La seconde publication présentera les 5 nouvelles variations de *SFTPA2* qui ont pu être identifiées, avec les études fonctionnelles attestant de leur pathogénicité. A ce jour, seules 6 autres mutations, dont 2 avec études fonctionnelles (F198S et G231V) ont été rapportées dans la littérature. Ce travail de thèse montre que les variations de ce gène représentent une part non négligeable des causes génétiques de PID, et que chez ces patients et leurs apparentés, un dépistage des PID mais aussi des cancers broncho-pulmonaire doit être envisagé.

7. Discussion

Le travail de thèse réalisé a permis de documenter l'implication d'un nouveau gène, *SFTPA1*, dans le développement des PID de l'enfant et de l'adulte. Il a aussi mis en évidence qu'une part non négligeable des PID de l'enfant et de l'adulte est associée à une mutation d'un gène du système du surfactant alvéolaire, et a permis de préciser les caractéristiques phénotypiques des patients.

Population d'étude et variants de SP-A et SP-D identifiés

L'objectif principal de ce travail était de documenter, dans une cohorte de patients pédiatriques et adultes présentant une PID, les variations des gènes du surfactant, en ciblant plus particulièrement ceux codant pour les collectines SP-A1, SP-A2 et SP-D. Nous avons pu mettre en évidence une mutation germinale (p.Trp211Arg) du gène *SFTPA1* dans une large famille de PID de l'enfant et de l'adulte. Son caractère délétère a été suggéré sur plusieurs éléments : la mutation W211R ségrège avec un phénotype associant une PID ou une FPI, et chez certains patients un adénocarcinome pulmonaire ; elle concerne un acide aminé du CRD invariant au cours de l'évolution, mais aussi entre les protéines homologues SP-A1 et SP-A2 ; in silico, la mutation entraîne une modification de la charge locale du CRD, même si elle n'altère pas de façon évidente la structure tridimensionnelle du CRD ; lorsque la mutation est introduite dans un vecteur d'expression de la protéine SP-A1, elle abolit, in vitro, l'excrétion cellulaire de la protéine SP-A1 mutée, mais aussi celle de SP-A2 lorsque la même mutation est introduite dans un vecteur d'expression de la protéine SP-A2 ; sur les tissus pulmonaire d'une patiente, les études immunohistochimiques ont montré une altération de l'expression de SP-A.

Les protéines SP-A1 et SP-A2 sont paralogues et s'hétéro-trimérisent. Cependant, les mutations hétérozygotes de *SFTPA1* ou *SFTPA2* peuvent être associées à une expression clinique pathologique. Ceci suggère que les protéines SP-A1 et SP-A2 ont des fonctions non redondantes, et que l'intégrité des deux protéines est nécessaire à l'homéostasie du surfactant. Ceci avait été suggéré par Wang G et al. (2010) qui avait étudié des LBA de souris transgéniques exprimant *SFTPA1* et *SFTPA2*. Cette étude avait montré que seules les souris exprimant à la fois SP-A1 et SP-A2 présentaient une myéline tubulaire d'aspect normal en microscopie électronique (88).

Jusqu'à présent, les mutations du gène *SFTPA2* décrites dans la littérature impliquaient exclusivement des adultes (93,97,98). La famille multigénérationnelle dans laquelle a été retrouvée la mutation (p.Trp211Arg) du gène *SFTPA1* a la particularité de comporter des patients de tout âge, dont un nourrisson ayant présenté une PID sévère et fatale dans les premiers mois de vie. La seconde patiente pédiatrique, âgée de 14 ans, présentait un phénotype atypique dont il est difficile de savoir s'il est

imputable à la mutation du gène *SFTPA1* ou aux conséquences des troubles de la déglutition dans le contexte de son encéphalopathie. Dans cette même famille, des individus de plus de 50 ans porteurs de la mutation W211R, sont asymptomatiques. Il semble donc que la symptomatologie en rapport avec la mutation W211R puisse s'exprimer de façon précoce et sévère, chez l'enfant et l'adulte jeune, mais aussi, rester sans conséquence clinique. Cette très forte hétérogénéité phénotypique est rapportée pour d'autres mutations des gènes du surfactant, en particulier celles du gène *SFTPC* (68). Elle est probablement le résultat d'expositions environnementales et de comorbidités différentes entre les individus, y compris lorsqu'ils présentent la même prédisposition génétique. Dans la famille décrite, plusieurs patients étaient fumeurs, et pratiquaient un métier particulièrement exposant aux poussières minérales (mariniers). Ces éléments ont pu contribuer au développement de la maladie chez ces individus. Concernant le nourrisson présentant la mutation W211R de *SFTPA1*, il a été évoqué que des infections virales aient pu déclencher le développement de la PID, ou favoriser sa progression, bien que les études microbiologiques réalisées n'aient pas documenté de pathogène.

Alors que les mutations du gène *SFTPA2* étaient considérées comme très rares dans la littérature, leur recherche systématique a permis de mettre en évidence 5 variations différentes, chez 5 individus non apparentés. Pour 4 des 5 variations, les études *in silico* et fonctionnelles ont permis d'attester leur pathogénicité. Pour la variation C26Y, celle-ci reste à déterminer. L'analyse des phénotypes des apparentés de ces patients retrouve une histoire familiale d'adénocarcinome dans la majorité des familles. Nous n'avons pas mis en évidence de mutation de *SFTPA2* chez l'enfant. Cependant, ces 2 gènes étant hautement homologues, il est probable que, comme pour *SFTPA1*, des mutations de *SFTPA2* puissent être identifiées chez des enfants jeunes présentant des PID. Aux vues du risque d'adénocarcinome, ce diagnostic pourrait poser des problèmes éthiques complexes.

Ce travail a également permis de mettre en évidence des variations du gène *SFTPD*. Les études fonctionnelles sont en cours pour documenter leur caractère pathogène.

Hétérogénéité phénotypique

Cette étude avait aussi pour objectif de décrire les caractéristiques phénotypiques des patients. La population d'étude est constituée d'1/3 d'enfants et de 2/3 d'adultes. Le mode de recrutement des patients ne permet pas de discuter cette répartition qui dépend beaucoup des collaborations qui se sont mises progressivement en place avec les différents centres de pneumologie. On retrouve une surreprésentation des hommes (environ 2/3 d'hommes pour 1/3 de femmes). Il est connu que les FPI de l'adulte concernent majoritairement des hommes (59). Dans l'idée d'un continuum entre les PID de l'enfant et de l'adulte, il est probable que les études pédiatriques retrouvent progressivement cette même répartition filles / garçons avec un recueil de plus en plus exhaustif des données. La notion de PID familiale est décrite dans la littérature chez environ 10% des patients. Dans ce travail, ce taux est

largement supérieur puisqu'une histoire familiale de PID est retrouvée chez 25% des patients (et jusqu'à 47% des patients pour lesquels cette donnée était renseignée). Ce chiffre est sans doute sur-estimé par la nature même des critères d'inclusion, mais il est possible que les formes familiales de PID soient plus fréquentes, que cela n'était précédemment décrit.

Il semble se distinguer 2 pics d'âge au diagnostic : l'un dans la petite enfance, et l'autre chez l'adulte entre 50 et 70 ans. Des facteurs d'environnement et des comorbidités pourraient expliquer cette répartition. Le premier pic, entre 0 et 2 ans, pourrait correspondre aux infections virales répétées de la petite enfance. Le second, plus tardif, pourrait être lié à d'autres facteurs environnementaux aéro-contaminants comme le tabac, les poussières minérales et organiques, retrouvés chez une majorité des individus interrogés.

Les PID semblent être, pour plus de 2/3 des patients, une maladie s'inscrivant dans une atteinte multiviscérale. En effet, les manifestations extra-pulmonaires décrites étaient nombreuses, avec au premier plan les manifestations d'auto-immunité (28,9% des patients), et articulaires (26,1% des patients). L'expression des protéines du surfactant au niveau du liquide synovial est rapportée et pourrait expliquer cette localisation préférentielle des symptômes non respiratoires. L'association des polyarthrites rhumatoïdes aux PID et aux FPI est connue. Comme pour les autres maladies auto-immunes, l'atteinte respiratoire est le plus souvent attribuée à la maladie immunitaire elle-même. Un travail récent, en cours de soumission, réalisé en collaboration avec le Pr Philippe Dieude (Rhumatologie, Hôpital Bichat, Paris), retrouve une proportion importante de mutations du gène *SFTPC* chez des patients présentant l'association d'une polyarthrite rhumatoïde et d'une FPI. Le lien physiopathologique entre protéines du surfactant et dysimmunité n'est pas connu. Des études ciblées sont nécessaires pour expliquer ces liens, et analyser l'expression des transcrits des gènes du surfactant dans les tissus cibles comme le poumon et les articulations.

Implication des autres gènes du surfactant

Les autres gènes du système du surfactant, déjà impliqués dans les PID de l'enfant et de l'adulte, ont été analysés. Cela nous a permis d'identifier des facteurs génétiques pour un nombre important de PID de l'enfant et de l'adulte.

Chez l'enfant, cette proportion était de 13%, et concernait principalement des nourrissons qui présentaient des variations des gènes *SFTPC* ou *ABCA3* s'exprimant par une détresse respiratoire néonatale, ou une PID précoce et sévère. Les mutations de *SFTPC* retrouvées étaient majoritairement des néomutations, et la mutation I73T était la plus fréquente (2/3 des patients), comme cela est déjà décrit. Les mutations du gène *ABCA3* identifiées étaient différentes pour chaque patient, et la variation E292V, décrite comme la plus fréquente, représentait seulement 6/33 (18%) des allèles variants dans notre cohorte. Pour 13 enfants (13%), une seule variation hétérozygote du gène *ABCA3* a été mise en

évidence. Ceci a été associé dans la littérature à un plus grand risque de détresse respiratoire néonatale chez des enfants caucasiens. Notre hypothèse est qu'une seule variation d'*ABCA3* pourrait être un facteur de susceptibilité des PID. Des études des transcrits de *ABCA3* sont en cours pour analyser l'effet délétère de ces variations dans les tissus pulmonaires.

Concernant *SFTPB*, aucune mutation n'a été retrouvée chez les nourrissons inclus dans cette étude. Les mutations du gène *SFTPB* étant associées à des détresses respiratoires néonatales le plus souvent fatales, il est probable que ces patients soient décédés précocement dans des services de réanimation pédiatrique et que ces défauts moléculaires restent sous-diagnostiqués. Une analyse génétique pourrait être proposée de façon plus systématique pour les enfants à terme présentant une détresse respiratoire irréversible non expliquée.

Chez les patients adultes, un diagnostic génétique impliquant un gène du système du surfactant a concerné 5,7% des cas. Tous les gènes ont été impliqués chez l'adulte, majoritairement *SFTPA2* et *SFTPC*. Les patients porteurs d'une mutation de *SFTPC* ne présentaient pas de phénotype clinique différenciant par rapport aux autres patients. Cependant, on peut noter que 2 de ces patients avaient également une polyarthrite rhumatoïde. SP-C pourrait avoir un rôle dans le liquide synovial. Une variation d'épissage de *SFTPB* a été décrite dans ce travail chez un patient adulte issu d'une union consanguine, présentant une PID sans atteinte extra-pulmonaire. A notre connaissance, aucun cas adulte de mutation homozygote de *SFTPB* n'est décrit dans la littérature. La variation retrouvée, p.Gln206= (c.618G>A), est une variation faux-sens entraînant la création d'un site d'épissage compétitif vis-à-vis du site sauvage. Il est probable que le site usuel ne soit cependant pas aboli, et qu'une quantité suffisante de protéine SP-B sauvage ait pu permettre la survie du patient. Cette hypothèse reste à conforter, et une analyse de la ségrégation de la variation avec le phénotype pathologique est en cours dans la famille.

Un adulte présentait une variation homozygote d'*ABCA3*, sans symptôme révélateur dans l'enfance. Cela illustre bien l'hétérogénéité phénotypique associée aux mutations de ce gène, qui ne doivent pas être considérées comme des maladies exclusivement pédiatriques. Pour 8 adultes, une variation hétérozygote d'*ABCA3* a pu être mise en évidence (3,2%), et là encore, leur signification reste à déterminer. Une seule patiente adulte présentant un « brain lung thyroid » syndrome typique, était porteuse d'une mutation du gène *NKX2-1*. L'implication de ce gène semble donc très rare, a fortiori en l'absence d'hypothyroïdie ou de chorée bénigne. L'intérêt d'une étude systématique de ce gène doit être discuté.

Nous avons pu mettre en évidence l'association des PID à de nombreuses manifestations extra-pulmonaires en particulier auto-immunes et articulaires, mais l'analyse des phénotypes n'a pas permis de réaliser des corrélations entre les phénotypes et les gènes impliqués. La multiplication des cas analysés pourrait permettre de préciser ces phénotypes.

Les examens paracliniques, comme l'analyse en microscopie électronique du surfactant issu de LBA des patients, pourraient permettre d'orienter les études génétiques. Il est par exemple décrit des altérations des corps lamellaires en cas de mutations d'*ABCA3*, avec des inclusions denses (**Figure 11**). De telles analyses restent encore peu développées.

Au total, chez les patients présentant une PID non étiquetée familiale ou sporadique, il semble difficile de proposer une stratégie de diagnostic moléculaire ciblée sur un seul des gènes du système du surfactant en fonction de la présentation clinique.

Conséquences physiopathologiques des variants de *SFTPA1* et *SFTPA2*

Les mutations des gènes *SFTPA1* et *SFTPA2* s'expriment selon un mode dominant. Les patients étaient en effet porteurs de mutations hétérozygotes de transmission verticale. Nous avons soulevé plusieurs hypothèses physiopathologiques pouvant expliquer la pathogénicité des mutations retrouvées :

Un effet dominant négatif des protéines mutées sur les protéines sauvages peut être envisagé : les études fonctionnelles ont permis de mettre en évidence une abolition de la sécrétion de la protéine SP-A1 mutée, alors que celle-ci semble normalement produite par les cellules. Ceci est également retrouvé pour SP-A2. Il peut être suggéré que la protéine mutée soit mal conformée et séquestrée dans le RE. Le stress du RE induit déclencherait la réponse UPR et l'activation de voies de la mort cellulaire. A ce stade, les études d'expression des gènes de la voie du stress du RE par qPCR n'ont pas pu confirmer cette hypothèse, les résultats n'étant pas significatifs. Cependant, les premières analyses protéiques de la production de la protéine BiP semblaient en faveur d'une plus forte expression de BiP dans les systèmes cellulaires transfectés par des constructions plasmidiques porteuses de la mutation W211R. Ces résultats nécessitent d'être reproduits. En effet, ils dépendent fortement de l'efficacité de la transfection cellulaire. Les études en immunofluorescence ont montré une bonne efficacité de transfection. Cependant, les protéines SP-A1 et SP-A2 sauvages comme mutées ont été localisées de façon diffuse dans le cytoplasme des cellules, et nous n'avons pas retrouvé de localisation préférentielle des protéines mutées dans le RE ou le lysosome.

Une autre hypothèse est une atteinte de la trimérisation des protéines SP-A1 et SP-A2. Les analyses protéiques ayant été réalisés en conditions dénaturantes, cette hypothèse n'a pas pu être explorée. Des études de sécrétion en conditions non dénaturantes sont actuellement envisagées, ainsi que des co-transfections SP-A1-WT/SP-A1-W211R et SP-A2-WT/SP-A1-W211R. En effet, *in vivo* les deux protéines sont co-exprimées, et il est nécessaire de confirmer leur non-redondance, et leurs parts respectives dans la constitution des trimères de SP-A.

L'activation par les protéines SP-A1 ou SP-A2 mutées des voies de signalisation cellulaire de l'inflammation pourrait également être suggérée. Cela avait été évoqué par Maitra et al., qui avait initialement rapporté une augmentation de la production de TGF β -1, mais ces résultats n'avaient pas

été confirmés par la suite. Une étude des liens entre les mutations de *SFTPA1* et *SFTPA2* et la sécrétion de TGF- β est envisagée. Il semble en effet que SP-A permette l'activation du TGF- β . Cette liaison pourrait être compromise par les mutations de *SFTPA1* ou *SFTPA2*, favorisant alors la dé-régulation de mécanismes de réparation épithéliale et de prolifération tumorale. Ces interactions pourraient aussi être influencées par des polymorphismes de TGF- β , modulant son expression ou sa liaison à SP-A.

Une autre hypothèse serait que les protéines SP-A1 ou SP-A2 mutées induisent un dysfonctionnement du cycle cellulaire activant directement les voies de l'apoptose et de la réparation cellulaire. Cette piste semble étayée par l'observation de nombreux cas de cancers pulmonaire, et en particulier d'adénocarcinomes pulmonaires, chez les individus présentant une mutation de *SFTPA1* ou *SFTPA2*. En effet, dans la famille présentant la mutation W211R de *SFTPA1*, 3 des patients adultes décrits présentaient l'association des 2 pathologies, découvertes de façon simultanée ou non. Cette association avait été décrite précédemment pour les mutations du gène *SFTPA2*, et se confirme donc également pour *SFTPA1*. Elle ne concerne à ce jour que des patients adultes, mais la découverte d'un adénocarcinome a été rapportée dans les familles décrites pour des patients jeunes, dès 44 ans pour *SFTPA2* dans la publication de van Moorsel, 2015, et dès 50 ans dans la famille que nous avons décrite pour *SFTPA1* (98,110). Les liens entre les FPI et les adénocarcinomes pulmonaires restent à explorer. Dans ces deux situations pathologiques, des mécanismes d'altération de la réparation cellulaire ont été documentés, suggérant un rôle de SP-A dans le contrôle de la prolifération cellulaire. Une cohorte de patients présentant un phénotype associant PID/FPI et cancer pulmonaire, ou une forme familiale de cancer pulmonaire est en train d'être constituée. Des mutations des gènes codant pour *SFTPA1* et *SFTPA2* seront recherchées dans le sang et les tissus tumoraux, et l'expression de SP-A dans les tissus tumoraux sera analysée.

Conseil génétique

Plusieurs problèmes éthiques sont soulevés, notamment en ce qui concerne le conseil génétique à proposer aux individus porteurs d'une mutation de *SFTPA1* ou *SFTPA2*. Les modalités de suivi et de dépistage de la PID et des cancers pulmonaires restent entièrement à définir. Le problème est particulièrement complexe pour les apparentés asymptomatiques de ces patients, pour qui la stratégie d'information et de suivi doit prendre en compte les risques liés aux 2 maladies. A ce jour, les apparentés des cas index ont bénéficié d'un examen clinique, de conseils de prévention liés aux facteurs environnementaux (tabac, exposition professionnelle), d'un TDM thoracique et d'EFR, mais la fréquence de répétition de ces examens est à discuter en tenant compte du risque supplémentaire que constitue l'irradiation de TDM thoraciques répétés chez des patients « à risque » de développer un

cancer broncho-pulmonaire. Concernant les apparentés mineurs asymptomatiques, nous n'avons pas proposé de dépistage des familles dans lesquelles une mutation de *SFTPA1* ou *SFTPA2* a été retrouvée, mais cette stratégie reste à évaluer. Un groupe de travail constitué de pneumologues adultes et pédiatriques, de généticiens fondamentaux et cliniques, et de psychologues serait nécessaire pour tenter de définir des recommandations de prise en charge consensuelle pour ces individus.

8. Conclusion et perspectives

Ce travail de thèse a permis d'identifier un nouveau gène, *SFTPA1*, dont les mutations sont associées à des PID de l'enfant et de l'adulte. Il a aussi mis en évidence une proportion importante de variations des gènes du système du surfactant chez ces patients. Ceci incite à discuter une étude systématique de ces gènes en l'absence d'autre diagnostic, dans les formes familiales, mais aussi sporadiques de PID.

L'hétérogénéité des phénotypes décrits ne permet pas, à ce stade, de cibler l'étude d'un seul gène. Cependant, il semble que l'association à une histoire personnelle ou familiale de cancer pulmonaire doive orienter les analyses vers les gènes *SFTPA1* et *SFTPA2*. La poursuite d'un recueil phénotypique standardisé dans le cadre du programme de recherche RaDiCo (Rare Disease Cohorts) permettra de progresser dans l'étude des corrélations phénotypes/génotypes de ces patients (**Annexe 5**).

L'augmentation des diagnostics génétiques dans les PID soulève la question d'un conseil génétique adapté, incluant, pour *SFTPA1* et *SFTPA2*, le dépistage de potentiels risques tumoraux. Enfin, le déficit en SP-A induit par les mutations décrites ouvre des pistes de réflexion sur une utilisation de SP-A à visée thérapeutique.

9. Financement

Cette étude a reçu le soutien du legs Poix pour les années 2013, 2014, et 2015. Elle a aussi été soutenue par les associations de patients Belleherbe et Respirer c'est Grandir.

10. Références

1. Clement A, ERS Task Force. Task force on chronic interstitial lung disease in immunocompetent children. *Eur Respir J*. 2004 Oct;24(4):686–97.
2. Bush A, Cunningham S, de Blic J, Barbato A, Clement A, Epaud R, et al. European protocols for the diagnosis and initial treatment of interstitial lung disease in children. *Thorax*. 2015;70(11):1078–84.
3. Travis WD, Costabel U, Hansell DM, King TE Jr, Lynch DA, Nicholson AG, et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013 Sep 15;188(6):733–48.
4. Nathan N, Thouvenin G, Fauroux B, Corvol H, Clement A. Interstitial lung disease: physiopathology in the context of lung growth. *Paediatr Respir Rev*. 2011;12(4):216–22.
5. Clement A, Nathan N, Epaud R, Fauroux B, Corvol H. Interstitial lung diseases in children. *Orphanet J Rare Dis*. 2010;5:22.
6. Dinwiddie R, Sharief N, Crawford O. Idiopathic interstitial pneumonitis in children: a national survey in the United Kingdom and Ireland. *Pediatr Pulmonol*. 2002;34(1):23–9.
7. Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Mar 15;183(6):788–824.
8. Kim HJ, Perlman D, Tomic R. Natural history of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med*. 2015 Jun;109(6):661–70.
9. Steele MP, Schwartz DA. Molecular mechanisms in progressive idiopathic pulmonary fibrosis. *Annu Rev Med*. 2013;64:265–76.
10. Ahluwalia N, Shea BS, Tager AM. New therapeutic targets in idiopathic pulmonary fibrosis. Aiming to rein in runaway wound-healing responses. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 Oct 15;190(8):867–78.
11. Camelo A, Dunmore R, Sleeman MA, Clarke DL. The epithelium in idiopathic pulmonary fibrosis: breaking the barrier. *Front Pharmacol*. 2014 Jan 10;4:173.
12. Wuyts WA, Doms C, Verleden GM. The clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013 Apr 1;187(7):777.
13. Guillot L, Nathan N, Tabary O, Thouvenin G, Le Rouzic P, Corvol H, et al. Alveolar epithelial cells: master regulators of lung homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013 Nov;45(11):2568–73.
14. Fehrenbach H. Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respir Res*. 2001;2(1):33–46.
15. Whitsett JA, Wert SE, Weaver TE. Alveolar surfactant homeostasis and the pathogenesis of pulmonary disease. *Annu Rev Med*. 2010;61:105–19.
16. Pérez-Gil J. Molecular interactions in pulmonary surfactant films. *Biol Neonate*. 2002;81 Suppl 1:6–15.
17. Glasser JR, Mallampalli RK. Surfactant and its role in the pathobiology of pulmonary infection. *Microbes Infect Inst Pasteur*. 2012 Jan;14(1):17–25.
18. Rooney SA, Young SL, Mendelson CR. Molecular and cellular processing of lung surfactant. *FASEB J*. 1994 Sep 1;8(12):957–67.
19. Wong MH, Johnson MD. Differential response of primary alveolar type I and type II cells to LPS stimulation. *PloS One*. 2013;8(1):e55545.
20. Aono Y, Ledford JG, Mukherjee S, Ogawa H, Nishioka Y, Sone S, et al. Surfactant protein-D regulates effector cell function and fibrotic lung remodeling in response to bleomycin injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012 Mar 1;185(5):525–36.
21. Uhal BD. Cell cycle kinetics in the alveolar epithelium. *Am J Physiol*. 1997 Jun;272(6 Pt 1):L1031–45.
22. Mulugeta S, Nureki S-I, Beers MF. Lost after translation: insights from pulmonary surfactant for understanding the role of alveolar epithelial dysfunction and cellular quality control in fibrotic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015 Sep 15;309(6):L507–25.

