

Université  
de Liège



ACADEMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE  
UNIVERSITE DE LIEGE  
FACULTE DE MEDECINE VETERINAIRE  
DEPARTEMENT DES SCIENCES CLINIQUES DES ANIMAUX DE COMPAGNIE ET DES  
EQUIDES  
PATHOLOGIE MEDICALE DES ANIMAUX DE COMPAGNIE

**ETUDE DE LA FIBROSE PULMONAIRE IDIOPATHIQUE CANINE :  
ANALYSE DU TRANSCRIPTOME, INVESTIGATION DES VOIES  
DU TGF BETA 1 ET RECHERCHE DE BIOMARQUEURS**

**CANINE IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS:  
TRANSCRIPTOME ANALYSIS, INVESTIGATION OF TGF BETA 1  
PATHWAYS AND SEARCH FOR BIOMARKERS**

**Emilie KRAFFT**

**THESE PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE  
DOCTEUR EN SCIENCES VETERINAIRES**

**ANNEE ACADEMIQUE 2014-2015**



## Remerciements

J'aimerais d'abord exprimer mon profond respect et toute ma gratitude à mon promoteur, le Professeur Cécile Clercx. Merci à elle de m'avoir confié ce travail et de m'avoir ensuite encadrée avec enthousiasme, patience et une grande disponibilité. Ses conseils, sa gentillesse et ses encouragements ont été des atouts précieux sans lesquels ce travail n'aurait jamais pu aboutir.

Merci au Professeur Kathleen Mc Entee, de l'Université Libre de Bruxelles, de m'avoir aidée tout le long de ce parcours avec bienveillance et disponibilité. Ses conseils toujours très judicieux ont largement permis d'améliorer ce travail.

Je tiens aussi à remercier mon co-promoteur, le Professeur Dominique Peeters, pour son apport scientifique et sa collaboration au cours de ce travail.

J'exprime toute ma reconnaissance Professeur Fabrice Bureau, pour sa disponibilité, pour le temps consacré à l'évaluation de ce travail et pour m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse : le Professeur Robert Naeije de l'Université Libre de Bruxelles, le Professeur Wim Wuyts de l'Université Catholique de Louvain, le Professeur Didier Cataldo, le Professeur Thierry Jauniaux, le Docteur Dimitri Pirotin et le Docteur Frédéric Billen d'avoir accepté de juger ce travail. Je remercie également le Docteur Laurent Gillet d'avoir accepté de présider ce jury de thèse.

Bien qu'il soit impossible de le faire de façon exhaustive, je souhaite remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce travail et sans qui tout ceci n'aurait pas été possible :

Au Professeur Michael Day, aux Docteurs Pascale Lybaert et Iain Peters pour leur grande disponibilité et leurs conseils avisés ;

A l'équipe finlandaise, Henna Heikkilä, Minna Rajamäki, Lisa Lilja-Maula, Marjukka Myllärniemi et Katri Koli pour leur collaboration au fil des années

A Pascal Jaspers, Grégory Vegh, Joëlle Piret et François Delvaux pour leur excellente assistance technique et leur aide précieuse.

A tous les membres du laboratoire au Giga, en particulier Christophe Desmet et Laurence Fievez pour leurs excellents conseils ;

A Morgane, Elise et Anne-Christine Merveille, pour l'entraide et les précieux conseils qui ont rythmé ces doctorats ;

A l'équipe de médecine interne, en particulier Maude, Morgane, Kiki et Marie. Merci d'avoir été là pour moi ces derniers mois et de m'avoir permis de consacrer du temps entre autre à cette thèse.

A mes parents.

## RESUME

---

La fibrose pulmonaire idiopathique canine (FPIc) est une affection fibrotique du parenchyme pulmonaire, majoritairement rencontrée chez le West Highland White Terrier (WHWT). Elle se traduit par une intolérance à l'effort et de la toux avec aggravation progressive jusqu'au décès de l'animal par insuffisance respiratoire. Ses caractéristiques cliniques, tomodensitométriques et histologiques ont été décrites récemment. Cette maladie reste toutefois très peu connue et le clinicien doit faire face à deux challenges majeurs : la confirmation du diagnostic, qui requiert de nombreux examens complémentaires, et l'absence d'un traitement efficace. Or, l'identification d'une thérapie ciblée est très difficile en l'absence d'une bonne compréhension des mécanismes conduisant à la fibrose du parenchyme pulmonaire. Une affection comparable est par ailleurs rencontrée chez l'homme, la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI), et la FPIc pourrait avoir un intérêt en tant que possible modèle spontané. Ce projet a donc été entrepris afin de répondre au moins partiellement à ces différents challenges. Ces objectifs étaient ainsi d'élucider certains mécanismes intervenant dans la pathogénie de la FPIc et d'identifier des biomarqueurs pouvant aider à son diagnostic. Les hypothèses de travail étaient tout d'abord que l'analyse du transcriptome au niveau pulmonaire par la technique des microdamiers permettrait d'identifier de grandes fonctions biologiques altérées lors de FPIc, de mettre en avant plus spécifiquement certaines molécules dont l'expression est fortement altérée et d'identifier des biomarqueurs potentiels. Une autre hypothèse était que les voies du « transforming growth factor beta 1 » (TGFB1), molécule centrale dans la pathogénie de la FPI chez l'homme, seraient également altérées lors de FPIc. Enfin, l'endothéline-1 (ET1), biomarqueur connu dans la FPI humaine, pourrait également avoir un intérêt en tant que biomarqueur chez le chien.