23. Nathan N, Corvol H, Amselem S, Clement A. Biomarkers in Interstitial lung diseases. *Paediatr Respir Rev*. 2015 Sep;16(4):219–24.
24. Tanjore H, Blackwell TS, Lawson WE. Emerging evidence for endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012 Apr 15;302(8):L721–9.
25. Garlatti M, Barouki R. Le stress du réticulum endoplasmique : adaptation et toxicité. *Médecine Sci*. 2002;18:585–94.
26. Vancheri C, Cottin V, Kreuter M, Hilberg O. IPF, comorbidities and management implications. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis Off J WASOG World Assoc Sarcoidosis Granulomatous Disord*. 2015;32 Suppl 1:17–23.
27. Raghu G, Amatto VC, Behr J, Stowasser S. Comorbidities in idiopathic pulmonary fibrosis patients: a systematic literature review. *Eur Respir J*. 2015 Oct;46(4):1113–30.
28. Navaratnam V, Fogarty AW, McKeever T, Thompson N, Jenkins G, Johnson SR, et al. Presence of a prothrombotic state in people with idiopathic pulmonary fibrosis: a population-based case-control study. *Thorax*. 2014 Mar;69(3):207–15.
29. Noth I, Anstrom KJ, Calvert SB, de Andrade J, Flaherty KR, Glazer C, et al. A placebo-controlled randomized trial of warfarin in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012 Jul 1;186(1):88–95.
30. Li J, Yang M, Li P, Su Z, Gao P, Zhang J. Idiopathic pulmonary fibrosis will increase the risk of lung cancer. *Chin Med J (Engl)*. 2014;127(17):3142–9.
31. Kishi K, Homma S, Kurosaki A, Motoi N, Yoshimura K. High-resolution computed tomography findings of lung cancer associated with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Comput Assist Tomogr*. 2006 Feb;30(1):95–9.
32. Khan KA, Kennedy MP, Moore E, Crush L, Prendeville S, Maher MM, et al. Radiological characteristics, histological features and clinical outcomes of lung cancer patients with coexistent idiopathic pulmonary fibrosis. *Lung*. 2015 Feb;193(1):71–7.
33. Lee T, Park JY, Lee HY, Cho Y-J, Yoon HI, Lee JH, et al. Lung cancer in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: clinical characteristics and impact on survival. *Respir Med*. 2014 Oct;108(10):1549–55.
34. Antoniou KM, Tomassetti S, Tsitoura E, Vancheri C. Idiopathic pulmonary fibrosis and lung cancer: a clinical and pathogenesis update. *Curr Opin Pulm Med*. 2015 Nov;21(6):626–33.
35. Lee JS. The Role of Gastroesophageal Reflux and Microaspiration in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Clin Pulm Med*. 2014 Mar 1;21(2):81–5.
36. Mitchell PD, Das JP, Murphy DJ, Keane MP, Donnelly SC, Dodd JD, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis with emphysema: evidence of synergy among emphysema and idiopathic pulmonary fibrosis in smokers. *Respir Care*. 2015 Feb;60(2):259–68.
37. Leung J, Cho Y, Lockey RF, Kolliputi N. The Role of Aging in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Lung*. 2015 Aug;193(4):605–10.
38. Stella GM, Inghilleri S, Pignochino Y, Zorzetto M, Oggionni T, Morbini P, et al. Activation of oncogenic pathways in idiopathic pulmonary fibrosis. *Transl Oncol*. 2014 Oct;7(5):650–5.
39. Vancheri C, Failla M, Crimi N, Raghu G. Idiopathic pulmonary fibrosis: a disease with similarities and links to cancer biology. *Eur Respir J*. 2010 Mar;35(3):496–504.
40. Alder JK, Parry EM, Yegnasubramanian S, Wagner CL, Lieblisch LM, Auerbach R, et al. Telomere phenotypes in females with heterozygous mutations in the dyskeratosis congenita 1 (DKC1) gene. *Hum Mutat*. 2013 Nov;34(11):1481–5.
41. Armanios M, Blackburn EH. The telomere syndromes. *Nat Rev Genet*. 2012 Oct;13(10):693–704.
42. Armanios MY, Chen JJ, Cogan JD, Alder JK, Ingersoll RG, Markin C, et al. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 2007;356(13):1317–26.
43. Tsakiri KD, Cronkhite JT, Kuan PJ, Xing C, Raghu G, Weissler JC, et al. Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(18):7552–7.
44. Diaz de Leon A, Cronkhite JT, Yilmaz C, Brewington C, Wang R, Xing C, et al. Subclinical lung disease, macrocytosis, and premature graying in kindreds with telomerase (TERT) mutations. *Chest*. 2011;140(3):753–63.

45. Borie R, Kannengiesser C, Hirschi S, Le Pavec J, Mal H, Bergot E, et al. Severe hematologic complications after lung transplantation in patients with telomerase complex mutations. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. 2015 Apr;34(4):538–46.
46. Cronkhite JT, Xing C, Raghu G, Chin KM, Torres F, Rosenblatt RL, et al. Telomere shortening in familial and sporadic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;178(7):729–37.
47. Alder JK, Chen JJ, Lancaster L, Danoff S, Su SC, Cogan JD, et al. Short telomeres are a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U A*. 2008;105(35):13051–6.
48. Calado RT, Young NS. Telomere maintenance and human bone marrow failure. *Blood*. 2008 May 1;111(9):4446–55.
49. Ballew BJ, Joseph V, De S, Sarek G, Vannier J-B, Stracker T, et al. A recessive founder mutation in regulator of telomere elongation helicase 1, RTEL1, underlies severe immunodeficiency and features of Hoyeraal Hreidarsson syndrome. *PLoS Genet*. 2013 Aug;9(8):e1003695.
50. Ballew BJ, Yeager M, Jacobs K, Giri N, Boland J, Burdett L, et al. Germline mutations of regulator of telomere elongation helicase 1, RTEL1, in Dyskeratosis congenita. *Hum Genet*. 2013 Apr;132(4):473–80.
51. Le Guen T, Jullien L, Schertzer M, Lefebvre A, Kermasson L, de Villartay J-P, et al. [RTEL1 (regulator of telomere elongation helicase 1), a DNA helicase essential for genome stability]. *Médecine Sci MS*. 2013 Dec;29(12):1138–44.
52. Le Guen T, Jullien L, Touzot F, Schertzer M, Gaillard L, Perderiset M, et al. Human RTEL1 deficiency causes Hoyeraal-Hreidarsson syndrome with short telomeres and genome instability. *Hum Mol Genet*. 2013 Aug 15;22(16):3239–49.
53. Cogan JD, Kropski JA, Zhao M, Mitchell DB, Rives L, Markin C, et al. Rare variants in RTEL1 are associated with familial interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015 Mar 15;191(6):646–55.
54. Kannengiesser C, Borie R, Ménard C, Réocreux M, Nitschké P, Gazal S, et al. Heterozygous RTEL1 mutations are associated with familial pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*. 2015 Aug;46(2):474–85.
55. Stuart BD, Choi J, Zaidi S, Xing C, Holohan B, Chen R, et al. Exome sequencing links mutations in PARN and RTEL1 with familial pulmonary fibrosis and telomere shortening. *Nat Genet*. 2015 May;47(5):512–7.
56. Bertani P, Vidovic V, Yang TC, Rendell J, Gordon LM, Waring AJ, et al. Orientation and depth of surfactant protein B C-terminal helix in lung surfactant bilayers. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1818(5):1165–72.
57. Nogee LM, de Mello DE, Dehner LP, Colten HR. Brief report: deficiency of pulmonary surfactant protein B in congenital alveolar proteinosis. *N Engl J Med*. 1993;328(6):406–10.
58. Nogee LM, Garnier G, Dietz HC, Singer L, Murphy AM, deMello DE, et al. A mutation in the surfactant protein B gene responsible for fatal neonatal respiratory disease in multiple kindreds. *J Clin Invest*. 1994 Apr;93(4):1860–3.
59. Nathan N, Abou Taam R, Epaud R, Delacourt C, Deschildre A, Reix P, et al. A national internet-linked based database for pediatric interstitial lung diseases: the French network. *Orphanet J Rare Dis*. 2012;7(1):40.
60. Hamvas A, Nogee LM, deMello DE, Cole FS. Pathophysiology and treatment of surfactant protein-B deficiency. *Biol Neonate*. 1995;67 Suppl 1:18–31.
61. Dunbar AE 3rd, Wert SE, Ikegami M, Whitsett JA, Hamvas A, White FV, et al. Prolonged survival in hereditary surfactant protein B (SP-B) deficiency associated with a novel splicing mutation. *Pediatr Res*. 2000;48(3):275–82.
62. Baekvad-Hansen M, Dahl M, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Surfactant protein-B 121ins2 heterozygosity, reduced pulmonary function, and chronic obstructive pulmonary disease in smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181(1):17–20.
63. Doan ML, Guillerman RP, Dishop MK, Nogee LM, Langston C, Mallory GB, et al. Clinical, radiological and pathological features of ABCA3 mutations in children. *Thorax*. 2008;63(4):366–73.
64. Nogee LM, Dunbar AE 3rd, Wert SE, Askin F, Hamvas A, Whitsett JA. A mutation in the surfactant protein C gene associated with familial interstitial lung disease. *N Engl J Med*. 2001;344(8):573–9.

65. Lawson WE, Loyd JE, Degryse AL. Genetics in pulmonary fibrosis--familial cases provide clues to the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Med Sci.* 2011;341(6):439–43.
66. Guillot L, Epaud R, Thouvenin G, Jonard L, Mohsni A, Couderc R, et al. New surfactant protein C gene mutations associated with diffuse lung disease. *J Med Genet.* 2009;46(7):490–4.
67. Thouvenin G, Abou Taam R, Flamein F, Guillot L, Le Bourgeois M, Reix P, et al. Characteristics of disorders associated with genetic mutations of surfactant protein C. *Arch Child.* 2010;95(6):449–54.
68. Peca D, Boldrini R, Johansson J, Shieh JT, Citti A, Petrini S, et al. Clinical and ultrastructural spectrum of diffuse lung disease associated with surfactant protein C mutations. *Eur J Hum Genet EJHG.* 2015 Aug;23(8):1033–41.
69. van Moorsel CH, van Oosterhout MF, Barlo NP, de Jong PA, van der Vis JJ, Ruven HJ, et al. Surfactant protein C mutations are the basis of a significant portion of adult familial pulmonary fibrosis in a dutch cohort. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;182(11):1419–25.
70. Epaud R, Delestrain C, Louha M, Simon S, Fanen P, Tazi A. Combined pulmonary fibrosis and emphysema syndrome associated with ABCA3 mutations. *Eur Respir J.* 2014 Feb;43(2):638–41.
71. Flamein F, Riffault L, Muselet-Charlier C, Pernelle J, Feldmann D, Jonard L, et al. Molecular and cellular characteristics of ABCA3 mutations associated with diffuse parenchymal lung diseases in children. *Hum Mol Genet.* 2012;21(4):765–75.
72. Wambach JA, Wegner DJ, Depass K, Heins H, Druley TE, Mitra RD, et al. Single ABCA3 mutations increase risk for neonatal respiratory distress syndrome. *Pediatrics.* 2012 Dec;130(6):e1575–82.
73. Guillot L, Carre A, Szinnai G, Castanet M, Tron E, Jaubert F, et al. NKX2-1 mutations leading to surfactant protein promoter dysregulation cause interstitial lung disease in “Brain-Lung-Thyroid Syndrome.” *Hum Mutat.* 2010;31(2):E1146–62.
74. Hamvas A, Deterding RR, Wert SE, White FV, Dishop MK, Alfano DN, et al. Heterogeneous pulmonary phenotypes associated with mutations in the thyroid transcription factor gene NKX2-1. *Chest.* 2013 Sep;144(3):794–804.
75. Khubchandani KR, Snyder JM. Surfactant protein A (SP-A): the alveolus and beyond. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2001 Jan;15(1):59–69.
76. Korfhagen TR, Bruno MD, Ross GF, Huelsman KM, Ikegami M, Jobe AH, et al. Altered surfactant function and structure in SP-A gene targeted mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Sep 3;93(18):9594–9.
77. Ochs M, Johnen G, Müller K-M, Wahlers T, Hawgood S, Richter J, et al. Intracellular and intraalveolar localization of surfactant protein A (SP-A) in the parenchymal region of the human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002 Jan;26(1):91–8.
78. Davies J, Turner M, Klein N. The role of the collectin system in pulmonary defence. *Paediatr Respir Rev.* 2001;2(1):70–5.
79. Kishore U, Greenhough TJ, Waters P, Shrive AK, Ghai R, Kamran MF, et al. Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors. *Mol Immunol.* 2006;43(9):1293–315.
80. Sano H, Kuroki Y. The lung collectins, SP-A and SP-D, modulate pulmonary innate immunity. *Mol Immunol.* 2005;42(3):279–87.
81. Goto H, Mitsunashi A, Nishioka Y. Role of surfactant protein A in non-infectious lung diseases. *J Med Invest JMI.* 2014;61(1-2):1–6.
82. Mitsunashi A, Goto H, Kuramoto T, Tabata S, Yukishige S, Abe S, et al. Surfactant protein A suppresses lung cancer progression by regulating the polarization of tumor-associated macrophages. *Am J Pathol.* 2013 May;182(5):1843–53.
83. Willems CHMP, Zimmermann LJI, Kloosterboer N, Kramer BW, van Iwaarden JF. Surfactant protein A binds TGF- β 1 with high affinity and stimulates the TGF- β pathway. *Innate Immun.* 2014 Feb;20(2):192–9.
84. Lin R-L, Zhao L-J. Mechanistic basis and clinical relevance of the role of transforming growth factor- β in cancer. *Cancer Biol Med.* 2015 Dec;12(4):385–93.
85. Hoover RR, Floros J. Organization of the human SP-A and SP-D loci at 10q22-q23. Physical and radiation hybrid mapping reveal gene order and orientation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998;18(3):353–62.

86. Floros J, Wang G, Mikerov AN. Genetic complexity of the human innate host defense molecules, surfactant protein A1 (SP-A1) and SP-A2--impact on function. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2009;19(2):125–37.
87. Haagsman HP, White RT, Schilling J, Lau K, Benson BJ, Golden J, et al. Studies of the structure of lung surfactant protein SP-A. *Am J Physiol.* 1989 Dec;257(6 Pt 1):L421–9.
88. Wang G, Guo X, Diangelo S, Thomas NJ, Floros J. Humanized SFTPA1 and SFTPA2 transgenic mice reveal functional divergence of SP-A1 and SP-A2: formation of tubular myelin in vivo requires both gene products. *J Biol Chem.* 2010;285(16):1198–2010.
89. Voss T, Eistetter H, Schäfer KP, Engel J. Macromolecular organization of natural and recombinant lung surfactant protein SP 28-36. Structural homology with the complement factor C1q. *J Mol Biol.* 1988 May 5;201(1):219–27.
90. McCormack FX, Whitsett JA. The pulmonary collectins, SP-A and SP-D, orchestrate innate immunity in the lung. *J Clin Invest.* 2002 Mar;109(6):707–12.
91. Seifart C, Lin H-M, Seifart U, Plagens A, DiAngelo S, von Wichert P, et al. Rare SP-A alleles and the SP-A1-6A(4) allele associate with risk for lung carcinoma. *Clin Genet.* 2005 Aug;68(2):128–36.
92. Floros J. Human surfactant protein A (SP-A) variants: why so many, why such a complexity? *Swiss Med Wkly.* 2001 Feb 24;131(7-8):87–90.
93. Wang Y, Kuan PJ, Xing C, Cronkhite JT, Torres F, Rosenblatt RL, et al. Genetic defects in surfactant protein A2 are associated with pulmonary fibrosis and lung cancer. *Am J Hum Genet.* 2009;84(1):52–9.
94. Maitra M, Wang Y, Gerard RD, Mendelson CR, Garcia CK. Surfactant protein A2 mutations associated with pulmonary fibrosis lead to protein instability and endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem.* 2010;285(29):22103–13.
95. Maitra M, Cano CA, Garcia CK. Mutant surfactant A2 proteins associated with familial pulmonary fibrosis and lung cancer induce TGF-beta1 secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(51):21064–9.
96. Retraction for Maitra et al., Mutant surfactant A2 proteins associated with familial pulmonary fibrosis and lung cancer induce TGF-β1 secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Sep 15;112(37):E5222.
97. Coghlan MA, Shifren A, Huang HJ, Russell TD, Mitra RD, Zhang Q, et al. Sequencing of idiopathic pulmonary fibrosis-related genes reveals independent single gene associations. *BMJ Open Respir Res.* 2014;1(1):e000057.
98. van Moorsel CHM, Ten Klooster L, van Oosterhout MFM, de Jong PA, Adams H, Wouter van Es H, et al. SFTPA2 Mutations in Familial and Sporadic Idiopathic Interstitial Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015 Nov 15;192(10):1249–52.
99. Carreto-Binaghi LE, Aliouat EM, Taylor ML. Surfactant proteins, SP-A and SP-D, in respiratory fungal infections: their role in the inflammatory response. *Respir Res.* 2016;17(1):66.
100. Lahti M, Lofgren J, Marttila R, Renko M, Klaavuniemi T, Haataja R, et al. Surfactant protein D gene polymorphism associated with severe respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Res.* 2002;51(6):696–9.
101. Sorensen GL, Husby S, Holmskov U. Surfactant protein A and surfactant protein D variation in pulmonary disease. *Immunobiology.* 2007;212(4-5):381–416.
102. Thomas NJ, Fan R, Diangelo S, Hess JC, Floros J. Haplotypes of the surfactant protein genes A and D as susceptibility factors for the development of respiratory distress syndrome. *Acta Paediatr.* 2007;96(7):985–9.
103. Seibold MA, Wise AL, Speer MC, Steele MP, Brown KK, Loyd JE, et al. A common MUC5B promoter polymorphism and pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 2011;364(16):1503–12.
104. Borie R, Crestani B, Dieude P, Nunes H, Allanore Y, Kannengiesser C, et al. The MUC5B variant is associated with idiopathic pulmonary fibrosis but not with systemic sclerosis interstitial lung disease in the European Caucasian population. *PloS One.* 2013;8(8):e70621.
105. Liu Y, Jesus AA, Marrero B, Yang D, Ramsey SE, Montealegre Sanchez GA, et al. Activated STING in a vascular and pulmonary syndrome. *N Engl J Med.* 2014 Aug 7;371(6):507–18.

106. Jeremiah N, Neven B, Gentili M, Callebaut I, Maschalidi S, Stolzenberg M-C, et al. Inherited STING-activating mutation underlies a familial inflammatory syndrome with lupus-like manifestations. *J Clin Invest*. 2014 Dec;124(12):5516–20.
107. Watkin LB, Jessen B, Wiszniewski W, Vece TJ, Jan M, Sha Y, et al. COPA mutations impair ER-Golgi transport and cause hereditary autoimmune-mediated lung disease and arthritis. *Nat Genet*. 2015 Jun;47(6):654–60.
108. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystallogr*. 1993 Apr 1;26(2):283–91.
109. Rullmann JAC. AQUA, Computer Program, Department of NMR Spectroscopy, Bijvoet Center for Biomolecular Research, Utrecht University, The Netherlands. 1996.
110. Nathan N, Giraud V, Picard C, Nunes H, Dastot-Le Moal F, Copin B, et al. Germline SFTPA1 mutation in familial idiopathic interstitial pneumonia and lung cancer. *Hum Mol Genet*. 2016 Jan 19;25(8):1457–67.

11. Annexes

Annexe 1 : Biomarkers in Interstitial lung diseases. Nathan N, Corvol H, Amselem S, Clement A. Paediatr Respir Rev. 2015 Sep;16(4):219-24

Annexe 2 : Respiratory distress, congenital hypothyroidism and hypotonia in a newborn. Jovien S, Borie R, Doummar D, Clement A, Nathan N. Respiration 2016. Accepted for publication.

Annexe 3 : Aligement protéiques des séquences de référence des protéines SP-A1 et SP-A2 et de leurs homologues au cours de l'évolution des espèces.

Annexe 4 : Surfactant protein A: a key player in lung homeostasis. Nathan N, Taytard J, Duquesnoy P, Thouvenin G, Corvol H, Amselem S, Clement A. Int J of Biochem Cell Biol. Under review.

Annexe 5 : Organisation du recrutement des patients

Annexe 6 : Protocoles de PCR et de séquençage utilisés pour les gènes *SFTPA1*, *SFTPA2*, *SFTPD*

Annexe 7 : Communication au congress de l'European Respiratory Society, Amsterdam, septembre 2015 : Genetic testing in idiopathic interstitial pneumonia: Surfactant system involvement in pediatric and adult patients

Annexe 8 : Communication aux Assises de génétique, Lyon, février 2016 (Prix de Poster de la Fédération Française de Génétique Humaine) : Contribution des mutations des gènes impliqués dans le métabolisme du surfactant aux pneumopathies interstitielles diffuses (PID) de l'enfant et de l'adulte dans une cohorte de 265 familles – Identification d'un nouveau gène de PID.

Annexe 9 : Communications au Congrès de l'American Thoracic Society, San Francisco, mai 2016 :

A. Genetic testing in idiopathic interstitial pneumonia. Communication orale

B. *SFTPA1* mutation in familial interstitial pneumonia and cancer. Poster.

**Annexe 1 : Biomarkers in Interstitial lung diseases. Nathan N, Corvol H, Amselem S, Clement A.
Paediatr Respir Rev. 2015 Sep;16(4):219-24**



Contents lists available at ScienceDirect

Paediatric Respiratory Reviews



Mini-symposium: Biomarkers and Phenotype

Biomarkers in Interstitial lung diseases

Nadia Nathan^{1,2}, Harriet Corvol^{1,3}, Serge Amselem^{2,4}, Annick Clement^{1,2,*}

¹Assistance Publique-Hopitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Trousseau, Service de pneumologie pédiatrique; Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie (UPMC) Paris06

²Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMR_S 933; Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie (UPMC) Paris06

³Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMR_S 938; Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie (UPMC) Paris06

⁴Assistance Publique-Hopitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Trousseau, Unité de génétique moléculaire; Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie (UPMC) Paris06

EDUCATIONAL AIMS

The reader will be able to:

- Understand the pathophysiology of interstitial lung diseases (ILD) as may relate to potential biomarkers
- Learn the basis for selection of potential biomarkers, including MMP7, SP-A and SP-D, KL-6, CCL-18, YKL-40 and MUC5B
- Describe what is needed to make one or more of these markers clinically useful for diagnosing or following the progress of ILD.

ARTICLE INFO

Keywords:

Interstitial lung diseases
Biomarkers
Idiopathic pulmonary fibrosis

SUMMARY

Interstitial lung diseases (ILD)s represent a heterogeneous group of rare respiratory disorders, mostly chronic and associated with high morbidity and mortality. They are complex diseases that remain, in children, largely underdiagnosed and difficult to manage. Therefore, identification of biomarkers, which could be used for ILD diagnosis, measurements of disease severity and progression, and responsiveness to treatments, is a major challenge for clinical practice and for translational research. The present review focuses on blood biomarkers and provides an overview on the current information on molecular parameters of interest for ILD patient management.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

INTRODUCTION

Interstitial lung diseases (ILD)s represent a heterogeneous group of respiratory disorders that are mostly chronic and associated with high morbidity and mortality [1]. These diffuse infiltrative lung diseases are characterized by a progressive remodelling of the alveolo-capillary barrier. The clinical presentation includes dyspnoea, a restrictive pattern on pulmonary function testing, and diffuse lung infiltration on chest imaging.

ILDs are rare diseases that can be observed at all ages, from infancy to the elderly. They are, however, more frequently diagnosed in adult patients [2]. In children, information on their global epidemiology remains extremely limited [3]. Extrapolation from small studies has suggested an approximate incidence of 1 case per 100,000 population. However, this estimation is not reliable as paediatric ILDs remain largely underdiagnosed [4]. Nevertheless, common underlying mechanisms are currently being described, supporting the view that tools developed to improve the diagnostic approach and clinical management of ILD should benefit to all patients regardless of age. Based on this understanding, potential disease biomarkers derived mainly from studies performed in adult patients are discussed in this review. Their translation into clinical practice should ultimately benefit all forms of ILD including paediatric diseases.

* Corresponding author. Pneumologie Pédiatrique, Hôpital Armand Trousseau, 26 avenue du Dr Arnold Netter, 75012 Paris-France. Tel.: +33144736668.
E-mail address: annick.clement@trs.aphp.fr (A. Clement).

ILD PATHOPHYSIOLOGY: CURRENT UNDERSTANDING FOR BIOMARKER DEVELOPMENT

ILDs display a wide range of phenotypic expression that is influenced by age of onset and instigating factors. However, in all situations, disease progression shares the common features of lung remodelling. Based on numerous experimental studies and human tissue analysis, the working concept of ILD pathogenesis highlights the central role of alveolar epithelial cells and fibroblast aberrant activation [5–7].

Repeated injuries of “vulnerable” alveolar epithelial cells and the failure of the alveoli to correctly respond to injury lead to aberrant lung repair and progressive fibrosis. The current understanding of ILD pathophysiology suggests a multiple hit model, with genetic and non-genetic insults contributing to increase the vulnerability of alveolar epithelial cells to repeated injuries [8]. This scenario is associated with changes in cellular phenotype and function. Important consequences include modification of the crosstalk between alveolar epithelial cells and mesenchymal cells as well as induction of epithelial mesenchymal transition. The transformation of epithelial cells acquiring phenotypic and functional characteristics of fibroblasts contributes to an exaggerated production of collagen and extra cellular matrix components. An acceleration of the aging process that could impact on progenitor cells leading to stem cell exhaustion is also suggested [9].

Complex underlying mechanisms are involved, with increasing evidence for an important role of endoplasmic reticulum (ER) stress [10]. ER stress occurs in situations associated with accumulation of misfolded proteins in the ER and activation of the unfolded protein response. When the load of altered proteins is excessive, the resulting ER stress can lead to alveolar epithelial cell death through apoptosis. Among factors causing ER stress are abnormal Surfactant Proteins (SP), viruses, tobacco smoke and oxidants [11]. Recent studies have demonstrated that mutant SP-C proteins could colocalise in the ER, and that a significant increase in ER-stress reaction was observed in cells expressing mutated SP-C. This understanding explains the novel interest for anti-ER stress therapeutic strategies in lung fibrosis [12].

The nature of inciting injury and subsequent alveolar epithelium dysfunction includes genetic and epigenetic factors as well as environmental and host co-morbidity components [13]. All together these contributors affect disease expression and progression. From a number of reports, there is emerging evidence that the development of all forms of ILD is, at least in part, determined by genetic factors. In children, mutations are mainly reported in the genes encoding SP-C and SP-B [14,15]. Other surfactant system defects include mutations in the genes encoding the thyroid transcription factor 1 and the member A3 of the ATP-binding cassette family of transporters [16,17]. Mutations in genes implicated in DNA repair and telomere functions, including genes encoding the telomerase RNA component and the telomerase reverse transcriptase, have been described in patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) [18]. In addition to genetic causes, there is compelling evidence that factors from the environment influence disease expression and progression. Current knowledge points out the role of tobacco smoke, exposure to aero contaminants, and viruses. Of interest, several studies have showed the presence of various virus proteins in lung tissues from patients with ILD and lung fibrosis, with an expression localized to alveolar epithelial cells.

BIOMARKERS OF LUNG PARENCHYMA DYSFUNCTION

A large variety of respiratory disease markers has been examined including chest imaging, lung function tests, and specific tissue and molecular components. Currently, much effort is

devoted to the qualification and validation of biologically relevant molecular biomarkers [19,20]. A number of approaches have been used from ‘omic’ studies to candidate molecule analysis of lung tissues, bronchoalveolar lavage (BAL) fluids, and blood samples [21–23]. These approaches have identified several types of biomarkers with the potential to predict lung disease progression and prognosis [24,25]. The most studied components, which are listed below, include molecules implicated in matrix formation and remodelling, alveolar epithelium metabolism and immune processes. In addition, novel findings provide support for the consideration of a role for mucociliary clearance molecules.

Remodelling molecules

A number of molecules have been described including Matrix Metallo Proteinase (MMP)s, which appear of particular importance for lung parenchymal homeostasis. MMPs belong to a family of zinc-dependent proteases that cleave the extracellular matrix and cell-surface proteins to regulate wound repair and a number of immune and inflammatory processes [26]. MMP production and activity are up-regulated during healing or remodeling. MMP7 (matrilysin) is the smallest of the known MMPs. Unlike many other MMPs that are highly expressed in the stroma, MMP7 is expressed in epithelial cells [27,28]. Following Injury, MMP7 synthesis is rapidly induced. An important proposed role for MMP7 is to facilitate the migration component of the re-epithelialization program, a complex process involving multiple interactions between the cell and the matrix. In MMP7-deficient mice, re-epithelialization and neutrophil recruitment into the alveolar space are almost completely abrogated, demonstrating the major role of MMP7 in the healing cascade of the lung. Increased expression of MMP7 is observed in hyperplastic epithelial cells, and elevated blood levels have been documented in various forms of diffuse parenchymal lung diseases.

Alveolar epithelium functional molecules

Among the molecules of interest are the surfactant proteins (SP), and mainly the hydrophilic proteins SP-A and SP-D. These factors are predominantly produced by alveolar type 2 epithelial cells [29]. They are members of the collectin family of C-type lectins, with an amino-terminal collagen-like region and a carboxy-terminal carbohydrate recognition domain (CRD). The CRD domains are adapted to bind essential carbohydrate and lipid antigens present on the surface of microorganisms. They modulate the uptake of infectious agents by phagocytic cells as well as both the inflammatory and the adaptive immune response. SP-A also facilitates the surface tension-lowering properties of surfactant phospholipids and plays an active role in the re-epithelialisation processes of the alveolar surface. Indeed, recent studies have provided evidence that SP-A binds Transforming Growth Factor (TGF)- β 1 with high affinity and stimulates the TGF- β 1 pathway [30,31]. In situations of parenchymal injury and alveolitis, increased levels of SP-A and SP-D have been reported in the BAL and serum of patients [32–34].

KL (Krebs von den Lungen)-6, classified as a submolecule of MUC1, is a candidate molecule of alveolar epithelium homeostasis. It was initially suggested as a serum tumour biomarker for lung, breast and pancreatic cancers. It was then recognized and approved as a serum biomarker for ILD in Japan [35,36]. It is a high-molecular-weight glycoprotein with an extracellular domain, and is expressed on the surface of various types of epithelial cells [37]. In the lung, it is moderately expressed by alveolar type 2 epithelial cells in control conditions. Its expression dramatically increases in regenerating cells in tissue sections from ILD patients and is associated with high KL-6 levels in the serum [38,39]. The

current view is that KL-6 is a key component of the intra-alveolar fibrotic process, but its precise function remains unknown.

Immune response components

A number of pathways are implicated in the immune response. Among the most studied molecules that could be considered as ILD biomarkers of interest are CC-chemokine ligand (CCL)-18 and YKL-40.

CCL-18, known as PARC (Pulmonary and Activation-Regulated Chemokine), is a 7-kD protein [40]. It is constitutively expressed at high levels in the lung, mainly by alveolar macrophages and dendritic cells. Several reports have shown that it could also be produced by peripheral blood monocytes and tissue macrophages, but to a much lesser degree. CCL-18 is involved in the remodelling process by selectively attracting profibrotic T cells to the lung. In addition, CCL-18 can act directly on pulmonary fibroblasts to stimulate collagen production [41]. Increased levels of CCL-18 have been reported in the lung of patients with various forms of pulmonary fibrotic diseases [42].

YKL-40, also named chitinase 3-like (CHI3L) protein, is a member of the glycosyl hydrolase family 18, and has a carbohydrate-binding groove that can bind oligosaccharides [43]. YKL-40 is produced by a variety of cells including macrophages, neutrophils, fibroblasts, epithelial cells, and endothelial cells. Its expression is up-regulated in inflamed tissue in many organs, as well as in a variety of solid tumours. The role of YKL-40 is not clear. It has been reported to stimulate fibroblast growth, induce proliferation and differentiation of cancer cells, promote adhesion and migration of vascular endothelial cells, and increase proteoglycan synthesis. Its receptor is not known, but the fact that it is a released protein suggests that it probably acts on cellular components in an autocrine/paracrine manner. Elevated blood levels of YKL-40 have been reported in patients with chronic inflammatory and fibrotic disorders of various organs, including the lung, supporting the view that it may serve as a biomarker of disease severity and prognosis [44].

Molecules of the distal airways homeostasis

MUC5B, a member of a family of glycoproteins, is a major gel-forming mucin in the respiratory tract [45]. It plays an essential role in the mucociliary clearance process that controls bacterial infection. The quantity of intracellular mucin in airway epithelial cells results from the balance between mucin production, clearance and secretion. This balance is tightly controlled by MUC5AC and MUC5B. Expression of both of these molecules can be altered by several inflammatory factors. The recent interest for MUC5B in ILD pathophysiology started with the identification, by a large genome-wide linkage study of IPF patients, of a common polymorphism in the promoter of *MUC5B* that was associated with a high risk of disease and an increased MUC5B production [46]. The proposed mechanism linking lung fibrosis and MUC5B was that accumulation of mucus with a MUC5B-skewed mucin profile may favor occlusion of the upstream airways, with consequently further damage to the downstream lung parenchyma. In addition, alterations in MUC5B expression may impair the processes of cell proliferation and differentiation, as well as the immune response [47].

BIOMARKERS IN ILD: CLINICAL RESEARCH STUDIES

In most of the reports on ILD biomarkers, the study populations have included adult patients with sporadic or familial IPF, their family members, and high-risk individuals with genetic variations known to be associated with the disease. Of importance, the need

for biomarker measurements to be reproducible and technically simple and accurate has largely favored the use of peripheral blood-based tests. Results of clinical studies on blood ILD biomarkers are summarized in this section.

MMP7

The study reported by Rosas and coworkers compared the blood levels of a panel of proteins in patients with IPF and in the control individuals [48]. They could observe a combined signature of five proteins including MMP7, MMP1 and MMP8 that was sufficient to differentiate the study populations. They documented an increase in MMP7 and MMP1 in lung tissue and bronchoalveolar lavage fluid obtained from IPF patients. In addition, they reported that the elevated MMP7 levels were negatively correlated with percent predicted forced vital capacity (FVC) and percent predicted carbon monoxide diffusing capacity. Similar findings were reported by Song and coworkers in a cohort of 118 IPF patients [49]. They observed that MMP-7 and also SP-A were significant predictors of survival along with age, FVC, and abnormalities on high resolution computed tomographic (HRCT) scans. Also, patients with high levels of both MMP-7 and SP-A had shorter survival. These studies suggest that MMP7 may serve as a biomarker of disease activity and prognosis. This is further sustained by the study of 95 proteins in the serum samples of 241 IPF patients. Among the proteins detectable in the plasma, 5 were significantly associated with mortality and/or disease progression: MMP-7, interleukin (IL)-8, intercellular adhesion molecule, vascular adhesion molecule, and S100A12 (a S100 protein similar to calprotectin) [50]. Of interest, low MMP-7 concentrations defined a group of patients with long median survival whereas patients with high MMP-7 levels had a significantly shorter survival. Recently, Kropski and coworkers initiated an ongoing cohort study of at-risk individuals for developing IPF [51]. They included 75 asymptomatic first-degree relatives of IPF patients. They observed HRCT scan interstitial abnormalities in 14% of them. In addition, the blood levels of MMP7 and SP-D were significantly increased in "at-risk" subjects compared to controls, and correlated with abnormal HRCT scans. These first results of the ongoing cohort indicate the existence of presymptomatic abnormalities that may predict progression to clinical disease. The current level of information on MMP7 has led to the use of changes in blood MMP7 as a primary efficacy outcome in the design of a novel clinical trial in IPF.

SP-A and SP-D

In recent years, several reports have showed that SP-A and SP-D, alone or in combination, may be useful predictors of disease outcome in patients with IPF. In the study conducted by Takakashi and coworkers, the serum levels of SP-A and SP-D were analyzed in a population of 52 IPF patients [52]. Both SP-A and SP-D concentrations were found to correlate with the extent of alveolitis, higher levels being observed in patients with a fatal outcome within 3 years. In addition, the levels of SP-D followed the rate of deterioration of pulmonary function. The authors concluded that SP-D may be a good predictive indicator of disease progression and that a combination of SP-A and SP-D measurements may serve as biomarkers for disease outcome. This was further confirmed in a cohort of 142 patients, for whom SP-A and SP-D levels were found to be highly predictive of survival [33]. Discussion of the mechanisms underlying an increase in blood SP-A and SP-D suggests that it may result from both elevated production by hyperplastic alveolar cells, and/or a leak towards the vascular compartment due to epithelial injury. In the study of Song and coworkers, SP-A or SP-D alone were not predictors of mortality, but the association of SP-A with MMP-7 provided additive predictive

Please cite this article in press as: Nathan N, et al. Biomarkers in Interstitial lung diseases. Paediatr. Respir. Rev. (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.prrv.2015.05.002>

value for prognosis [49]. In the ongoing IPF cohort, the levels of SP-D were found to be increased in "at-risk" patients, but the levels of SP-A were not reported [51].

KL-6

Abnormally high levels of KL-6 were first documented in the blood of ILD patients by Kohno and coworkers [36]. In addition, serum levels of KL-6 were found to correlate with the levels documented in the BAL fluid, allowing the use of blood KL-6 in clinical practice. Ohnishi and coworkers analyzed blood KL-6 levels in 33 ILD patients, 12 patients with bacterial pneumonia and 70 healthy volunteers [53]. High levels of KL-6 as well as SP-A and SP-D were documented in ILD patients. The levels of SP-A and SP-D, but not of KL-6, were significantly higher in patients with bacterial pneumonia than in healthy volunteers, leading the authors to suggest that KL-6 may be the best serum marker for ILD. Elevated KL-6 levels were also found to be associated with an increased risk for subsequent mortality [54]. However, most of the conclusions of these reports have been limited by the cohort size and the absence of replication. In a largest study performed by Song and coworkers, results indicated that KL-6 was not among the biomarkers that were significantly independent predictors for mortality [49].

CCL-18 and YKL-40

Increased expression of CCL-18 in the context of lung fibrosis was first documented in alveolar macrophages. Further studies indicated elevated CCL-18 levels in the BAL fluid from patients with ILD that correlated with pulmonary function test impairment and serum levels [42]. The value of blood CCL-18 concentrations was then tested in a cohort of 72 patients with IPF [55]. Results indicated a significantly higher incidence of disease progression and mortality in patients with high serum CCL18, suggesting that CCL-18 may be a useful tool in the clinical management of patients with IPF.

Following the observations of an increased expression of YKL-40 in the serum and lungs of patients with IPF, and of genetic variations in *CHI3L1* gene in various inflammatory diseases, Korthagen and coworkers analyzed the *CHI3L1* genotype, the BAL fluid and blood YKL-40 levels in a cohort of IPF patients [56]. They reported that the -329A/G polymorphism was associated with high YKL-40 levels in both the lung and the serum. In addition, higher expression of YKL-40 was linked to a poor survival in IPF patients.

MUC5B

In the first report of a common polymorphism in the *MUC5B* promoter associated with IPF, a 20-fold increased risk of disease was found in subjects homozygous for the polymorphism and a

7-fold increased risk in heterozygous subjects [46]. The *MUC5B* polymorphism rs35705950 was documented in 34–38% of IPF subjects (in both familial and sporadic cases) compared to 9% of controls. This observation was further reported in an independent group of patients. Recently, large genome-wide case-control association studies confirmed the association of the common *MUC5B* variant with IPF [57]. Of interest, this variant was not found to be associated with other forms of ILD, such as sarcoidosis or rheumatologic conditions associated with pulmonary fibrosis, suggesting that it would be a risk factor for the development of IPF [58]. Puzzling results were also reported indicating that this polymorphism was associated with a decreased mortality of a patient with IPF [59]. It is likely that IPF patients with the *MUC5B* promoter polymorphism display a significantly higher predisposition to disease and, at the same time, a survival advantage. One possible explanation may be that the increased *MUC5B* production could enhance mucosal host defenses and reduce infectious complications, with a possible beneficial influence on repair processes.

BIOMARKERS IN ILD: TRANSLATION INTO CLINICAL PRACTICE

ILD and lung fibrosis are caused by repeated subclinical injuries of a "susceptible" lung parenchyma. Consequently, phenotypic manifestations progress from onset of symptoms and mild disease to severe respiratory impairment precipitated by acute exacerbations (Figure 1). Based on this current understanding, relevant biomarkers should include molecules that will help the physician predicting disease progression and designing clinical trials. As discussed above, numerous research studies for the identification of biomarkers in ILD and IPF have been performed so far. Despite insufficient evidence to validate their translation into clinical practice, recent developments provide perspective for some of these molecules to serve as markers for disease susceptibility, activity and prognosis.

Biomarkers for disease susceptibility: In addition to genetic defects causing ILD, with diagnostic value (such as mutations in genes encoding surfactant system molecules), more common variants leading to a "susceptible" lung can be investigated. As indicated above, polymorphisms in *MUC5B* could serve as susceptibility marker in specific forms of ILD.

Biomarkers for disease activity and prognosis: Among the blood proteins discussed in the previous sections, MMP7 seems to be the biomarker of interest for measurements of disease severity and/or progression. Indeed, the current level of information on MMP7 has led to the use of changes in blood MMP7 as a primary efficacy outcome in the design of novel clinical trials in IPF. The serum levels of SP-A and SP-D may provide additional information on disease outcome. Analysis of plasma biomarker profiles in acute exacerbations has suggested potential interest of several factors

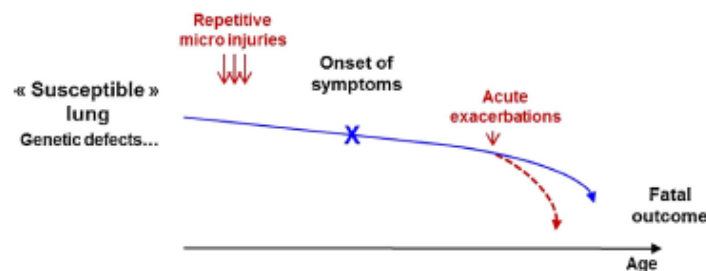


Figure 1. Current understanding of ILD pathophysiology

Repeated subclinical injuries of a "susceptible" lung parenchyma lead to disease development. Phenotypic manifestations progress from onset of symptoms and mild disease to severe respiratory impairment precipitated by acute exacerbations.

Please cite this article in press as: Nathan N, et al. Biomarkers in Interstitial lung diseases. Paediatr. Respir. Rev. (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.prrv.2015.05.002>

including SP-A, SP-D, KL-6 and IL-6. This needs to be further investigated.

CONCLUSION

Identification of biomarkers, which could be used for diagnosis, measurements of disease severity and progression, and responsiveness to treatments, is a major challenge in the ILD field for both paediatric and adult patients. In the coming years, the rapidly evolving field of biotechnologies will certainly allow us to discover a number of novel biomarkers. A critical issue will be the validation and translation of these findings into patient care, and this will require investigations in populations of individuals with very careful and longitudinal phenotyping.

FUTURE RESEARCH DIRECTIONS

- Develop new technologies to identify novel biomarkers from ILD patients
- Plan longitudinal studies that include careful and prospective phenotyping of the diseases
- Examine the potential for panels of biomarkers to provide information on therapy/prognosis

SUPPORT STATEMENT

This work was supported by Sorbonne Universités, Chancellerie des Universités Legs Poix grants 2013 n°1305 and 2014 n°1405, and the European Union's Seventh Framework Program (FP7-CHILD-EU 2007-2013) under grant agreement n°305653.

Acknowledgments

The authors want to thank the patient association "Respirer C'est Grandir" for its everyday support in patient care and research in rare lung diseases.

References

[1] Antoniou KM, Margaritopoulos GA, Tomassetti S, Bonella F, Costabel U, Poletti V. Interstitial lung disease. *Eur Respir Rev Off J Eur Respir Soc* 2014 Mar 1;23(131):40-54.

[2] Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med* 2011 Mar 15;183(6):788-824.

[3] Kurland G, Deterding RR, Hagood JS, Young LR, Brody AS, Castile RG, et al. An official American Thoracic Society clinical practice guideline: classification, evaluation, and management of childhood interstitial lung disease in infancy. *Am J Respir Crit Care Med* 2013 Aug 1;188(3):376-94.

[4] Clement A, Nathan N, Epaud R, Fauroux B, Corvol H. Interstitial lung diseases in children. *Orphanet J Rare Dis* 2010;5:22.

[5] Camelo A, Dunmore R, Sleeman MA, Clarke DL. The epithelium in idiopathic pulmonary fibrosis: breaking the barrier. *Front Pharmacol* 2014 Jan 10;4:173.

[6] Wuyts WA, Dooms C, Verleden GM. The clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2013 Apr 1;187(7):777.

[7] Guillot L, Nathan N, Tabary O, Thouvenin G, Le Rouzic P, Corvol H, et al. Alveolar epithelial cells: master regulators of lung homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol* 2013 Nov;45(11):2568-73.

[8] Steele MP, Schwartz DA. Molecular mechanisms in progressive idiopathic pulmonary fibrosis. *Annu Rev Med* 2013;64:265-76.

[9] Wolters PJ, Collard HR, Jones KD. Pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Annu Rev Pathol* 2014;9:157-79.

[10] Günther A, Korfei M, Mahavadi P, von der Beck D, Ruppert C, Markart P. Unravelling the progressive pathophysiology of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir Rev Off J Eur Respir Soc* 2012 Jun 1;21(124):152-60.

[11] Tanjore H, Blackwell TS, Lawson WE. Emerging evidence for endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012 Apr 15;302(8):L721-9.

[12] Ono M, Ohkouchi S, Kanehira M, Tode N, Kobayashi M, Ebina M, et al. Mesenchymal Stem Cells Correct Inappropriate Epithelial-mesenchyme Relation in Pulmonary Fibrosis Using Stanniocalcin-1. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther* 2014 Nov 6.

[13] Kropaki JA, Lawson WE, Young LR, Blackwell TS. Genetic studies provide clues on the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Dis Model Mech* 2013 Jan;6(1):9-17.

[14] Avital A, Hevroni A, Godfrey S, Cohen S, Maayan C, Nusair S, et al. Natural history of five children with surfactant protein C mutations and interstitial lung disease. *Pediatr Pulmonol* 2014 Nov;49(11):1097-105.

[15] Turcu S, Ashton E, Jenkins L, Gupta A, Mok Q. Genetic testing in children with surfactant dysfunction. *Arch Dis Child* 2013 Jul;98(7):490-5.

[16] Flamein F, Riffault L, Muselet-Charlier C, Pernelle J, Feldmann D, Jonard L, et al. Molecular and cellular characteristics of ABCA3 mutations associated with diffuse parenchymal lung diseases in children. *Hum Mol Genet* 2012;21(4):765-75.

[17] Warmbach JA, Casey AM, Fishman MP, Wegner DJ, Wert SE, Cole FS, et al. Genotype-phenotype correlations for infants and children with ABCA3 deficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 2014 Jun 15;189(12):1538-43.

[18] Gansner JM, Rosas IO. Telomeres in lung disease. *Transl Res J Lab Clin Med* 2013 Dec;162(6):343-52.

[19] Blackwell TS, Tager AM, Borok Z, Moore BB, Schwartz DA, Anstrom KJ, et al. Future directions in idiopathic pulmonary fibrosis research. An NHLBI workshop report. *Am J Respir Crit Care Med* 2014 Jan 15;189(2):214-22.

[20] Herazo-Maya JD, Kaminski N. Personalized medicine: applying "omics" to lung fibrosis. *Biomark Med* 2012 Aug;6(4):529-40.

[21] Foster MW, Morrison LD, Todd JL, Snyder LD, Thompson JW, Soderblom EJ, et al. Quantitative proteomics of bronchoalveolar lavage fluid in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Proteome Res* 2015 Feb 6;14(2):1238-49.

[22] Maher TM. PROFILING idiopathic pulmonary fibrosis: rethinking biomarker discovery. *Eur Respir Rev Off J Eur Respir Soc* 2013 Jun 1;22(128):148-52.

[23] Maher TM. Beyond the diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis: the growing role of systems biology and stratified medicine. *Curr Opin Pulm Med* 2013 Sep;19(5):460-5.

[24] Crookson WOC, Moffatt MF. Bedside to gene and back in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2013 Jun 6;368(23):2228-30.

[25] Zhang Y, Kaminski N. Biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 2012 Sep;18(5):441-6.

[26] Parks WC, Wilson CL, López-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2004 Aug;4(8):617-29.

[27] Gharib SA, Altemeier WA, Van Winkle LS, Plopper CG, Schlesinger SY, Buell CA, et al. Matrix metalloproteinase-7 coordinates airway epithelial injury response and differentiation of gliated cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013 Mar;48(3):390-6.

[28] Pardo A, Selman M. Role of matrix metalloproteinases in idiopathic pulmonary fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012; 5(Suppl 1 Proceedings of Fibroproliferative disorders: from biochemical analysis to targeted therapies Petro E Petrides and David Brenner):S9.

[29] Hasenberg M, Stegemann-Korniszewski S, Gurzer M. Cellular immune reactions in the lung. *Immunol Rev* 2013 Jan;251(1):189-214.

[30] Mukherjee S, Giamberardino C, Thomas JM, Gowdy K, Pastva AM, Wright JR. Surfactant protein A modulates induction of regulatory T cells via TGF-β. *J Immunol Baltim Md* 1950 2012 May 1;188(9):4376-84.

[31] Willems CHMP, Zimmermann LJI, Kloosterboer N, Kramer BW, van Hwaarden JF. Surfactant protein A binds TGF-β1 with high affinity and stimulates the TGF-β pathway. *Innate Immun* 2014 Feb;20(2):192-9.

[32] Barlo NP, van Moersel CHM, Ruven HJT, Zanen P, van den Bosch JMM, Grutters JC. Surfactant protein-D predicts survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis Off J WASOG World Assoc Sarcoidosis Granulomatous Disord* 2009 Jul;24(2):155-61.

[33] Greene KE, King TE, Kurold Y, Bucher-Bartelson B, Hunninghake GW, Newman IS, et al. Serum surfactant proteins-A and -D as biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2002 Mar;19(3):439-46.

[34] Kinder BW, Brown KK, McCormack FX, Jr JH, Kervitsky A, Schwarz MI, et al. Serum surfactant protein-A is a strong predictor of early mortality in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 2009;135(6):1557-63.

[35] Hirasawa Y, Kohno N, Yokoyama A, Inoue Y, Abe M, Hiwada K. KL-6, a human MUC1 mucin, is chemotactic for human fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997 Oct;17(4):501-7.

[36] Kohno N, Kyoizumi S, Awaya Y, Fukuhara H, Yamakido M, Akiyama M. New serum indicator of interstitial pneumonitis activity. Sialylated carbohydrate antigen KL-6. *Chest* 1989 Jul;96(1):68-73.

[37] Janssen R, Kruit A, Grutters JC, Ruven HJ, Gerritsen WB, van den Bosch JM. The mucin-1 568 adenosine to guanine polymorphism influences serum Krebs von den Lungen-6 levels. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006 Apr;34(4):496-9.

[38] Huang H, Peng X, Nakajima J. Advances in the study of biomarkers of idiopathic pulmonary fibrosis in Japan. *Biosci Trends* 2013 Aug;7(4):172-7.

[39] Ishikawa N, Hattori N, Yokoyama A, Kohno N. Utility of KL-6/MUC1 in the clinical management of interstitial lung diseases. *Respir Investig* 2012 Mar;50(1):3-13.

[40] Schutyser E, Richmond A, Van Damme J. Involvement of CC chemokine ligand 18 (CCL18) in normal and pathological processes. *J Leukoc Biol* 2005 Jul;78(1):14-26.

[41] Prasse A, Pechkovsky DV, Toews GB, Jungraithmayr W, Kollert F, Goldmann T, et al. A vicious circle of alveolar macrophages and fibroblasts perpetuates pulmonary fibrosis via CCL18. *Am J Respir Crit Care Med* 2006 Apr 1;173(7):781-92.

[42] Prasse A, Pechkovsky DV, Toews GB, Schäfer M, Eggeling S, Ludwig C, et al. CCL18 as an indicator of pulmonary fibrotic activity in idiopathic interstitial pneumonias and systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2007 May;56(5):1685-93.

Please cite this article in press as: Nathan N, et al. Biomarkers in Interstitial lung diseases. *Paediatr. Respir. Rev.* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.prrv.2015.05.002>

- [43] Johansen JS. Studies on serum YKL-40 as a biomarker in diseases with inflammation, tissue remodeling, fibrosis and cancer. *Dan Med Bull* 2006 May;53(2):172-209.
- [44] Lee CG, Dela Cruz CS, Herzog E, Rosenberg SM, Alangari F, Elias JA. YKL-40, a chitinase-like protein at the intersection of inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2012 Apr 1;185(7):692-4.
- [45] Roy MG, Livraghi-Butrici A, Fletcher AA, McElwee MM, Evans SE, Boerner RM, et al. Muc5b is required for airway defence. *Nature* 2014 Jan 16;505(7483):412-6.
- [46] Seibold MA, Wise AL, Speer MC, Steele MP, Brown KK, Loyd JE, et al. A common MUC5B promoter polymorphism and pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2011;364(16):1503-12.
- [47] Seibold MA, Smith RW, Urbanek C, Groshong SD, Cosgrove GP, Brown KK, et al. The idiopathic pulmonary fibrosis honeycomb cyst contains a mucociliary pseudostratified epithelium. *PLoS One* 2013;8(3):e58658.
- [48] Rosas JO, Richards TJ, Korishi K, Zhang Y, Gibson K, Lokshin AE, et al. MMP1 and MMP7 as potential peripheral blood biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS Med* 2008 Apr 29;5(4):e93.
- [49] Song JW, Do KH, Jang SJ, Galby TV, Han S, Kim DS. Blood biomarkers MMP-7 and SP-A: predictors of outcome in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 2013 May;143(5):1422-9.
- [50] Richards TJ, Kaminski N, Baribaud F, Flavin S, Brodmerkel C, Horowitz D, et al. Peripheral blood proteins predict mortality in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2012 Jan 1;185(1):67-76.
- [51] Kropski JA, Pritchett JM, Zax DF, Crossno PF, Markin C, Garnett ET, et al. Extensive Phenotyping of Individuals At-risk for Familial Interstitial Pneumonia Reveals Clues to the Pathogenesis of Interstitial Lung Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2014 Nov 12.
- [52] Takahashi H, Fujishima T, Koba H, Murakami S, Kurokawa K, Shibuya Y, et al. Serum surfactant proteins A and D as prognostic factors in idiopathic pulmonary fibrosis and their relationship to disease extent. *Am J Respir Crit Care Med* 2000 Sep;162(3 Pt 1):1109-14.
- [53] Ohnishi H, Yokoyama A, Kondo K, Hamada H, Abe M, Nishimura K, et al. Comparative study of KL-6, surfactant protein-A, surfactant protein-D, and monocyte chemoattractant protein-1 as serum markers for interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2002 Feb 1;165(3):378-81.
- [54] Satoh H, Kurishima K, Ishikawa H, Ohtsuka M. Increased levels of KL-6 and subsequent mortality in patients with interstitial lung diseases. *J Intern Med* 2006 Nov;260(5):429-34.
- [55] Prasse A, Probst C, Bargagli E, Zissel G, Toews GB, Flaherty KR, et al. Serum CC-chemokine ligand 18 concentration predicts outcome in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2009 Apr 15;179(8):717-23.
- [56] Korthagen NM, van Moorsel CHM, Barlo NP, Ruven HJT, Kruit A, Heron M, et al. Serum and BALF YKL-40 levels are predictors of survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med* 2011 Jan;105(1):106-13.
- [57] Fingerlin TE, Murphy E, Zhang W, Peljto AL, Brown KK, Steele MP, et al. Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for pulmonary fibrosis. *Nat Genet* 2013;45(6):613-20.
- [58] Stock CJ, Sato H, Fonseca C, Banya WAS, Molyneaux PL, Adamali H, et al. Mucin 5B promoter polymorphism is associated with idiopathic pulmonary fibrosis but not with development of lung fibrosis in systemic sclerosis or sarcoidosis. *Thorax* 2013 May;68(5):436-41.
- [59] Peljto AL, Zhang Y, Fingerlin TE, Ma S-F, Garcia JGN, Richards TJ, et al. Association between the MUC5B promoter polymorphism and survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *JAMA J Am Med Assoc* 2013 Jun 5;309(21):2232-9.

Annexe 2 : Respiratory distress, congenital hypothyroidism and hypotonia in a newborn. Jovien S, Borie R, Doummar D, Clement A, Nathan N. Respiration 2016. Accepted for publication in Respiration.

Respiratory distress, congenital hypothyroidism and hypotonia in a newborn

Sophie Jovien^a, Raphaël Borie^b, Diane Doummar^c, Annick Clement^{a,d}, Nadia Nathan^{a,d}

Affiliations:

^aService de Pneumologie Pédiatrique, Hôpital Armand Trousseau, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Centre national de référence des maladies respiratoires rares RespiRare, Paris 75012, France

^bService de Pneumologie A, Hôpital Bichat, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Centre de compétence des maladies pulmonaires rares; Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité; DHU FIRE, Paris 75018, France

^cService de Neurologie Pédiatrique, Hôpital Armand Trousseau, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris 75012, France

^dInserm UMRS933, Université Pierre et Marie Curie (Paris 6), Sorbonne Universités, Paris 75012, France

Correspondence to:

Dr Nadia Nathan,
Service de Pneumologie Pédiatrique,
Hôpital Armand Trousseau,
26 avenue du Dr Arnold Netter, 75012, Paris, France.

E.mail: nadia.nathan@aphp.fr

[Tel : + 33 \(1\) 44 73 66 68](tel:+33144736668)

[Fax : +33 \(1\) 44 73 67 18](tel:+33144736718)

Short title: Familial *NKX2-1* mutation

Conflict of interest statement: The authors declare they have no conflict of interest.

Author contributions:

SJ collected the patients' data and wrote the manuscript. RB and DD wrote the adult and neurologic part of the clinical description, AC and NN reviewed the manuscript.

Financial/nonfinancial disclosures: The authors declared nonfinancial disclosures

Key words: *NKX2-1*, *TTF1*, interstitial lung disease, benign hereditary chorea, hypothyroidism

Abbreviations:

ILD: interstitial lung disease

NIV: non-invasive ventilation

HRCT: high resolution computed tomography

Patient consent: The authors confirm they obtained written informed permission from the adult patient and from the child's guardian for publication in Respiration journal.

Case report

A male infant was full term born, and eutrophic at birth. On day 6, he developed a severe respiratory distress that required non-invasive ventilation (NIV) support and oxygen therapy. Clinical examination reported an axial hypotonia, a congenital myxoedema, a cutaneous jaundice, large fontanels, and a mild macroglossia. The diagnosis of hypothyroidism was confirmed by the neonatal systematic screening results, with an absence of thyroid tissue. Chest high resolution computed tomography (HRCT) scan showed diffuse alveolar and interstitial opacities (**fig 1, panel A**).

The child was supplemented with L-thyroxin. NIV could be stopped after a few days, but he remained hypoxic with a 73 mmHg PaO₂ under 1 L/min oxygen supplementation. At age 3 months, oral long term azithromycin was started followed by intravenous monthly corticosteroid pulses (300mg/m²/day for three days) and oral corticosteroids [1]. At age 10 months, his clinical evaluation was stable. The HRCT scan showed a diffuse increase of the ground glass attenuations. Oral hydroxychloroquin was added but had to be stopped after 4 months because of neutropenia. Progressively, under corticosteroid pulses and azithromycin, his respiratory status improved and at age 2, oxygen therapy was discontinued. His neurological evaluation documented an important motor and speech delay with hypotonia and choreic movements.

His mother, aged 26, reported a medical history of abnormal movements since the age of 5 years, and chronic cough during childhood, with no proven aetiology. Her clinical evaluation documented a benign hereditary chorea appearing in infancy, which improved up to early adulthood and evolved to myoclonus. She presented a compensated hypothyroidism.

Surprisingly, despite absence of complaints, respiratory investigations revealed a stage II NYHA dyspnoea, hypoxemia with a 57 mmHg PaO₂, and a severe restrictive pattern with diffusion impairment on the lung function tests. HRCT scan showed diffuse ground glass attenuations, sub-pleural cysts and mild lung fibrosis (**fig 1, panel B**). A left to right spontaneous massive shunt through patent *foramen ovale* was discovered. After percutaneous closure, her respiratory condition improved partially. She was put under azithromycin treatment for 3 months, then continuous oral corticosteroid for only one month without any objective improvement. The treatment was recently replaced by hydroxychloroquin.

What is your diagnosis?

Diagnosis: familial “brain-lung-thyroid syndrome” related to a *NKX2-1* mutation

Surfactant protein disorders were suspected and analysis of NK2 Homeobox 1 gene (*NKX2-1*, OMIM 610978), also known as Thyroid-Transcription Factor 1 (*TTF1*), revealed the presence of a novel splicing mutation: c.373+2T>C, NM_003317.3. Following the identification of the *NKX2-1* mutation in the baby, a familial screening was proposed, which led to the identification of the *NKX2-1* c.373+2T>C novel mutation in the mother (**Fig 2**).

NKX2-1 (NM_003317.3) heterozygous mutations have been associated with “brain-lung-thyroid syndrome” with variable degrees of interstitial lung disease (ILD), thyroid dysfunction (hypothyroidism) and neurologic abnormalities (hypotonia and benign chorea) [2–7].

This family well illustrates the large phenotype variability of the disease. Whereas the lung disease started early in life and was severe in the child, the mother presented a moderate childhood respiratory disease, and evolved towards a lung fibrosis in adulthood. The benign chorea was predominant in her, and appeared later than it is usually described, with a compensated hypothyroidism [6,8,9]. Depending on the series, a complete brain lung and thyroid disease is described in 30 to 50% of the patients with *NKX2-1* mutation [5,8,10]. Isolated benign chorea or lung involvement have also been described respectively in 13 to 24% of cases [4,5,8,10]. The reason why patients display such heterogeneous phenotypes for the same *NKX2-1* mutation is unclear. Various types of molecular defects have been described without phenotype correlations, except for whole-gene deletion that may be associated, unexpectedly, with a milder pulmonary disease [4].

In France, systematic neonatal screening for hypothyroidism can lead to the early diagnosis of a “brain-lung-thyroid syndrome”. However, considering the high frequency of incomplete forms of the disease, even in the absence of hypothyroidism, an unexplained ILD in a young patient should justify a *NKX2-1* analysis [5].

Corticosteroids are the mainstay of the ILD treatment in children with various surfactant disorders, including *NKX2-1* mutations. Other medications have been used such as azithromycin for its immunomodulatory properties or immunosuppressive drugs, including hydroxychloroquin [1,11].

Familial cases of “brain-lung-thyroid syndrome” are rare, with highly heterogeneous phenotypes, even in a single family. As clinical manifestations can appear over time, an isolated organ disease may not exclude the diagnosis. Therefore, a multidisciplinary management with lung physicians, endocrinologist and neurologist is recommended to propose an early treatment.

Figures legends

Figure 1: Chest high resolution (HR) CT scan of the two related patients.

(A) Chest HRCT scan of the infant (individual III.2, fig 2) at 16 months showing diffuse ground glass attenuations.

(B) Chest HRCT scan of the mother (individual II.3, fig 2) at age 27 showing a fibrosing interstitial pattern with bilateral septal thickening, and mild ground-glass attenuations.

Figure 2: Pedigree of the described family.

The index case III.2 (arrow) was diagnosed with “brain-lung-thyroid syndrome” (black symbol). A heterozygous (+/-) novel splicing *NKX2-1* (NM_003317.3) mutation c.273+2T>C was identified for him, and secondarily his mother (II.3). None of the mother’s parents (I.1 and I.2) presented hypothyroidism, neither neurological nor respiratory symptoms. Chest CT scans were normal. None of them carried the *NKX2-1* mutation (-/-). The neomutation was thus confirmed in the mother.

References

1. Bush A, Cunningham S, de Blic J, Barbato A, Clement A, Epaud R, et al.: European protocols for the diagnosis and initial treatment of interstitial lung disease in children. *Thorax* 2015 Nov;70:1078–1084.
2. Willemsen MAAP, Breedveld GJ, Wouda S, Otten BJ, Yntema JL, Lammens M, et al.: Brain-Thyroid-Lung syndrome: a patient with a severe multi-system disorder due to a de novo mutation in the thyroid transcription factor 1 gene. *Eur J Pediatr* 2005 Jan;164:28–30.
3. Iwatani N, Mabe H, Devriendt K, Kodama M, Miike T: Deletion of *NKX2.1* gene encoding thyroid transcription factor-1 in two siblings with hypothyroidism and respiratory failure. *J Pediatr* 2000 Aug;137:272–276.
4. Hamvas A, Deterding RR, Wert SE, White FV, Dishop MK, Alfano DN, et al.: Heterogeneous pulmonary phenotypes associated with mutations in the thyroid transcription factor gene *NKX2-1*. *Chest* 2013 Sep;144:794–804.
5. Carré A, Szinnai G, Castanet M, Sura-Trueba S, Tron E, Broutin-L’Hermite I, et al.: Five new *TTF1/NKX2.1* mutations in brain-lung-thyroid syndrome: rescue by *PAX8* synergism in one case. *Hum Mol Genet* 2009 Jun 15;18:2266–2276.
6. Williamson S, Kirkpatrick M, Greene S, Goudie D: A novel mutation of *NKX2-1* affecting 2 generations with hypothyroidism and choreoathetosis: part of the spectrum of brain-thyroid-lung syndrome. *J Child Neurol* 2014 May;29:666–669.
7. Guillot L, Carre A, Szinnai G, Castanet M, Tron E, Jaubert F, et al.: *NKX2-1* mutations leading to surfactant protein promoter dysregulation cause interstitial lung disease in “Brain-Lung-Thyroid Syndrome.” *Hum Mutat* 2010;31:E1146–62.
8. Gras D, Jonard L, Roze E, Chantot-Bastaraud S, Koht J, Motte J, et al.: Benign hereditary chorea: phenotype, prognosis, therapeutic outcome and long term follow-up in a large series with new mutations in the *TTF1/NKX2-1* gene. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012 Oct;83:956–962.
9. Peall, Kathryn; Kurian, Manju: Benign Hereditary Chorea: An Update 2015; DOI: 10.7916/D8RJ4HM5
10. Veneziano L, Parkinson MH, Mantuano E, Frontali M, Bhatia KP, Giunti P: A Novel De Novo Mutation of the *TTF1/NKX2-1* Gene Causing Ataxia, Benign Hereditary Chorea, Hypothyroidism and a Pituitary Mass in a UK Family and Review of the Literature. *The Cerebellum* 2014 Oct;13:588–595.
11. Parnham MJ, Erakovic Haber V, Giamarellos-Bourboulis EJ, Perletti G, Verleden GM, Vos R: Azithromycin: mechanisms of action and their relevance for clinical applications. *Pharmacol Ther* 2014 Aug;143:225–245.

Acknowledgments

The authors thank the patients and their families for their agreement and their reviewing of the manuscript. We also thank the patient association "Ensemble pour Pedro" <http://ensemblepourpedro.simplesite.com/>.

The authors thank the clinicians and the biologist who are in charge of the patient and contributed to his diagnosis: Estelle Breton, MD; Mélanie Henriat, MD; Julie Beucher, MD; Malek Louha, MD.

Figure 1

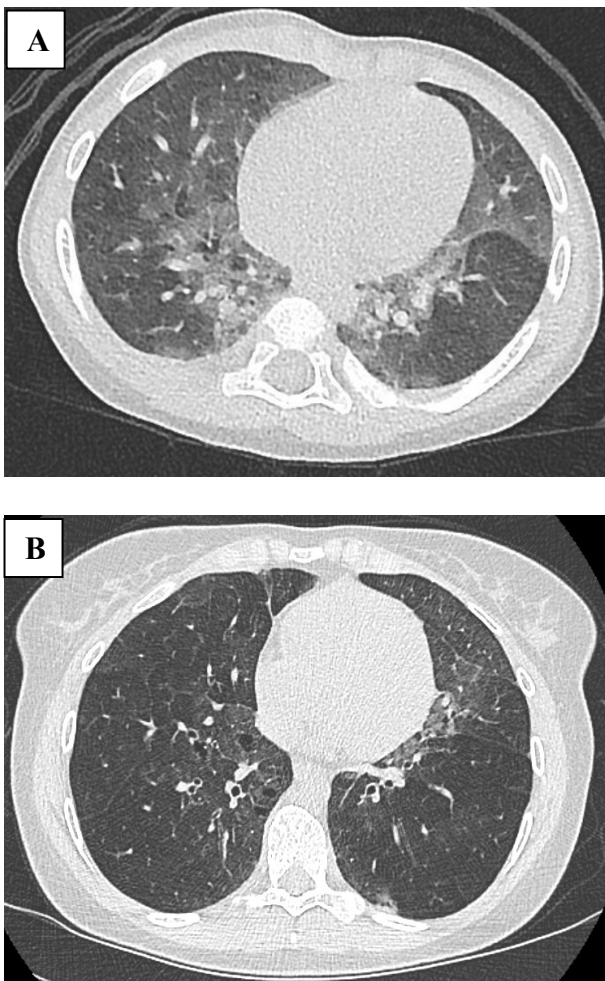
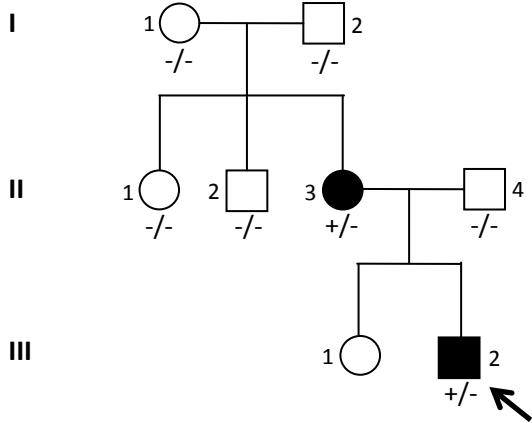


Figure 2



Annexe 3 : Alignement protéiques des séquences de référence des protéines SP-A1 et SP-A2 et de leurs homologues au cours de l'évolution des espèces

SFTPA1/SFTPA2 Alignement interspèces séquences Homologue (ClustalW) 27.03.2012

```

SFTPA1      MWLCPLALNLILMAASGAVCEVKDVCVSGSPGIPGTPGSHGLPGRDGRDGLKGDPPPPGPM 60
SFTPA2      MWLCPLALTLILMAASGAACEVKDVCVSGSPGIPGTPGSHGLPGRDGRDGVKGDPPPPGPM 60
Pan_troglodytes A2 -----MKDVCVSGSPGIPGTPGSHGLPGRDGRDGLKGDPPPPGPM 39
Pan A1      MWLCPLALTLILMAASGAVCEVKDVCVSGSPGIPGTPGSHGLPGRDGRDGLKGDPPPPGPM 60
Canis A1    MWLRCLALALTLMLVSGLENNTKDVCVGNPGIPGTPGSHGLPGRDGRDGVKGDPPPPGPM 60
Bos A1      MLLCSLTLTLWVMSGLCEDVKEVCLGSPGIPGTPGSHGLPGRDGRDGIKGDPPPPGPM 60
Mus A1      MSLGSLAFTLFLTVVAGIKCNGTEVCAGSPGIPGTPGNHGLPGRDGRDGIKGDPPPPGPM 60
Rattus A1   MSLCSLAFTLFLTVVAGIKCNVTDVCAGSPGIPGAPGNHGLPGRDGRDGVKGDPPPPGPM 60
Gallus A1   --MLSYSFCMIAAAVALLTPCHAQNCAGAPELPSIPGVSGLLGLG---ALKRYFG---- 50
                : * * * : * . * * * * . : * *

SFTPA1      GPPGEMPCPPGNDGLPGAPGIPGECGEEKGEPGERGPPGLPAHLDEELQATLHDFRHQIILQ 120
SFTPA2      GPPGETPCPPGNGLPGAPGVPGERGERGEAGERGPPGLPAHLDEELQATLHDFRHQIILQ 120
Pan_troglodytes A2 GPPGETPCPPGNGLPGAPGIPGERGVKGEPEGERGPPGLPTHLEELQATLHDFRHQIILQ 99
Pan A1      GPPGEMPCPPGNDGLPGAPGIPGECGEEKGEPGERGPPGLPAHLDEELQATLHDFRHQIILQ 120
Canis A1    GPPGGMPPGHPPNGMTGAPGVAGERGERKEGEPGERGPPGLPASLDEELQTLHDLRHQIILQ 120
Bos A1      GPPGGMPLPGRDGMTGAPGLPGERGERKEGEPGERGPPGFPAYLDEELQGLTHEIRHQVLQ 120
Mus A1      GPPGGMPLPGRDGLPGAPGAPGEHGDKEGEPGERGLPGFPAYLDEELQTALYEIKHQIILQ 120
Rattus A1   GPPGGMPLPGRDGLPGGPGAPGGRGDKGEPGERGLPGFPAYLDEELQTELYEIKHQIILQ 120
Gallus A1   ----SLLWPYGEEKLPECCWLRQQD-----LSTSSDDELGNVLLNLRQRIILQ 94
                * : :. . . . . : : * : * * * * : : : : * *

SFTPA1      TRGALS LQGSIMTVG-EKVFSSNGQSITFDAIQEACARAGGRIAVPRNPEENEAIASFVKK 180
SFTPA2      TRGALS LQGSIMTVG-EKVFSSNGQSITFDAIQEACARAGGRIAVPRNPEENEAIASFVKK 180
Pan_troglodytes A2 TRGALS LQGSIMTVG-EKVFSSNGQSVTFDAIQEACARAGGRIAVPRNPEENEAIASFVKK 159
Pan A1      TRGALS LQGSIMTVG-EKVFSSNGQSVTFDAIQEACARAGGRIAVPRNPEENEAIASFVKK 180
Canis A1    TMGVLSLHESLLVVG-RKVFSSNGQSINFNDIQEELCAGAGGQIAAPMSPEENEAIASIVKK 180
Bos A1      SQGVLR LQGSVLAVG-EKVFSTNGQSVNFDAIKELCARVGGHIAAPRSPPEENEAIASIVKK 180
Mus A1      TMGVLS LQGSMLSVG-DKVFSTNGQSVNFDTIREMCTRAGGHIAAPRNPPEENEAIASITKK 180
Rattus A1   TMGVLS LQGSMLSVG-DKVFSTNGQSVNFDTIKEMCTRAGGNIIVPRTPPEENEAIASIAKK 180
Gallus A1   LEGVLALDGIKTKVG-EKIFASNGKEVNFSSALESCBETGGTLATPMNEEENKAIMGIVKQ 154
                * . * * . . : * * * : * : * : * : * . * * . * * : * * . * * : * * : * : *

SFTPA1      YN-TYAYVGLTEGPPSPGD--FRYSDGTPVNYTNWYRGEPAQR-----GKEQCQVEMYTDG---- 231
SFTPA2      YN-TYAYVGLTEGPPSPGD--FRYSDGTPVNYTNWYRGEPAQR-----GKEQCQVEMYTDG---- 231
Pan_troglodytes A2 YN-TYAYVGLTEGPPSPGD--FRYSDGTPVNYTNWYRGEPAQR-----GKEQCQVEMYTDG---- 210
Pan A1      YN-TYAYVGLTEGPPSPGD--FRYSDGTPVNYTNWYRGEPAQR-----GKEQCQVEMYTDG---- 231
Canis A1    YN-TYAYLGLVESPDSDGD--FQYMDGAPVNYTNWYPGEPRGR-----GKEQCQVEMYTDG---- 231
Bos A1      YN-TYAYLGLVEGPTAGD--FYLDGAPVNYTNWYPGEPRGR-----GKEKCVIYTDG---- 231
Mus A1      YN-TYPYLGVI EQTPGD--FHYLDGASVNYTNWYPGEPRGR-----GKEKCVEMYTDG---- 231
Rattus A1   YN-NYVYLGMI EDQTPGD--FHYLDGASVNYTNWYPGEPRGQ-----GKEKCVEMYTDG---- 231
Gallus A1   YN-RYAYLGIKESDTAGQ--FKYVNNQPLNYTSWQQYEPNGK-----GTEKCVEMYTDG---- 205
                ** * * * : * . * : * * * : . . : * * * * * * * * * * * * * : : *

SFTPA1      QWNRNCLYSRLTICEF-- 248
SFTPA2      QWNRNCLYSRLTICEF-- 248
Pan_troglodytes A2 QWNRNCLYSRLTICEF-- 227
Pan A1      QWNRNCLYSRLTICEF-- 248
Canis A1    QWNNKNCLQYRLAICEF-- 248
Bos A1      QWNRNCLQYRLAICEF-- 248
Mus A1      KWNRNCLQYRLAICEF-- 248
Rattus A1   TWNRNCLQYRLAVCEF-- 248
Gallus A1   NWKDRKNLYRLTVCEY-- 222
                * * : * * :

```

Annexe 4 : Surfactant protein A: a key player in lung homeostasis. Nathan N, Taytard J, Duquesnoy P, Thouvenin G, Corvol H, Amselem S, Clement A. Int J of Biochem Cell Biol. Under review.

Surfactant protein A: a key player in lung homeostasis

Nadia Nathan^{a,b}, Jessica Taytard^{a,c}, Philippe Duquesnoy^b, Guillaume Thouvenin^{a,c}, Harriet Corvol^{a,c}, Serge Amselem^{b,d}, Annick Clement^{a,b}

^a Service de pneumologie pédiatrique, Hôpital Armand Trousseau, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Centre national de référence des maladies respiratoires rares RespiRare, Paris 75012, France. nadia.nathan@aphp.fr; annick.clement@aphp.fr; jessica.taytard@aphp.fr; guillaume.thouvenin@aphp.fr; harriet.corvol@aphp.fr

^b Inserm UMRS933, Université Pierre et Marie Curie (Paris 6), Sorbonne Universités, Paris 75012, France. philippe.duquesnoy@inserm.fr

^c Inserm UMRS928, Université Pierre et Marie Curie (Paris 6), Sorbonne Universités, Paris 75012, France.

^d Service de génétique et d'embryologie médicales, Hôpital Armand Trousseau, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris 75012, France serge.amselem@aphp.fr

Corresponding author

Prof. Annick Clement
Pneumologie Pédiatrique
Hôpital Armand Trousseau, APHP
26, avenue du Docteur Arnold Netter
75012 Paris, France
Tel: +33 1 44 73 66 68
Fax : +33 1 44 73 67 18
annick.clement@aphp.fr

Key words

Surfactant protein A
Collectin
Lung homeostasis
Lung fibrosis
Lung cancer

Abbreviations

AEC	Alveolar Epithelial Cell
CRD	Carbohydrate Recognition Domain
IL	Interleukin
ILD	Interstitial Lung Disease
IPF	Idiopathic Pulmonary Fibrosis
LAP	Latency Associated Peptide
LPS	Lipopolysaccharides
NK	Natural Killer
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SP	Surfactant Protein
TGF	Transforming Growth Factor
TLR	Toll-like Receptor

Word count: 1980/2000

Abstract word count: 108/150

Abstract

The continuous exposure of the respiratory tract to various insults is a permanent threat for the maintenance of lung homeostasis. Repair of the parenchyma structure, and particularly of the alveolar epithelium, requires complex cellular strategies. Among the molecular components that play an important role in these processes are the surfactant proteins (SP), and mainly SP-A. The present review examines current knowledge on the role of SP-A in lung host defense mechanisms through its implication in lung innate/adaptive immunity and epithelium integrity and repair. New information on SP-A deficiency in various forms of pulmonary diseases should help defining therapeutic strategies aimed at restoring functional SP-A within the alveolar structure.

Introduction

Continuous maintenance of lung parenchyma homeostasis is required for proper preservation of ventilation and gas exchange. Following harmful exposure to mechanical stress and environmental particulates, complex cellular strategies are developed to ensure proper regeneration of the lung parenchyma. To rapidly initiate the repair process, the damaged alveolar epithelium must initiate a complex cascade of events in which the various components of the pulmonary surfactant play active roles. Among them, an important molecule is the Surfactant Protein (SP)-A. This review will examine current concepts related to the role of SP-A in the lung defense mechanisms and homeostasis.

Pathogenesis

Surfactant and lung parenchyma homeostasis

The most remarkable feature of the alveolar region is its considerable surface of contact between air and blood. The efficient diffusion of the breathing gases relies on the extreme thinness of the air-blood barrier. This is achieved by the morphological characteristics of the Alveolar Epithelial Cell (AEC)s and their compression into a flat shape layer. The surface tension exerted by the blood-air interface on the epithelium side produces a collapsing pressure that is lowered by the pulmonary surfactant, an essential component required for alveolar stability during breathing.

The surfactant is a complex mixture of lipids (90%) and proteins (10%) pre-packed in type 2 AEC lamellar bodies until their secretion into the airspaces. The major constituents of lipid surfactant are phospholipids and the specific SPs include SP-A, SP-B, SP-C and SP-D. SP-A and SP-D are hydrophilic calcium-dependent lectins referred to as collectins. SP-B and SP-C are hydrophobic proteins, essential for the physical structure of surfactant. Synthesis of SPs and phospholipids via separate pathways leads to the production of lamellar bodies that are secreted into large and small aggregate forms. Unravelling of these packed aggregates allows the production of intermediate structures such as tubular myelin, and the organization of a loose and continuous network of surfactant membranes.

Lung parenchyma homeostasis relies on the dynamic deformation of the alveolar structure during breathing through reduction of surface tension, and balance of forces involved in individual alveolar inflation is the result of coordinated actions of SPs. The involvement of SP-A appears critical for the conversion of lamellar bodies into tubular myelin, as demonstrated in SP-A deficient mice where tubular myelin is absent (Khubchandani and Snyder, 2001; Korfhagen et al., 1996; Ochs et al., 2002; Whitsett et al., 2015). In addition, SP-A facilitates the adsorption of phospholipids into the surface film and stimulates the recycling of surfactant lipids by AECs (Hawgood et al., 1987; Ochs et al., 2002). Its active participation in surface tension stability is tightly linked to its implication in lung innate/adaptive immunity and alveolar surface integrity (Figure 1).

SP-A metabolism

SP-A, the most abundant SP, is structurally homologous to the collectins, a family of innate immune response components. In humans and other primates, SP-A is encoded by *SFTPA1* and *SFTPA2*, two genes composed of 6 exons (4 coding) located in chromosomal region 10q22-23 and separated by a ~40-kb DNA fragment containing a pseudo-gene. The 34-36 kDa proteins SP-A1 and SP-A2 are produced as pre-proteins and secreted into secretory vesicles in the alveolar space, and assembled as a flower-like bouquet structure of 6 heterotrimers composed of two SP-A1 and one SP-A2 molecules. SP-A1 and SP-A2 are very similar 248-amino-acid proteins, differing only by 9 residues. As member of the C-type collectin family, SP-A contains, in addition to the signal peptide sequence, 4 domains that include: the N-terminal sequence, the collagen-like domain, the neck domain, and the highly conserved carbohydrate recognition domain (CRD). The pathways used for intra-cellular trafficking and secretion of newly synthesized SP-A remain partially understood, with a possible incorporation of the nascent protein into lamellar bodies (Fisher et al., 2010). Several studies have addressed the question of the respective role of SP-A1 and SP-A2 in this function. The current view is that these proteins interact differently with the surfactant lipid monolayers and that SP-A1 and SP-A2 are both required for an appropriate SP-A oligomerization pattern.

SP-A is produced mainly by AECs and, to a lesser extent, by airway cells including non-ciliated (club/Clara) cells. Its expression has also been reported in extrapulmonary tissues, such as intestine, thymus, and salivary glands, but the significance of such expressions remains unclear (Khubchandani and Snyder, 2001; Madsen et al., 2003). SP-A gene expression is regulated by numerous factors including growth factors such as Transforming growth factor (TGF)- β , hormones, and cytokines (Kishore et al., 2006; Willems et al., 2014). Air pollutants can alter SP-A metabolism. As such, oxidative stress induced by a large variety of inhaled agents has been reported to affect several SP-A function including host response to bacterial infection and alveolar macrophage activities leading to impaired phagocytosis and cytokine production (Silveyra and Floros, 2012a). SP-A deficiency may be partly caused by epigenetic modifications generated by either altered gene transcription due to changes in chromatin structure linked to DNA methylation and histone modifications, or changes in translation efficiency in relation with microRNA-mediated repression (Silveyra and Floros, 2012b).

SP-A and immune response

As member of the collectin family, SP-A is best known for its function in immunity. The C-terminal lectin domain recognizes and binds non-host oligosaccharides found on pathogens allowing their phagocytosis by the cells of the innate system (i.e. macrophages and monocytes). Mice lacking SP-A (SP-A^{-/-}) showed increased lung infections and systemic dissemination after intratracheal inoculation with a variety of pathogens (Kishore et al., 2006; LeVine et al., 2000; Linke et al., 2001). The underlying mechanisms are several. Reports showed that SP-A has the capacity to bind carbohydrates and lipopolysaccharides (LPS) as well as lipids and proteins at the surface of microorganisms. This step allows the opsonisation of bacteria, yeast, fungi and viruses by phagocytic cells, and ultimately their uptake and destruction. SP-A can also facilitate pathogen elimination by increasing their aggregation and clearance using the mucociliary escalator (Khubchandani and Snyder, 2001). It can also have direct antibacterial activity by favouring the increased permeability and vulnerability of the bacteria (Benne et al., 1995; Khubchandani and Snyder, 2001). Following its binding to immune cell surface receptors including the Toll-like Receptors (TLR), SP-A participates in the initiation of the inflammatory response by stimulating the production of pro-inflammatory cytokines such as Interleukin (IL)-1, and secondarily in its resolution through enhancement of apoptotic neutrophil phagocytosis by macrophages and stimulation of anti-inflammatory cytokine (e.g. IL-10) production and TGF- β secretion (Willems et al., 2014). Other actions include inhibition of dendritic cell maturation and resistance to allergen challenge (Brinker et al., 2003; Han and Mallampalli, 2015; Madan et al., 1997; Wang et al., 1998). Altogether, SP-A is considered as an important modulator of pro/anti-inflammatory balance in the respiratory system (Willems et al., 2014).

SP-A and lung repair

Recently, novel interest has been focused on the role of SP-A in the repair process of the lung parenchyma. The key players are the type 2 AECs, considered as multipotent cells with high plasticity for both self-renewal and type 1 AECs repopulation through transdifferentiation mechanisms (Fehrenbach, 2001). Evidence has emerged of a causative link between epithelial cell loss and lung scarring. The ineffective reconstitution of the epithelium is a major determinant of the inappropriate tissue regeneration observed in pathological situations such as pulmonary fibrosis and cancer. Several reports have provided evidence for a role of SP-A in the processes that control lung epithelial cell proliferation and apoptosis. In lung carcinoma that originates in type 2 AECs, the level of SP-A expression seems to influence cancer development. In mouse models, SP-A overexpression in lung adenocarcinoma cells was associated with suppression of tumor progression. Proposed mechanisms include the capacity of SP-A to favor the recruitment of M1 anti-tumor macrophages in the tumor environment through interactions with the TLRs (Mitsuhashi et al., 2013). This action may implicate Natural Killer (NK) cells. Indeed, data from several studies have shown that recruitment of NK cells could be increased by SP-A and that NK cell activation was stimulated by M1 macrophage cytokines (Mitsuhashi et al., 2013).

The mechanisms by which SP-A could participate in the epithelium repair are likely to implicate TGF- β . TGF- β is produced as an inactive molecule, latent TGF- β which forms a complex with the Latency Associated Peptide (LAP) and is sequestered in the extra cellular matrix. To exert its actions, TGF- β must be released from the latent complex to interact with its receptors and to activate the Smad protein

pathways. Recent studies provided support for a role of SP-A in TGF- β activation. They documented a specific and high affinity binding of TGF- β to SP-A, located in the SP-A head domain. This binding involves the uncomplexed TGF- β form, and may represent a protection from inactivation by LAP (Willems et al., 2014). Consequently, TGF- β becomes available at the cell surface and, following binding to its receptors, can drive signalling cascades such as those involved in proliferation and differentiation. The molecular link between SP-A and TGF- β provides novel supports for a role of SP-A in the pathways that govern lung repair after injury as well as cancer-related processes, though modulation of key events associated with cell cycle progression and apoptosis (Figure 2) (Lin and Zhao, 2015).

SP-A and diseases

Recent genetic studies have led to document genetic variations in SP-A1 and SP-A2 in various clinical situations. Although *SFTPA1* and *SFPTA2* have a high degree of homology, their minor sequence differences and associated regulatory mechanisms lead to functional particularities, such as cytokine production (Floros et al., 2009; Goto et al., 2014; Oberley and Snyder, 2003). In addition, they display a high frequency of genomic polymorphism, up to 1 Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) per 30 bases (Horton et al., 2013). Some of the reported *SFTPA1* and *SFPTA2* allelic variations have been shown to impact various pathological conditions including infectious diseases, cancer and interstitial lung diseases (ILD). A role of SP-A in pulmonary infections is illustrated by the identification of *SFPTA2* SNPs that were found to be associated with the severity of respiratory insufficiency during pandemic H1N1 infection (Tolosa and Palaniyar, 2014). Among them, the haplotype A¹ displayed a protective effect, with a better outcome.

Studies focused on lung cancer reported that low SP-A expression in cancer cells was associated with poor outcome, and that tumor progression was more critical in patients with *SFPTA2* deletion (Goto et al., 2014; Jiang et al., 2005). Further reports in clinical situations that combine lung cancer and fibrosis provide support for a central role of SP-A in cell proliferation and remodelling processes. Genetic defects in *SFPTA2* were first identified in families with lung adenocarcinoma and fibrosis. The two mutant SP-A2 proteins (F198S and G213W) involved sequences in the CRD domain (Wang et al., 2009). Other deleterious *SFPTA2* allelic variants were then documented in familial and sporadic ILD (Coghlan et al., 2014; van Moorsel et al., 2015). SP-A defects also include variants in *SFTPA1* as recently reported in a large family of patients with various forms of pediatric and adult ILD (Nathan et al., 2016). Analysis of the newly identified W211R mutant SP-A1 revealed that it was associated with an impaired protein secretion and alveolar epithelium expression. Altogether these studies support a role for SP-A in ILD with phenotypic manifestations ranging from severe diseases early in life to fibrosis and cancer in the elderly.

Summary and future directions

The role of SP-A in lung homeostasis is not limited to its contribution in the maintenance of surfactant surface tension property and its immune defensive actions. Indeed, current knowledge views SP-A as an important factor implicated in cell proliferation, differentiation and migration to ensure a proper alveolar surface integrity. This opens up new areas of research dedicated at deciphering the mechanisms by which SP-A could be involved in the pathways leading to repair, remodelling and regeneration of the lung parenchyma. Acceleration of genetic studies exploring SP-A variations in various forms of pulmonary diseases is also an important issue. Altogether, these efforts will help defining therapeutic strategies aimed at restoring functional SP-A within the alveolar structure.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et la Recherche Médicale (Inserm), the Legs Poix from the Chancellerie des Universités, Paris (grants 1305 and 1405), as well as fundings from the patient organisations Respirer c'est Grandir and Belleherbe Association.

The authors thank Ecole Doctorale 394, Physiologie Physiopathologie et Thérapeutique, UPMC, Sorbonne Universités, Paris; and Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Centre national de référence des maladies respiratoires rares RespiRare, et Filière de santé des maladies respiratoires rares RespiFIL.

Figure legends

Figure 1: SP-A and lung homeostasis

SP-A plays critical roles in key cellular mechanisms required for maintenance of lung parenchyma homeostasis: surfactant metabolism, alveolar surface integrity and repair, innate/adaptive immunity and inflammatory response

Figure 2: SP-A deficiency and diseases

Current understanding suggests overlapping mechanisms in fibrosis and cancer, which include TGF- β signalling. SP-A, through its capacity to interact with TGF- β , may be linked to dysregulated lung injury responses associated with altered repair and tumor progression.

REFERENCES

- Benne, C.A., Kraaijeveld, C.A., van Strijp, J.A., Brouwer, E., Harmsen, M., Verhoef, J., van Golde, L.M., van Iwaarden, J.F., 1995. Interactions of surfactant protein A with influenza A viruses: binding and neutralization. *J. Infect. Dis.* 171, 335–341.
- Brinker, K.G., Garner, H., Wright, J.R., 2003. Surfactant protein A modulates the differentiation of murine bone marrow-derived dendritic cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 284, L232–241.
- Coghlan, M.A., Shifren, A., Huang, H.J., Russell, T.D., Mitra, R.D., Zhang, Q., Wegner, D.J., Cole, F.S., Hamvas, A., 2014. Sequencing of idiopathic pulmonary fibrosis-related genes reveals independent single gene associations. *BMJ Open Respir. Res.* 1, e000057.
- Fehrenbach, H., 2001. Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respir. Res.* 2, 33–46.
- Fisher, A.B., Dodia, C., Ruckert, P., Tao, J.-Q., Bates, S.R., 2010. Pathway to lamellar bodies for surfactant protein A. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 299, L51–58.
- Floros, J., Wang, G., Mikerov, A.N., 2009. Genetic complexity of the human innate host defense molecules, surfactant protein A1 (SP-A1) and SP-A2--impact on function. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 19, 125–137.
- Goto, H., Mitsuhashi, A., Nishioka, Y., 2014. Role of surfactant protein A in non-infectious lung diseases. *J. Med. Investig. JMI* 61, 1–6.
- Han, S., Mallampalli, R.K., 2015. The Role of Surfactant in Lung Disease and Host Defense against Pulmonary Infections. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 12, 765–774.
- Hawgood, S., Benson, B.J., Schilling, J., Damm, D., Clements, J.A., White, R.T., 1987. Nucleotide and amino acid sequences of pulmonary surfactant protein SP 18 and evidence for cooperation between SP 18 and SP 28-36 in surfactant lipid adsorption. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 66–70.
- Horton, C.J., Mitui, M., Leos, N.K., Garcia, C.K., Park, J.Y., 2013. Long-range PCR based sequencing of the highly homologous genes, SFTPA1 and SFTPA2. *Mol. Cell. Probes* 27, 115–117.
- Jiang, F., Caraway, N.P., Nebiyu Bekele, B., Zhang, H.-Z., Khanna, A., Wang, H., Li, R., Fernandez, R.L., Zaidi, T.M., Johnston, D.A., Katz, R.L., 2005. Surfactant protein A gene deletion and prognostics for patients with stage I non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 11, 5417–5424.
- Khubchandani, K.R., Snyder, J.M., 2001. Surfactant protein A (SP-A): the alveolus and beyond. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 15, 59–69.
- Kishore, U., Greenhough, T.J., Waters, P., Shrive, A.K., Ghai, R., Kamran, M.F., Bernal, A.L., Reid, K.B., Madan, T., Chakraborty, T., 2006. Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors. *Mol Immunol* 43, 1293–315.
- Korfhagen, T.R., Bruno, M.D., Ross, G.F., Huelsman, K.M., Ikegami, M., Jobe, A.H., Wert, S.E., Stripp, B.R., Morris, R.E., Glasser, S.W., Bachurski, C.J., Iwamoto, H.S., Whitsett, J.A., 1996. Altered surfactant function and structure in SP-A gene targeted mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 9594–9599.
- LeVine, A.M., Whitsett, J.A., Gwozdz, J.A., Richardson, T.R., Fisher, J.H., Burhans, M.S., Korfhagen, T.R., 2000. Distinct effects of surfactant protein A or D deficiency during bacterial infection on the lung. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 165, 3934–3940.
- Lin, R.-L., Zhao, L.-J., 2015. Mechanistic basis and clinical relevance of the role of transforming growth factor- β in cancer. *Cancer Biol. Med.* 12, 385–393.
- Linke, M.J., Harris, C.E., Korfhagen, T.R., McCormack, F.X., Ashbaugh, A.D., Steele, P., Whitsett, J.A., Walzer, P.D., 2001. Immunosuppressed surfactant protein A-deficient mice have increased susceptibility to *Pneumocystis carinii* infection. *J. Infect. Dis.* 183, 943–952.

- Madan, T., Kishore, U., Shah, A., Eggleton, P., Strong, P., Wang, J.Y., Aggrawal, S.S., Sarma, P.U., Reid, K.B., 1997. Lung surfactant proteins A and D can inhibit specific IgE binding to the allergens of *Aspergillus fumigatus* and block allergen-induced histamine release from human basophils. *Clin. Exp. Immunol.* 110, 241–249.
- Madsen, J., Tormoe, I., Nielsen, O., Koch, C., Steinhilber, W., Holmskov, U., 2003. Expression and localization of lung surfactant protein A in human tissues. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 29, 591–597.
- Mitsuhashi, A., Goto, H., Kuramoto, T., Tabata, S., Yukishige, S., Abe, S., Hanibuchi, M., Kakiuchi, S., Saijo, A., Aono, Y., Uehara, H., Yano, S., Ledford, J.G., Sone, S., Nishioka, Y., 2013. Surfactant protein A suppresses lung cancer progression by regulating the polarization of tumor-associated macrophages. *Am. J. Pathol.* 182, 1843–1853.
- Nathan, N., Giraud, V., Picard, C., Nunes, H., Dastot-Le Moal, F., Copin, B., Galeron, L., de Ligniville, A., Kuziner, N., Reynaud-Gaubert, M., Valeyre, D., Couderc, L.-J., Chinet, T., Borie, R., Crestani, B., Simansour, M., Nau, V., Tissier, S., Duquesnoy, P., Mansour-Hendili, L., Legendre, M., Kannengiesser, C., Coulomb L'Hermine, A., Gouya, L., Amselem, S., Clement, A., 2016. Germline SFTPA1 mutation in familial idiopathic interstitial pneumonia and lung cancer. *Hum. Mol. Genet.* 25, 1457–1467.
- Oberley, R.E., Snyder, J.M., 2003. Recombinant human SP-A1 and SP-A2 proteins have different carbohydrate-binding characteristics. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 284, L871–881.
- Ochs, M., Johnen, G., Müller, K.-M., Wahlers, T., Hawgood, S., Richter, J., Brasch, F., 2002. Intracellular and intraalveolar localization of surfactant protein A (SP-A) in the parenchymal region of the human lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 26, 91–98.
- Silveyra, P., Floros, J., 2012a. Genetic variant associations of human SP-A and SP-D with acute and chronic lung injury. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 17, 407–429.
- Silveyra, P., Floros, J., 2012b. Air pollution and epigenetics: effects on SP-A and innate host defence in the lung. *Swiss Med. Wkly.* 142, w13579.
- Tolosa, M., Palaniyar, N., 2014. Severe respiratory insufficiency during pandemic H1N1 infection: prognostic value and therapeutic potential of pulmonary surfactant protein A. *Crit. Care Lond. Engl.* 18, 479.
- van Moorsel, C.H.M., Ten Klooster, L., van Oosterhout, M.F.M., de Jong, P.A., Adams, H., Wouter van Es, H., Ruven, H.J.T., van der Vis, J.J., Grutters, J.C., 2015. SFTPA2 Mutations in Familial and Sporadic Idiopathic Interstitial Pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 192, 1249–1252.
- Wang, J.Y., Shieh, C.C., You, P.F., Lei, H.Y., Reid, K.B., 1998. Inhibitory effect of pulmonary surfactant proteins A and D on allergen-induced lymphocyte proliferation and histamine release in children with asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 158, 510–518.
- Wang, Y., Kuan, P.J., Xing, C., Cronkhite, J.T., Torres, F., Rosenblatt, R.L., DiMaio, J.M., Kinch, L.N., Grishin, N.V., Garcia, C.K., 2009. Genetic defects in surfactant protein A2 are associated with pulmonary fibrosis and lung cancer. *Am. J. Hum. Genet.* 84, 52–59.
- Whitsett, J.A., Wert, S.E., Weaver, T.E., 2015. Diseases of pulmonary surfactant homeostasis. *Annu. Rev. Pathol.* 10, 371–393.
- Willems, C.H.M.P., Zimmermann, L.J.I., Kloosterboer, N., Kramer, B.W., van Iwaarden, J.F., 2014. Surfactant protein A binds TGF- β 1 with high affinity and stimulates the TGF- β pathway. *Innate Immun.* 20, 192–199.

Figure 1

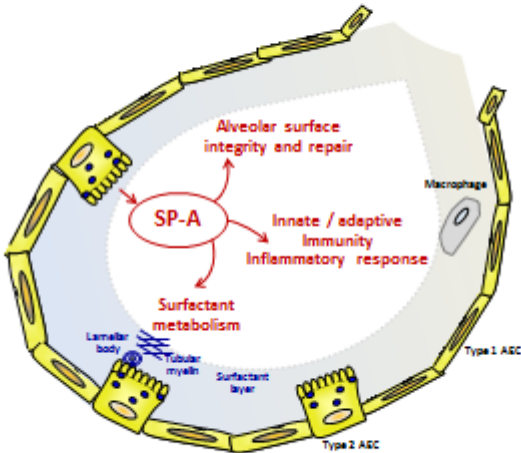
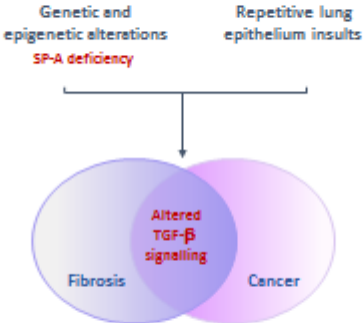


Figure 2



Annexe 5 : Organisation du recrutement des patients

La mise en place du Plan Maladies Rares 1 (2005-2008) a permis l'organisation des maladies respiratoires rares en réseaux de soins pédiatriques et adultes grâce à la création de centres de références de maladies rares (CRMR). Le centre de référence des maladies respiratoires rares, RespiRare (www.respirare.fr), a été créé en 2006. Il est coordonné par le Pr. Annick Clement à l'hôpital Trousseau, Paris, et est constitué d'un centre de référence tri-site et de 8 centres de compétence (CCMR) en France. Le centre de référence RespiRare a permis de fédérer les cliniciens autour d'une prise en charge commune des patients atteints de maladies respiratoires rares, d'améliorer leur prise en charge et leur parcours de soins. Le centre de référence des maladies pulmonaires rares de l'adulte (<http://maladies-pulmonaires-rares.fr/>) a été créé en 2004. Il est coordonné par Pr. Jean-François Cordier / Pr. Vincent Cottin à Lyon. Il regroupe un centre de référence, et des centres de compétence en France.

Dans le cadre du Plan maladies Rares 2 (2011-2014), la filière de santé RespiFIL (www.respifil.fr) a été créée en 2014. Elle est coordonnée par le Pr. Annick Clement à l'hôpital Trousseau, et regroupe le centre de référence pédiatrique Respirare, le centre de référence des maladies pulmonaires rares de l'adulte, le centre de référence du syndrome d'Ondine, et le centre de référence de l'hypertension artérielle pulmonaire. La filière RespiFIL s'articule autour de deux objectifs généraux qui sont la visibilité de la filière, et le décloisonnement, afin de contribuer à diminuer de délai d'errance diagnostique, et améliorer le continuum entre les acteurs. Ces derniers étant pédiatriques et adultes, la filière RespiFIL favorise une transition adaptée entre prise en charge pédiatrique et adulte.

Afin de promouvoir la recherche clinique et fondamentale dans les maladies rares, le ministère de la recherche, grâce au programme d'investissements d'avenir, a permis la mise en place du programme de recherche RaDiCo. RaDiCo est localisé à l'hôpital Trousseau, et coordonné par le Pr. Serge Amselem, le Pr. Annick Clement, le Pr. Paul Landais, et le Dr. Jérôme Weinbach. Le programme RaDiCo vise à doter la France de cohortes dans le domaine des maladies rares. Les cohortes constituées permettront de nourrir une Banque Nationale de Données Maladies Rares (BNDMR) et de développer des programmes de recherche. L'objectif à terme est d'améliorer l'accompagnement des patients atteints et de leur famille. La cohorte RaDiCo-PID est l'une des 16 cohortes retenues dans le cadre de ce programme.

Les données des patients inclus dans ce travail ont été intégrées dans une base de données du laboratoire de génétique ayant reçu l'accord de la CNIL. Pour les patients pédiatriques, elles sont intégrées dans le dossier patient informatisé du CRMR RespiRare (e-respirare). L'ensemble des données sont formatées pour être secondairement intégrées au CRF élaboré pour la filière RespiFIL et pour le programme de recherche RaDiCo, sous le logiciel RedCAP.

Annexe 6 : Protocoles de PCR et de séquençage utilisés pour les gènes *SFTPA1*, *SFTPA2*, *SFTPD*

	<p>SFTPA1 : PCR-SEQUENCAGE (Manuel et Robot)</p> <p>Armand Trousseau – Génétique UA3616-UG366 – Mode opératoire TRS-GM-ANA-Mx - V. 1</p>
	Date d'application : 19/09/2012

Rédaction	Approbation	Validation
<p>Nom : GALERON Laurie</p> <p>Signature :</p> <p>Date : 19-09-2012</p>	<p>Nom :</p> <p>Signature :</p> <p>Date :</p>	<p>Nom :</p> <p>Signature :</p> <p>Date :</p>

Version	Date de création ou de révision	Objet de la modification
1	19-09-2012	Version initiale
2	15-12-2015	V2 : ajout sequençage exon 2 non codant

Mots clés : PPD (Pathologies Parenchymateuses Diffuses), SFTPA1 (surfactant, pulmonary-associated protein A1), PCR, séquençage

I. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

- criblage de la totalité des exons codants et de leurs jonctions introniques flanquantes (environ 30 pb) chez les cas index
- Recherche d'une mutation particulière chez les apparentés

II. PERSONNES CONCERNEES

- les techniciens, ingénieurs et biologistes du service

III. DOCUMENTS DE REFERENCE

- Réalisation d'une PCR
- Préparation d'un gel d'agarose
- Contrôle des produits de PCR par dépôts sur gel
- Purification des PCR par ExoSAP
- Séquençage
- Purification des séquences
- Utilisation de l'automate Hamilton « MICROLAB STARLET »
- Purification des séquences

IV. TERMINOLOGIE

PCR : polymerase chain reaction

Pb : paire de bases
 F : forward
 R : reverse

V. DESCRIPTION DU PROCESSUS

1) AMPLIFICATION PAR PCR

- Amorces utilisées :

Exon	Nom des amorces*	Séquence 5'-3'	Orientation	Taille de l'amplicon (pb)
Exon 2NC-6	SFTPA1_ex3F	CCATGACTGACCACCTTGAG	sens	3425
	SFTPA1_ex6R	CCTGGCCTTCTAACCTCATG	antisens	

* les solutions mères des amorces à 100 pmol/μl sont conservées à -20°C dans le congélateur P0/C1.

* les mix primers (F+R) à 5 pmol/μl chacun sont conservés à -20°C dans le congélateur P2/C1.

- Amplification :

1) Mix réactionnel : mix Promega 1,25mM MgCl₂

Réactif	Concentration	Volume (μl)
Master Mix GreenGoTaq	2X	20
Mix primers F/R	5 pmol/μl chacun	3,2
MgCl ₂	25mM	2
H ₂ O		10,8 qsp 40 μl
ADN	50 ng/μl	4 μl

Le Mix réactionnel peut être réalisé par l'automate Hamilton « MICROLAB STARLET » (Robot PréPCR)

2) Conditions d'amplification :

Température	Durée
94°C	5 min
94°C	30 s
66°C	30 s
72°C	3 min 30 s
94°C	30 s
64°C	30 s
72°C	3 min 30 s
72°C	5 min
10°C	∞

- Vérification des PCR :

Déposer 5μl de chaque PCR avec 2μl de tampon de charge sur un gel d'agarose 1% (cf. protocole « Préparation d'un gel d'agarose » et « Contrôle des produits de PCR par dépôt sur gel ») en présence d'un marqueur de poids moléculaire et d'un témoin positif et négatif.

- Purification des PCR :

Cf. protocole « purification de PCR par ExoSAP »

2) SEQUENCAGE

- Amorces de séquences utilisées :

Exon	Nom des amorces*	Séquence 5'-3'	Orientation
Exon 2 NC	SFTPA1_Ex2seqR1	ACTGTGCTCTGTCAGGACTC	antisens
	SFTPA1_ex2seqR2	AGGGCCAGGGTCTCCTTTGA	antisens
Exon 3	SFTPA1_Ex3seqF1	CAGTGAGTGAGTGACCTGAC	sens
	SFTPA1_Ex3seqR	ACCTGCCCCACCCTGCTCAC	antisens
Exon 4	SFTPA1_Ex4F1	GCTATAGTAAGCTGGGTGGG	sens
	SFTPA1_Ex4F2	TGGAGAGTCTGTCCTCATAG	sens
Exon 5	SFTPA1_Ex5seqR2	GAAATGGTGCAATTTCTGG	antisens
	SFTPA1_Ex5seqR3	GGCCATTCAAAGACATCAG	antisens
Exon 6	SFTPA1_Ex6seqF	TTCCAGGAAATTGCACCATT	sens
	SFTPA1_Ex6seqR1	TCAGTGATTATGGGGAAGAG	antisens

* les solutions mères des amorces à 100 pmol/μl sont conservées à -20°C dans le congélateur P0/C1.

* les dilutions à 5 pmol/μl sont conservées à -20°C dans le congélateur P2/C1.

- Préparation des séquences :

Cf. protocoles « séquençage » puis « purification de séquences »

Le Mix de séquence peut être réalisé par les automates Hamilton « MICROLAB STARLET » (Robot PréPCR et PostPCR).

Pôle Biologie Médicale et Pathologie

	SFTPA2 : PCR-SEQUENCAGE (Manuel et Robot) Armand Trousseau – Génétique UA3616-UG366 – Mode opératoire TRS-GM-ANA-Mx - V. 1
	Date d'application : 19-09-2012

Rédaction	Approbation	Validation
Nom : Laurie GALERON Signature : Date : 19-09-2012	Nom : Signature : Date :	Nom : Signature : Date :

Version	Date de création ou de révision	Objet de la modification
1	19-09-2012	Version initiale
2	16-10-2015	V2 : nouvelle amorce reverse de PCR

Mots clés : PPD (Pathologies Parenchymateuses Diffuses), SFTPA2 (surfactant, pulmonary-associated protein A2), PCR, séquençage

VI. *OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION*

- criblage de la totalité des exons codants et de leurs jonctions introniques flanquantes (environ 30 pb) chez les cas index
- Recherche d'une mutation particulière chez les apparentés

VII. *PERSONNES CONCERNEES*

- les techniciens, ingénieurs et biologistes du service

VIII. *DOCUMENTS DE REFERENCE*

- Réalisation d'une PCR
- Préparation d'un gel d'agarose
- Contrôle des produits de PCR par dépôts sur gel
- Purification des PCR par ExoSAP
- Séquençage
- Purification des séquences
- Utilisation de l'automate Hamilton « MICROLAB STARLET »
- Purification des séquences

IX. *TERMINOLOGIE*

- PCR : polymerase chain reaction

- Pb : paire de bases
- F : forward
- R : reverse

X. DESCRIPTION DU PROCESSUS

1) AMPLIFICATION PAR PCR

- Amorces utilisées :

Exon	Nom des amorces*	Séquence 5'-3'	Orientation	Taille de l'amplicon (pb)
Exon 3-6	SFPA2_ex3F	CTGTGAGAGGGTCATCACCC	sens	3295
	SFPA2_6R2	TGATGGCACTGGGCAGGCAG	antisens	

* les solutions mères des amorces à 100 pmol/μl sont conservées à -20°C dans le congélateur P0/C1.

* les mix primers (F+R) à 5 pmol/μl chacun sont conservés à -20°C dans le congélateur P2/C1.

- Amplification :

1) Mix réactionnel : mix Phusion

Réactif	Concentration	Volume (μl)
Master Mix Taq Phusion with GC Buffer	2X	20
Mix primers F/R	5 pmol/μl chacun	3,2
DMSO		1
H2O		11,8 qsp 40 μl
ADN	50 ng/μl	4 μl

2) Conditions d'amplification :

Température	Durée
98°C	30 s
98°C	10 s
65°C	10 s
72°C	1 min 30 s
72°C	7 min
10°C	∞

- Vérification des PCR :

Déposer 5μl de chaque PCR avec le tampon de charge (3μl) sur un gel d'agarose 1% (cf. protocole « Préparation d'un gel d'agarose » et « Contrôle des produits de PCR par dépôt sur gel ») en présence d'un marqueur de poids moléculaire et d'un témoin négatif et positif.

- Purification des PCR :

Cf. protocole « purification de PCR par ExoSAP »

3) SEQUENCAGE

- Amorces de séquences utilisées :

Exon	Nom des amorces*	Séquence 5'-3'	Orientation
Exon 2 NC	SFTP2A2_Ex2seqR	CCCGGGAAAATTCCAAGCATC	antisens
Exon 3	SFTP2A2_Ex3seqR1	GGGCTGGCTCAGCTATCA	antisens
	SFTP2A2_Ex3seqR2	GACTCGATGCCATTATCAC	antisens
Exon 4	SFTP2A2_Ex4seqF1	TGATAGCTGAGCCAGCCC	sens
	SFTP2A2_Ex4seqF2	TATGATGGCGCATCCTGGAG	sens
Exon 5	SFTP2A2_Ex5seqF1	ATGAAAGGGCAGAGTTCCAG	sens
	SFTP2A2_Ex5seqR1	CCTAGGATTCAGTGAAAGC	antisens
Exon 6	SFTP2A2_Ex6seqF1	AGGCAGAGATGGAGAGACTG	sens
	SFTP2A2_Ex6seqR1	CAAGTGAATTCTGTTGAAAG	antisens

* les solutions mères des amorces à 100 pmol/µl sont conservées à -20°C dans le congélateur P0/C1.

* les dilutions à 5 pmol/µl sont conservées à -20°C dans le congélateur P2/C1.

- Préparation des séquences :

Cf. protocoles « séquençage » puis « purification de séquences »

Le Mix de séquence peut être réalisé par les automates Hamilton « MICROLAB STARLET » (Robot PréPCR et PostPCR)

	SFTPD : PCR-SEQUENCAGE (Manuel et Robot) Armand Trousseau – Génétique UA3616-UG366 – Mode opératoire TRS-GM-ANA-Mx - V. 1
	Date d'application : 23/07/2013

Pôle Biologie Médicale et Pathologie

Rédaction	Approbation	Validation
Nom : Alice de LIGNIVILLE Signature : Date : 19-09-2012	Nom : Signature : Date :	Nom : Signature : Date :

Version	Date de création ou de révision	Objet de la modification
1	23/07/2013	Version initiale

Mots clés : PPD (Pathologies Parenchymateuses Diffuses), SFTPD (surfactant, pulmonary-associated protein D), PCR, séquençage

XI. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

- criblage de la totalité des exons codants et de leurs jonctions introniques flanquantes (environ 30 pb) chez les cas index
- Recherche d'une mutation particulière chez les apparentés

XII. PERSONNES CONCERNEES

- les techniciens, ingénieurs et biologistes du service

XIII. DOCUMENTS DE REFERENCE

- Réalisation d'une PCR
- Préparation d'un gel d'agarose
- Contrôle des produits de PCR par dépôts sur gel
- Purification des PCR par ExoSAP
- Séquençage
- Purification des séquences
- Utilisation de l'automate Hamilton « MICROLAB STARLET »
- Purification des séquences

XIV. TERMINOLOGIE

- PCR : polymerase chain reaction
- Pb : paire de bases
- F : forward

- R : reverse

XV. DESCRIPTION DU PROCESSUS

1) AMPLIFICATION PAR PCR

- Amorces utilisées :

Exon	Nom des amorces*	Séquence 5'-3'	Orientation	Taille de l'amplicon (pb)
Exon 2	SFTPD_ex2F	CATGCTCTCCATCCAGACCT	sens	787
	SFTPD_ex2R	CCCACCCTTCATGCAGTAG	antisens	
Exon 3-5	SFTPD_ex3F	CATAGAAGGTCAGGCAGGTC	sens	1347
	SFTPD_ex5R	CTCCCTAGATAGGAACAGTCCC	antisens	
Exon 6-7	SFTPD_ex6F	GGTTAGTTGTTGGGTGGCG	sens	1365
	SFTPD_ex7R	TAGTTCAGGAGCCTGATGGC	antisens	
Exon 8	SFTPD_ex8F	GGGCTGTTCTGGAACAATCTC	sens	774
	SFTPD_ex8R	ATAGGGAAAGTAGGCTGGCC	antisens	

* les solutions mères des amorces à 100 pmol/μl sont conservées à -20°C dans le congélateur P0/C1.

* les mix primers (F+R) à 5 pmol/μl chacun sont conservés à -20°C dans le congélateur P2/C1.

- Amplification :

4) Mix réactionnel : mix Promega

Réactif	Concentration	Volume (μl)
Master Mix GreenGoTaq	2X	20
Mix primers F/R	5 pmol/μl chacun	3,2
H2O		12,8 qsp 40 μl
ADN	50 ng/μl	4 μl

Le Mix réactionnel peut être réalisé par l'automate Hamilton « MICROLAB STARLET » (Robot PréPCR)

2) Conditions d'amplification :

Température	Durée
94°C	5 min
94°C	30 s
62°C	30 s
72°C	1 min 30 s
72°C	7 min
10°C	∞

- Vérification des PCR :

Déposer 5μl de chaque PCR sur un gel d'agarose 1% (cf. protocole « Préparation d'un gel d'agarose » et « Contrôle des produits de PCR par dépôt sur gel ») en présence d'un marqueur de poids moléculaire et un témoin positif et négatif.

- Purification des PCR :

Cf. protocole « purification de PCR par ExoSAP »

2) SEQUENCAGE

- Amorces de séquences utilisées :

Exon	Nom des amorces*	Séquence 5'-3'	Orientation
Exon 2	SFTPD_Ex2seqF	TGGATTCCTGCTGCTCTAGG	sens
	SFTPD_Ex2seqR	AAACACGTCTCCAGACTCC	antisens
Exon 3	SFTPD_Ex3seqF2	TTTCCTGGATCACCCTGGG	sens
	SFTPD_Ex3seqR	TGTGTCTCCCAACAGCAG	antisens
Exon 4	SFTPD_Ex4seqF	ACAGATGGGACCTGCTGTTG	sens
	SFTPD_Ex4seqR	TGGCAAGCCTTTCAGCATC	antisens
Exon 5	SFTPD_Ex5seqF	ATTTTCCTCTCACCTCCAC	sens
	SFTPD_Ex5seqR	ATTCTCTCCATGTCCAGCG	antisens
Exon 6	SFTPD_Ex6seqR1	CTGCCATTAATGGGGCACAC	antisens
	SFTPD_Ex6seqR2	TGTCCGCCTTTCCTGAGTT	antisens
Exon 7	SFTPD_Ex7seqF	GCCAGCTGTGTCAGTAGATG	sens
	SFTPD_Ex7seqR	CTTGGATCTACTTTGAGCTCC	antisens
Exon 8	SFTPD_Ex8seqF	CTGTTTGGGAGGTCTGAAAG	sens
	SFTPD_Ex8seqR2	TGGCCACATTCTGGAGAGAA	antisens

* les solutions mères des amorces à 100 pmol/μl sont conservées à -20°C dans le congélateur P0/C1.

* les dilutions à 5 pmol/μl sont conservées à -20°C dans le congélateur P2/C1.

- Préparation des séquences :

Cf. protocoles « séquençage » puis « purification de séquences »

Le Mix de séquence peut être réalisé par les automates Hamilton « MICROLAB STARLET » (Robot PréPCR et PostPCR).

Annexe 7 : Communication au congrès de l'European Respiratory Society, Amsterdam, septembre 2015 : Genetic testing in idiopathic interstitial pneumonia: Surfactant system involvement in pediatric and adult patients

Genetic testing in idiopathic interstitial pneumonia: Surfactant system involvement in pediatric and adult patients

Nadia Nathan^{1,2}, Raphaël Borie³, Caroline Kannengiesser⁴, Florence Dastot-Le Moal¹, Hilario Nunes⁵, Dominique Valeyre⁵, Martine Reynaud-Gaubert⁶, Sylvain Marchand-Adam⁷, Jean-Marc Naccache⁸, Grégoire Prévot⁹, Guillaume Lezmi¹⁰, Christophe Delacourt¹⁰, Dominique Israël Biet¹¹, Caroline Thumerelle¹², Antoine Deschildre¹², Christophe Marguet¹³, Philippe Reix¹⁴, Vincent Cottin¹⁵, Marie-Laure Dalphin¹⁶, Anne Gondouin¹⁷, Clément Picard¹⁸, Violaine Girault¹⁹, Claire Dromer²⁰, Valérie Nau¹, Sylvie Tissier¹, Lamisse Mansour Hendifi¹, Marie Legendre¹, Laurent Gouya²¹, Bruno Crestani³, Annick Clement^{1,2}, Serge Amselem¹

¹ Department of genetics and embryology and UMR-9333, AP-HP Hôpital Armand Trousseau, INSERM, Université Paris Sorbonne Pierre et Marie Curie-Paris06, Paris, France; ² Pediatric Pulmonary Department and Reference centre for Rare lung diseases, AP-HP Hôpital Armand Trousseau, Paris, France; ³ Pulmonary Department, AP-HP Hôpital Bichat Claude Bernard, Paris, France; ⁴ Department of Genetics, AP-HP Hôpital Bichat Claude Bernard, Paris, France; ⁵ Pulmonary Department, AP-HP Hôpital Avicennes, Bobigny, France; ⁶ Pulmonary Department, AP-HP, Marseille, France; ⁷ Pulmonary Department, CHU Tours, Tours, France; ⁸ Pulmonary Department, AP-HP Hôpital Tenon, Paris, France; ⁹ Pulmonary Department, CHU Toulouse, Toulouse, France; ¹⁰ Pediatric Pulmonary Department, AP-HP Hôpital Necker Enfants Malades, Paris, France; ¹¹ Pulmonary Department, AP-HP Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France; ¹² Pediatric Pulmonary Department, CHU Lille, Lille, France; ¹³ Pediatric Pulmonary Department, CHU Rouen, Rouen, France; ¹⁴ Pediatric Pulmonary Department, CHU Lyon, Bron, France; ¹⁵ Pulmonary Department, CHU Lyon, Bron, France; ¹⁶ Pediatric Pulmonary Department, CHU Besançon, Besançon, France; ¹⁷ Pulmonary Department, CHU Besançon, Besançon, France; ¹⁸ Pulmonary Department, Hôpital Foch, Suresnes, France; ¹⁹ Pulmonary Department, AP-HP Hôpital Ambroise Paré, Boulogne Billancourt, France; ²⁰ Pulmonary Department, CHU Bordeaux, Pessac, France and ²¹ UMR_S1149, INSERM, CNRS ERL 8252, Université Paris Diderot, Paris, France.

INTRODUCTION

Idiopathic interstitial pneumonia (IIP) are severe diseases that can occur from infancy to elderly. In adults, the most common and severe form of the disease is idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), diagnosed mainly after the age of 50.

In children, a genetic cause is found in less than 20% of the cases. It mainly involves the *SFTPB*, *SFTPC*, and *ABCA3* genes encoding the hydrophobic surfactant proteins (SP)-B, SP-C, and their transporter, the ATP-binding cassette family A member 3 (*ABCA3*) (1,2).

In adults, up to 20% of the cases declare a first degree relative history of IPF (3-5). A genetic cause of the IPF is identified in about 2% of sporadic cases, and up to 20% in familial cases, with mutations in the telomerase genes (telomerase reverse transcriptase (*TERT*) and telomerase RNA component (*TERC*) being the first etiology (=15% cases)) (6-8). More recently, cases of IIP and IPF related to *SFTPA2* (encoding the surfactant protein SP-A2), *SFTPC* and *ABCA3* mutations have been reported, mostly in familial cases and/or in young patients (9,10).

The launch of RespiFIL, the French national pediatric and adult network for rare lung diseases, is a unique opportunity to collect national data from patients suffering from IIP and IPF. So far, the place of genetic testing in IIP and IPF remains puzzling. The RespiFIL network proposes standardized procedures for the diagnosis and treatment of IPF / IIP. In the current study, we aim to identify the relevance of a systematic surfactant genetic testing in familial or early-onset cases of IIP with no mutation of the telomerase complex genes.

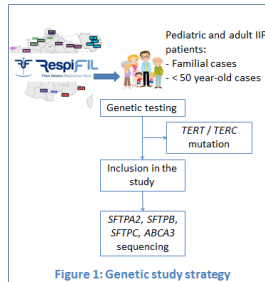


Figure 1: Genetic study strategy

PATIENTS, MATERIALS AND METHODS (Figure 1)

The study was proposed to the patients followed in one of the RespiFIL centres for:

- A familial form of IIP or IPF
- An early-onset of the IIP or IPF (children or adult before the age of 50)

The study was approved by the French "Comité de Protection des Personnes", and each patient (or the parents for minor individuals) give his/her written informed consent.

The clinician in charge of the patient filled a standardized clinical form. Patient DNA was isolated from blood using the Flexigene (Quiagen) method. For adult patients, *TERT* and *TERC* mutations were first search for. In the absence of mutation, the following genes (all the coding exons and their flanking intronic junctions) were analyzed by Sanger method: *SFTPA2*, *SFTPB*, *SFTPC*, and *ABCA3* (Table 1).

Table 1: Characteristics of the studied genes / proteins

	Inheritance pattern	Number of coding exons	Protein length
<i>SFTPA2</i>	Dominant	4	248 aa
<i>SFTPB</i>	Recessive	10	393 aa
<i>SFTPC</i>	Dominant	5	197 aa
<i>ABCA3</i>	Recessive	30	1704 aa

RESULTS (Tables 2 and 3, Figure 2)

265 unrelated families (369 patients) were included. Forty-six cases (17 %) were familial cases. In 104 families (39 %), the patient included was a child at the time of the diagnosis.

A genetic cause was identified in 17 families (6.4 %) including 4 familial cases:

- 9 children under the age of 2
- 8 adults aged 28 to 58 years old

- *SFTPA2* heterozygous mutations were found in 3 adult patients aged 29 to 54.
- No *SFTPB* homozygous mutation was found.
- *SFTPC* heterozygous mutations were found in 9 patients: 5 children under the age of 2, and 4 adults aged 28 to 58.
- *ABCA3* homozygous or compound heterozygous mutations were found in 5 patients: 4 children under the age of 1, and 1 adult aged 32.

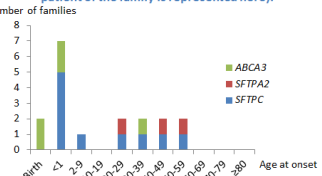
Table 2: Summary of the found mutations in the included families' samples

	Total index cases (n=265)	Children (n=104)	Adults (n=161)	Family history (n=46)	No family history (n=219)
<i>SFTPA2</i> (heterozygous)	3 1.1%	0 0%	3 1.8%	2 1	1
<i>SFTPB</i> (homozygous or compound heterozygous)	0 0%	0 0%	0 0%	0 0	0
<i>SFTPC</i> (heterozygous)	9 3.4%	5 4.8%	4 2.5%	1 8	8
<i>ABCA3</i> (homozygous or compound heterozygous)	5 1.9%	4 3.8%	1 0.6%	1 4	4
TOTAL	17 6.4%	9 8.6%	8 4.9%	4	13

Table 3: Variations found in the included families' samples

Variations	Location (Exon)	Number of families
<i>SFTPA2</i> C26Y heterozygous	3	3
Y228C heterozygous	6	6
R242Q heterozygous	6	6
<i>SFTPC</i> M60I heterozygous	2	2
I73T heterozygous	3	3
R167Q heterozygous	5	5
L194P heterozygous	5	5
<i>ABCA3</i> R208W and R1521W compound heterozygous	8 / 30	8
F107H homozygous	22	22
G97AD and A1027P double homozygous	21 / 22	21
E292V and I690K compound heterozygous	9 / 17	9
D115E and D253H double homozygous	6 / 8	6

Figure 2: Age at onset of the idiopathic interstitial pneumonia for the families in which a surfactant metabolism gene mutation was found (the youngest patient of the family is represented here).



DISCUSSION and CONCLUSION

In this selected population of IIP with no mutations of the telomerase complex, a mutation in the surfactant metabolism system has been identified in a significant part of independent cases (17/265 = 6.4%), not only in familial cases (3/46 = 8.7%), but also in sporadic cases (5.9%), in children (8.6%) and adults (4.9%).

Although surfactant disorders are usually considered as pediatric diseases, this study unveils that half of the cases are diagnosed in adults patients, providing support for a systematic genetic testing at all ages (1,12). Moreover, this screening should also be proposed in non-familial IIP cases.

Overall, a genetic cause of IIP in children and adults is identified in a significant proportion of independent cases. These data point to the need for a genetic counseling, that could be tricky in those rare and heterogeneous diseases.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by the Legs Poix from the Chancellerie des Universités, Paris (grants 1305 and 1405).

REFERENCES

- Whitsett JA, et al. Alveolar surfactant homeostasis and the pathogenesis of pulmonary disease. *Annu Rev Med* 2010; 61: 105-119.
- Flamein F, et al. Molecular and cellular characteristics of ABCA3 mutations associated with diffuse parenchymal lung diseases in children. *Hum Mol Genet* 2012; 21(4): 765-775.
- García-Sánchez C, et al. Familial pulmonary fibrosis is the strongest risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med* 2011; 105(12): 1902-1907.
- Borie R, et al. Familial pulmonary fibrosis. *Rev Mal Respir* 2015 Apr; 32(4): 413-34.
- Schofield MB, et al. Use of a genealogical database demonstrates heritability of pulmonary fibrosis. *Lung* 2013; 191(5): 475-481.
- Diaz de Leon A, et al. Telomere lengths, pulmonary fibrosis and telomerase (TERT) mutations. *PLoS One* 2010; 5(5): e10680.
- Cogan JD, et al. Rare variants in RTEL1 are associated with familial interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2015; 191(6): 646-655.
- Kannengiesser C, et al. Heterozygous RTEL1 mutations are associated with familial pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2015; 46(2): 474-485.
- van Moorsel CH, et al. Surfactant protein C mutations are the basis of a significant portion of adult familial pulmonary fibrosis in a dutch cohort. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182(11): 1419-1425.
- Wang Y, et al. Genetic defects in surfactant protein A2 are associated with pulmonary fibrosis and lung cancer. *Am J Hum Genet* 2009; 84(1): 52-59.
- Knopik JA, et al. Extensive Phenotyping of Individuals At-risk for Familial Interstitial Pneumonia Reveals Clues to the Pathogenesis of Interstitial Lung Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 191(4): 417-426.
- Coghlan MA, et al. Sequencing of idiopathic pulmonary fibrosis-related genes reveals independent single gene associations. *BMJ Open Respir Res* 2014; 1(1): e000057.

Annexe 8 : Communication aux Assises de génétique, Lyon, février 2016 (Prix de Poster de la Fédération Française de Génétique Humaine) : Contribution des mutations des gènes impliqués dans le métabolisme du surfactant aux pneumopathies interstitielles diffuses (PID) de l'enfant et de l'adulte dans une cohorte de 265 familles – Identification d'un nouveau gène de PID.

Contribution des mutations des gènes impliqués dans le métabolisme du surfactant aux pneumopathies interstitielles diffuses (PID) de l'enfant et l'adulte dans une cohorte de 266 familles – Identification d'un nouveau gène de PID

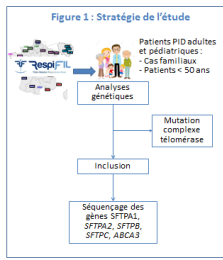
Nadia Nathan^{1,2}, Raphaël Borie³, Caroline Kannegiesser⁴, Florence Dastot-Le Moal¹, Hilario Nunes⁵, Dominique Valeyre⁵, Martine Reynaud-Gaubert⁶, Sylvain Marchand-Adam⁷, Jean-Marc Naccache⁸, Grégoire Prévot⁹, Guillaume Lezmi¹⁰, Christophe Delacourt¹⁰, Dominique Israël-Biet¹¹, Caroline Thumerelle¹², Antoine Deschildre¹², Christophe Marguet¹³, Philippe Reix¹⁴, Vincent Cottin¹⁵, Marie-Laure Dalphin¹⁶, Anne Gondouin¹⁷, Clément Picard¹⁸, Violaine Girault¹⁹, Claire Dromer²⁰, Valérie Nau¹, Sylvie Tissier¹, Lamisse Mansour Hendili¹, Marie Legendre¹, Laurent Gouya²¹, Bruno Crestani³, Annick Clement^{1,2}, Serge Amsellem¹

1 Service de Génétique et embryologie médicale, et UMR-S933, AP-HP Hôpital Armand Trousseau, INSERM, Université Paris Sorbonne Paris et Marie Curie-Paris06, Paris, France; 2 Service de Pneumologie Pédiatrique et Centre de Référence des Maladies Respiratoires Rares, AP-HP Hôpital Armand Trousseau, Paris, France; 3 Service de Pneumologie, AP-HP Hôpital Bicêtre Claude Bernard, Paris, France; 4 Service de Génétique, AP-HP Hôpital Bicêtre Claude Bernard, Paris, France; 5 Service de Pneumologie, AP-HP Hôpital Avicennes, Bobigny, France; 6 Service de Pneumologie, AP-HM, Marseille, France; 7 Service de Pneumologie, CHU Tours, Tours, France; 8 Service de Pneumologie, AP-HP Hôpital Tenon, Paris, France; 9 Service de Pneumologie, CHU Toulouse, Toulouse, France; 10 Service de Pneumologie Pédiatrique, AP-HP Hôpital Necker Enfants Malades, Paris, France; 11 Service de Pneumologie, AP-HP Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France; 12 Service de Pneumologie Pédiatrique, CHU Lille, Lille, France; 13 Service de Pneumologie Pédiatrique, CHU Rouen, Rouen, France; 14 Service de Pneumologie Pédiatrique, CHU Lyon, Lyon, France; 15 Service de Pneumologie, CHU Besançon, Besançon, France; 16 Service de Pneumologie, CHU Besançon, Besançon, France; 17 Service de Pneumologie, Hôpital Foch, Suresnes, France; 18 Service de Pneumologie, AP-HP Hôpital Ambroise Paré, Boulogne-Billancourt, France; 19 Service de Pneumologie, CHU Bordeaux, Bordeaux, France; 20 UMR-S1349, INSERM, CHU St-Etienne, Université Paris Diderot, Paris, France.

INTRODUCTION

Les pneumopathies interstitielles diffuses (PID) et fibroses pulmonaires idiopathiques (FPI) représentent un groupe de pathologies sévères qui peuvent s'exprimer chez l'enfant comme chez l'adulte. Chez l'enfant, une cause génétique est retrouvée dans moins de 20 % des cas, impliquant principalement les gènes *SFTPB*, *SFTPC*, et *ABCA3* qui codent pour des protéines hydrophobes du surfactant (SP)-B, SP-C, et leur transporteur, l'ATP-binding cassette famille A membre 3 (*ABCA3*) (1,2). Chez le patient adulte, environ 20 % des patients rapportent un apparenté au premier degré avec FPI (3-5). Une cause génétique de FPI est retrouvée dans environ 2 % des cas sporadiques, et jusqu'à 20% des cas familiaux, avec une mutation d'un des gènes du complexe des télomérasés (télomérase reverse transcriptase (*TERT*), télomérase RNA component (*TERC*), et *RTEL1*) (6-8). Récemment, des mutations des gènes *SFTPA2* (qui code pour la protéine SP-A2), *SFTPC* et *ABCA3* ont été associées à des formes familiales ou précoces de PID ou de FPI (9,10).

La création de RespiFIL, la filière de santé nationale des maladies respiratoires rares de l'enfant et de l'adulte, est une opportunité unique de constituer une base de données phénotypique et génétique de patients présentant une PID. La filière RespiFIL permet de standardiser les procédures diagnostiques et thérapeutiques pour les PID. Cette étude vise à identifier l'intérêt d'une étude génétique systématique du complexe du surfactant dans des cas familiaux ou précoces de PID / FPI, sans mutation retrouvée de l'un des gènes du complexe des télomérasés.



PATIENTS, MATERIEL ET METHODES (Figure 1)

L'étude, approuvée par le "Comité de Protection des Personnes", a été proposée aux patients suivis dans l'un des centres de la filière RespiFIL pour :
 - Une forme familiale de PID ou de FPI
 - Une forme précoce de PID ou de FPI (enfant, ou adulte de moins de 50 ans)
 Le clinicien en charge du patient remplit une fiche de renseignements cliniques standardisée. Pour les patients adultes, les mutations des gènes du complexe des télomérasés ont d'abord été éliminées. Les gènes suivants (exons codants et régions introniques flanquantes) ont été analysés par séquençage Sanger : *SFTPA2*, *SFTPB*, *SFTPC*, et *ABCA3*. *SFTPA1*, à ce jour non impliqué dans les PID, a également été analysé chez les patients avec antécédent personnel et/ou familial de cancer pulmonaire (Table 1).

Table 1 : Caractéristiques des gènes et des protéines étudié(e)s

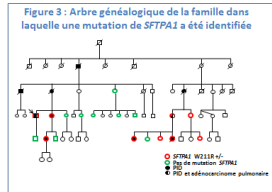
Gène	Mode de transmission	Nombre d'exons codants	Taille protéine (aa)
<i>SFTPA1</i>	Dominant	4	248 aa
<i>SFTPA2</i>	Dominant	4	248 aa
<i>SFTPB</i>	Récessif	10	393 aa
<i>SFTPC</i>	Dominant	5	197 aa
<i>ABCA3</i>	Récessif	30	1704 aa

RESULTATS (Tables 2 et 3, Figure 2)

266 familles indépendantes (378 patients) ont été incluses. Quarante-sept cas (18 %) étaient des cas familiaux. Dans 104 familles (39%), le patient index était un enfant au moment du diagnostic.

Une cause génétique a été identifiée chez 26 individus issus de 18 familles (6,7 %) :
 - 11 enfants âgés de 7 mois à 14 ans
 - 15 adultes âgés de 27 à 58 ans

Une mutation hétérozygote de *SFTPA1* dont le caractère pathogène a été démontré par des études fonctionnelles, a été identifiée chez 9 individus, âgés de 7 mois à 57 ans. Il s'agit de la première implication de ce gène dans les PID associées à des adénocarcinomes pulmonaires (Figure 3) (11).



- Une mutation hétérozygote de *SFTPA2* a été identifiée chez 3 patients adultes, âgés de 29 à 54 ans.
- Aucune mutation homozygote ou hétérozygote composite de *SFTPB* n'a été mise en évidence.
- Une mutation hétérozygote de *SFTPC* a été identifiée chez 9 patients : 5 enfants de moins de 2 ans, et 4 adultes âgés de 28 à 58 ans.
- Une mutation homozygote ou hétérozygote composite de *ABCA3* a été identifiée chez 5 patients : 4 enfants de moins de 1 an, et un adulte âgé de 32 ans.

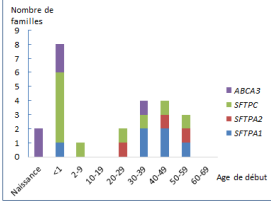
Table 2 : Résumé des mutations identifiées pour les cas index des familles incluses

	Cas index (n=266)	Cas index enfants (n=104)	Cas index adultes (n=162)	Forme familiale (n=47)	Forme sporadique (n=219)
<i>SFTPA1</i> (hétérozygote)	1 0,3%	0 0%	1 0,6%	1	0
<i>SFTPA2</i> (hétérozygote)	3 1,1%	0 0%	3 1,8%	2	1
<i>SFTPB</i> (homozygote ou hétérozygote composite)	0 0%	0 0%	0 0%	0	0
<i>SFTPC</i> (hétérozygote)	9 3,4%	5 4,8%	4 2,5%	1	8
<i>ABCA3</i> (homozygote ou hétérozygote composite)	5 1,9%	4 3,8%	1 0,6%	1	4
TOTAL	18 6,7%	9 8,6%	9 5,5%	5	13

Table 3 : Variations identifiées dans les familles

Gène	Variations	Position (Exon)
<i>SFTPA1</i>	W211R hétérozygote	6
<i>SFTPA2</i>	C26V hétérozygote	3
	Y228C hétérozygote	6
	R242Q hétérozygote	6
<i>SFTPC</i>	M50I hétérozygote	2
	I72I hétérozygote	3
	R167Q hétérozygote	5
	L194P hétérozygote	5
<i>ABCA3</i>	R208W et R1521W hétérozygote composite	8 / 30
	F307I homozygote	22
	G974D et A1027P 2 mutations homozygotes	21 / 22
	E392V et E690K hétérozygote composite	9 / 17
	D115E et D253H 2 mutations homozygotes	6 / 8

Figure 2 : Age au diagnostic de PID des patients pour lesquels une mutation d'un gène du complexe du surfactant a été identifiée



DISCUSSION et CONCLUSION

Dans cette cohorte de PID sans mutation retrouvée dans les gènes du complexe des télomérasés, une mutation de l'un des gènes du complexe du métabolisme du surfactant a été identifiée dans une proportion significative de cas indépendants (18/266 = 6,7 %), non seulement dans des cas familiaux (5/47 = 10,6 %), mais aussi dans des cas sporadiques (5,9 %), chez l'enfant (8,6 %) et chez l'adulte (5,6 %).

Alors que les anomalies du métabolisme du surfactant sont généralement considérées comme des pathologies pédiatriques, cette étude met en évidence que la moitié des cas sont diagnostiqués chez des patients adultes. Ceci apporte des arguments en faveur d'une étude génétique systématique des gènes du complexe du surfactant, à tout âge, et dans les formes familiales ou non de PID (12, 13).

Cette étude a aussi permis de révéler l'implication du gène *SFTPA1* dans les PID, dans une forme associée à des adénocarcinomes pulmonaires (11).

Ces données soulèvent la nécessité d'un conseil génétique, qui peut s'avérer délicat pour ces maladies dont l'expressivité peut être très variable.

REMERCIEMENTS
 Cette étude a été soutenue par l'Inserm et le Legs Poix de la Chancellerie des Universités de Paris (n°1305 et 1405).

REFERENCES
 1. Whitsett JA, et al. Alveolar surfactant homeostasis and the pathogenesis of pulmonary disease. *Annu Rev Med* 2010; 61: 105-119.
 2. Flamen F, et al. Molecular and cellular characteristics of ABCA3 mutations associated with diffuse parenchymal lung diseases in children. *Hum Mol Genet* 2012; 21(4): 765-775.
 3. Garcia-Sancho C, et al. Familial pulmonary fibrosis is the strongest risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med* 2011; 105(12): 1902-1907.
 4. Borie R, et al. Familial pulmonary fibrosis. *Rev Mal Respir* 2015 Apr; 32(4): 413-34.
 5. Scholand MB, et al. Use of a genealogical database demonstrates heritability of pulmonary fibrosis. *Lung* 2013; 191(5): 475-481.
 6. Diaz de Leon A, et al. Telomere lengths, pulmonary fibrosis and telomerase (TERT) mutations. *PLoS One* 2010; 5(5): e10680.
 7. Cogan JD, et al. Rare variants in RTEL1 are associated with familial interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2015; 191(6): 646-655.
 8. Kannegiesser C, et al. Heterozygous RTEL1 mutations are associated with familial pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2015; 46(2): 474-485.
 9. van Moorsel CH, et al. Surfactant protein C mutations are the basis of a significant portion of adult familial pulmonary fibrosis in a dutch cohort. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182(11): 1419-1425.
 10. Wang Y, et al. Genetic defects in surfactant protein A2 are associated with pulmonary fibrosis and lung cancer. *Am J Hum Genet* 2006; 84(1): 50-58.
 11. Nathan N, et al. Germline SFTPA1 mutation in familial idiopathic interstitial pneumonia and lung cancer. *Hum Mol Genet* 2016 (in press).
 12. Kropski JA, et al. Extensive Phenotyping of Individuals At-risk for Familial Interstitial Pneumonia Reveals Clues to the Pathogenesis of Interstitial Lung Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 191(4): 417-426.
 13. Coghlan MA, et al. Sequencing of idiopathic pulmonary fibrosis-related genes reveals independent single gene associations. *BMJ Open Respir Res* 2014; 1(1): e000057.



Fédération Française
de Génétique Humaine

Président : **Didier Lacombe**

Secrétaire générale : **Anne Moncla**

Trésorier : **Dominique Bonneau**

Angers le 10 février 2016

Cher Madame,

Je vous prie de bien vouloir trouver ci-joint un chèque 500€ de la part de FFGH venant en récompense du prix du meilleur poster que vous a été décerné lors des Assises de Génétique Humaines et Médicale 2016.

Je vous adresse mes félicitations personnelles pour ce prix et vous remercie de bien vouloir me retourner le reçu ci-joint dès réception de ce courrier.

Bien cordialement à vous

D Bonneau

Département de génétique médicale

CHU Angers

4 rue Larrey, 49933 Angers cedex9

Annexe 9 : Communications au Congrès de l'American Thoracic Society, San Francisco, mai 2016 :

A. Genetic testing in idiopathic interstitial pneumonia. Communication orale

B. *SFTPA1* mutation in familial interstitial pneumonia and cancer. Poster.

A. Genetic testing in idiopathic interstitial pneumonia. Communication orale

Nadia Nathan, Raphaël Borie, Caroline Kannengiesser, Florence Dastot-Le Moal, Hilario Nunes, Dominique Valeyre, Martine Reynaud-Gaubert, Sylvain Marchand-Adam, Jean-Marc Naccache, Grégoire Prévot, Guillaume Lezmi, Christophe Delacourt, Christophe Marguet, Dominique Israël Biet, Caroline Thumerelle, Antoine Deschildre, Philippe Reix, Vincent Cottin, Marie-Laure Dalphin, Anne Gondouin, Clément Picard, Violaine Girault, Claire Dromer, Marie Legendre, Laurent Gouya, Bruno Crestani, Annick Clement, Serge Amselem

Background: Idiopathic interstitial pneumonia (IIP)s are severe diseases that can occur from neonates to elderly. A genetic cause is identified in around 2% cases in sporadic cases, and up to 20% in familial cases, telomerase genes mutations being the first etiology. We aimed to identify the relevance of a systematic surfactant genetic testing in familial or sporadic early cases (before 50 years-old) of IIP with no telomerase gene mutations.

Methods: Patients were recruited through the French national network for rare lung diseases. All the surfactant system genes in which mutations has been involved in IIP were sequenced by Sanger method: genes encoding the surfactant proteins A2, B and C (*SFTPA2*, *SFTPB*, *SFTPC*), and their transporter, the ATP-binding cassette family A member 3 (*ABCA3*). A signed informed consent and a clinical form were obtained for each patient.

Results: A population of 369 patients (265 unrelated families) was included. Forty-six cases (17%) were familial, 104 were children at the time of the diagnosis. A genetic cause was identified for 17 unrelated patients (6.4% of the families): 9 children aged 0 to 1.5 years, and 8 adults aged 28 to 58 years, including familial and sporadic cases. Heterozygous *SFTPA2* mutations were found in 3 adult patients (aged 29 to 54); no *SFTPB* mutation was identified; a heterozygous *SFTPC* mutation was found in 9 patients (aged 0 to 58); and homozygous or compound heterozygous *ABCA3* mutations were found for 5 patients (aged 0 to 32).

In children, 4 had a *SFTPC* mutation, 3 had a homozygous or compound heterozygous *ABCA3* mutation. In adults, 2 had a *SFTPA2* mutation, 4 a *SFTPC* mutation and 2 an *ABCA3* mutation. In addition, 8 patients had a heterozygous *ABCA3* mutation.

Discussion: Despite surfactant disorders are commonly believed to be pediatric diseases, this study highlights that half of the cases are diagnosed in adults. *SFTPA2*, *SFTPC* and *ABCA3* study allows the identification of a genetic cause for around 6.5% of the families. These mutations are found either in adult and pediatric cases of IIP, in familial and sporadic cases. These results suggest that a systematic surfactant testing is of importance in the diagnosis of IIP in children, but also in adults, in sporadic and familial cases of IIP. This study also raises the genetic counseling issue that may be tricky in such rare and heterogeneous diseases.

B. *SFTPA1* mutation in familial interstitial pneumonia and cancer. Poster.

SFTPA1 mutation in familial idiopathic interstitial pneumonia and lung cancer

Nadia Nathan¹, Violaine Giraud¹, Clément Picard², Hilario Nunes¹, Florence Dastot-Le Moal¹, Philippe Duquesnoy¹, Bruno Copin¹, Martine Reynaud-Gaubert³, Dominique Valeyre¹, Louis-Jean Couderc², Thierry Chinet¹, Raphaël Borie¹, Bruno Crestani¹, Valérie Nau¹, Sylvie Tissier¹, Laurie Galeron¹, Alice de Ligniville¹, Nathalie Kuziner¹, Maud Simansour¹, Lamisse Mansour-Hendili¹, Marie Legendre¹, Caroline Kannengiesser¹, Aurore Coulomb L'Hermine¹, Laurent Gouya¹, Serge Amselem¹, Annick Clement¹

¹Assistance Publique Hôpitaux de Paris, INSERM, et Universités de Paris, France; ²Hôpital Foch, Suresnes, France; ³CNRS, Aix Marseille Université, France

Materials and Methods

Patients: Among the 172 unrelated patients retrieved from the database of the French national network of reference centers for rare lung diseases (RespiFIL), were included the patients with a personal or a first-degree relative history of lung cancer; and the absence of identified mutations in *SFTPB*, *SFTPC*, *ABCA3* and telomerase genes.

Genes sequencing: The 4 coding exons of *SFTPA1* (NM_005411.4) and *SFTPA2* (NM_001098668.2), and their flanking intronic junctions were sequenced by Sanger method.

Functional studies: Tagged WT and variant *SFTPA1* and *SFTPA2* pcDNA3 expression vectors were transfected into HEK293T human cells. Protein production and secretion were studied by WB and incubated with a monoclonal anti-HA (SP-A1) or anti-FLAG (SP-A2) high affinity antibody (Roche 3F10[®] and Sigma-Aldrich M218592), and an anti-mouse peroxidase antibody (Southern Biotech 1070-05). As a positive control, the F1985 mutation, previously described in *SFTPA2* was used.

Immunohistochemistry: Tissue samples from lung biopsies were analyzed by immunohistochemistry with a mouse SP-A monoclonal antibody (Abcam-32E12). A rabbit polyclonal anti-SP-C antibody (Santa Cruz-13979) was used as a control.

Introduction

Idiopathic interstitial pneumonias (IIPs) comprise a heterogeneous group of rare lung parenchyma disorders with high morbidity and mortality. In adult, the most common form of IIP, idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), has been associated with an increased frequency of lung cancer. The molecular basis of IIPs remains unknown in most cases. Telomerases complex genes are the main genetic etiology. Adult cases of IPF and lung cancer have been associated with surfactant protein (SP)-A2 gene (*SFTPA2*) mutations. **The aim of this study was to investigate *SFTPA1* and *SFTPA2* in families affected by IIP/IPF and lung cancer.**

Results

Identification of a *SFTPA1* mutation: 12 apparently unrelated patients were included (aged 30-78 years). In two patients who presented with IPF and lung adenocarcinoma, a *SFTPA1* heterozygous variation was found: **c.631T>C; p.Trp211Arg**. The family screening showed that the 2 patients were from the same family, and that 9 individuals aged 7 months to 52 years were carrying the W211R mutation, that segregated with a heterogeneous phenotype of IIP, IPF, and adenocarcinoma (Fig. 1).

Figure 1: Pedigree of the family with the identified *SFTPA1* mutation c.631T>C (W211R)
H: Haplotypes, H1 carrying the c.631T>C mutation

Figure 2: Identification of a *SFTPA1* mutation c.631T>C (W211R) in the CRD of SP-A1 and conservation of the involved residue throughout evolution.

Figure 3: Electrostatic properties of wild-type and mutated SP-A1 CRD proteins.

Figure 4: Effects of *SFTPA1* and *SFTPA2* variants on protein production and secretion.

The SP-A1 W211R mutation alters SP-A1 secretion (Fig. 4): No SP-A1 protein could be detected in the medium of cells transfected with W211R SP-A1 expression plasmids carrying the W211R or the F1985 missense variation. Similar data were obtained with a mutant form of SP-A2 carrying the W211R mutation.

The SP-A1 W211R mutation alters SP-A lung tissue expression: Patient V.11 displayed a severe diffuse interstitial fibrosis (*) with collapse of most alveolar spaces. SP-A staining was discontinuous (<) and mostly intra-cytoplasmic in the hyperplastic pneumocytes (->). This expression contrasted with the continuous linear layer of SP-A at the alveolar surface of the control specimen (Fig. 5).

Figure 5: SP-A expression on lung tissue from a patient carrying the SP-A1 W211R mutation

Discussion and conclusion

This study involves for the first time a germline mutation in *SFTPA1*, encoding SP-A1, in IIP and IPF. Individuals carrying the W211R mutation present heterogeneous phenotypes ranging from severe ILD occurring early in life to the association of IPF and lung cancer in adult patients. These data reinforce the idea that patients with familial and/or early cases of IIP/IPF should benefit from a surfactant genes analysis.

Acknowledgements
Ecole Doctorale SPA, Physiologie Pathologique et Thérapeutique, UPMC, Sorbonne Universités, Paris; Legs Poix from the Chancellerie des Universités, Paris (grants 1305 and 1405). The patient organisations RespiR'c'est Grandir and Belleherbe Association.

Contact: nadia.nathan@aphp.fr

Altérations de l'expression de la protéine A du surfactant dans les pneumopathies interstitielles diffuses

Introduction : Les pneumopathies interstitielles diffuses (PID), incluant les fibroses pulmonaires idiopathiques (FPI), sont des pathologies rares et sévères. Dans moins de 20% des cas, un défaut moléculaire d'un gène du complexe des télomérases ou du surfactant est identifié. L'objectif de ce travail a été de documenter, dans une cohorte de patients pédiatriques et adultes présentant une PID sans cause identifiée, des variations des gènes codant les protéines du surfactant (SP), en particulier SP-A1, SP-A2 et SP-D.

Méthodes : Les gènes du surfactant, en particulier *SFTPA1*, *SFTPA2* et *SFTPD*, ont été séquencés et les variations identifiées ont été étudiées par des analyses fonctionnelles et tissulaires.

Résultats : Dans une cohorte de 345 patients, une mutation hétérozygote du gène *SFTPA1* (p.Trp211Arg) a été identifiée dans une large famille. Les PID étaient isolées ou associées à des adénocarcinomes pulmonaires chez des patients avec FPI. La mutation W211R concerne un acide aminé invariant au cours de l'évolution, altère la sécrétion de SP-A1 et l'expression tissulaire de SP-A. Cinq nouvelles variations de *SFTPA2* ont aussi été identifiées. Au total, une variation de l'un des gènes du système du surfactant a été retrouvée pour 7,5% des patients.

Conclusion : Cette étude a permis d'impliquer pour la première fois le gène *SFTPA1* dans les PID de l'enfant et de l'adulte. L'association entre les mutations de *SFTPA1* et *SFTPA2* et un risque plus élevé de cancers pulmonaire soulève la question d'un conseil génétique complexe, et ouvre des hypothèses physiopathologiques nouvelles ciblant, entre autres, les anomalies de prolifération et de réparation de la surface alvéolaire.

Pneumopathie interstitielle diffuse ; fibrose pulmonaire idiopathique ; cancer broncho-pulmonaire ; génétique moléculaire ; surfactant ; collectines

Alteration of the Surfactant Protein A expression in idiopathic interstitial pneumonia

Background: Idiopathic interstitial pneumonias (IIP) comprise a heterogeneous group of rare lung parenchyma disorders with high morbidity and mortality. In adults, the most common form of IIP is idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). A genetic cause is identified in up to 20% of cases, telomerase and surfactant genes mutations being the first etiologies. This study aims to investigate the implication of the genes encoding the surfactant protein (SP), in particular SP-A1, SP-A2, and SP-D, in pediatric and adult patients with unexplained IIP.

Methods: Surfactant genes, in particular *SFTPA1*, *SFTPA2* and *SFTPD*, were sequenced. New variations were studied with functional and tissues experimentations.

Results: The study involved 345 patients. A heterozygous missense mutation (p.Trp211Arg) in *SFTPA1* was identified in a large family. The IIP were isolated or associated with an adenocarcinoma of the lung in patients with IPF. The W211R mutation involves an amino-acid that is invariant throughout evolution, impairs SP-A1 secretion, and is associated with an abnormal tissue expression of SP-A. Five new *SFTPA2* mutations were also identified, and all together, a surfactant gene variation was described for 7.5% of the patients.

Conclusion: This study has involved for the first time *SFTPA1* in pediatric and adult IIP. The association of *SFTPA1* and *SFTPA2* mutations with an increased risk of lung cancer raises the issue of a complex genetic counseling in the involved families. It also brings out new pathophysiologic hypothesis such as aberrant proliferation and epithelial repair of the alveolar surface.

Idiopathic interstitial pneumonia; idiopathic pulmonary fibrosis, lung cancer, molecular genetics, surfactant, collectins