L'analyse du transcriptome au niveau pulmonaire, par la technique des microdamiers et grâce à l'utilisation d'un programme informatique d'analyse de données, a tout d'abord identifié différentes fonctions biologiques altérées lors de FPIc : la croissance, la prolifération, le mouvement et le développement cellulaires, le développement et le fonctionnement du système musculo-squelettique, le développement embryonnaire, la signalisation et les interactions intercellulaires et la présentation antigénique. Certains gènes mis en avant par cette analyse (particulièrement surexprimés ou sous-exprimés chez l'animal malade,) ont ensuite été étudiés individuellement. L'analyse par RT-PCR quantitative a confirmé une régulation positive de l'expression de CCL2, CCL7, CXCL14, IL8 et FAP (fibroblast activation protein) ainsi qu'une régulation négative de la PLUNC (palate, lung and nasal epithelium associated). Nous avons ensuite complété l'analyse du profil d'expression par une recherche de biomarqueurs potentiels. Trente-quatre biomarqueurs potentiels ont ainsi pu être identifiés dont 32 pourraient être mesurables dans le sang (dont le CCL2, l'amyloïde sérique 1 et l'IL8), et 2 uniquement dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire (LLBA) (PLUNC et mésothéline). La validité de cette approche a été confirmée par la mesure dans le sérum de l'un de ces biomarqueurs : le CCL2. Une concentration sérique plus élevée a été retrouvée chez les WHWT atteints en comparaison de WHWT sains. Elle était également plus élevée chez les chiens atteints de FPIc que chez ceux atteints de bronchite chronique (BC) ou de bronchopneumopathie éosinophilique (BPE) ; une FPIc étant diagnostiquée avec une sensibilité de 92% et une spécificité de 80%.

Nous avons ensuite étudié le TGFB1 et certaines de ses voies de stockage, d'activation et de signalisation. L'expression génique pour le TGFB1 n'était pas significativement différente au niveau du parenchyme pulmonaire entre des chiens atteints de FPIc et des chiens contrôles. Toutefois, lors de FPIc, des taux élevés de la protéine TGFB1 ont été mis en évidence par

immunohistochimie dans les zones fibrotiques. Les cellules épithéliales présentaient également une expression importante en récepteur de type I du TGFB1 et en Smad 2/3 phosphorylées, marqueur d'une activation de la signalisation intracellulaire du TGFB1. Aucune différence d'expression génique n'était notée entre des chiens atteints et des chiens contrôles pour les protéines de stockage LTBP1 et LTBP2 alors que l'expression de LTBP4 était significativement diminuée chez les chiens atteints. Concernant l'expression des protéines impliquées dans l'activation du TGFB1, l'expression de la sous-unité intégrine  $\beta 8$  était significativement diminuée et l'expression de la thrombospondine-1 significativement augmentée lors de FPIc ; celle de la sous-unité  $\beta 6$  n'était pas modifiée. L'expression de Smad 7, une protéine inhibant la signalisation intracellulaire du TGFB1, n'était pas non plus modifiée. Aucune différence dans la concentration sérique en TGFB1 n'était notée entre des WHWT atteints et sains. Une analyse multivariée réalisée chez des chiens sains de différentes races n'a pas mis en évidence d'effet de l'âge mais un effet significatif du facteur race avec une concentration sérique en TGFB1 significativement plus élevée dans les races prédisposées.

Nous avons ensuite analysé une partie des voies de la sérotonine, un de ces récepteurs (5HTR2B) ayant été retrouvé lors de l'analyse du profil d'expression de la FPIc. La sérotonine a également déjà été impliquée dans la pathogénie de la FPI chez l'homme et décrite comme biomarqueur potentiel chez le chien lors d'endocardiose mitrale. L'expression des deux récepteurs de la sérotonine (5HTR2A, 5HTR2B), évaluée par RT-PCR quantitative à partir du tissu pulmonaire, n'était pas différente entre les chiens avec FPIc et les chiens contrôles, alors que l'expression du transporteur de la sérotonine (5HTT) était significativement plus faible dans le groupe FPIc. Concernant la concentration sérique en sérotonine, aucune différence n'a été notée entre les WHWT atteints de FPIc et les WHWT sains ni entre les chiens avec FPIc et les chiens avec BC ou BPE.

L'ET1 a été évaluée en tant que biomarqueur dans le sérum et le LLBA. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les concentrations sériques en ET1 obtenues chez les WHWT sains et les Beagles. L'analyse de covariance n'a pas mis en évidence d'influence du facteur âge. La concentration sérique en ET1 était significativement plus élevée lors de FPIc par rapport à la BPE et à la BC. Les performances de l'ET1 à distinguer une FPIc d'une BC ou d'une BPE ont ensuite été évaluées par l'analyse de la courbe ROC. L'aire sous la courbe était de 0,818 et la sensibilité et la spécificité de 91,7% et 87,5% respectivement. Au cours de cette étude, l'ET1 a également été mesurée dans le LLBA chez un nombre limité de chiens. Elle était mesurable chez tous les chiens atteints de FPIc alors que sa concentration était inférieure au seuil de détection chez les autres chiens testés (sains et atteints de BC).

Même si la FPIc et la FPI chez l'homme ne sont pas parfaitement identiques d'un point de vue tomodensitométrique, histologique ou pathogénique, ces résultats mettent enfin en évidence que ces deux affections partagent certains mécanismes moléculaires et que la FPIc pourrait ainsi avoir un intérêt en tant que modèle spontané.

Ce travail nous a permis de mieux comprendre la pathogénie de la FPIc. L'étude du profil d'expression génique au niveau pulmonaire chez les chiens atteints a d'abord permis d'identifier différentes fonctions biologiques altérées lors de FPIc et qui pourront faire l'objet par la suite d'une étude plus détaillée. L'analyse plus ciblée de certains gènes a confirmé une surexpression de CCL2, CCL7, CXCL14, IL8 et de FAP. Ces résultats indiquent une régulation positive de l'expression de différentes cytokines inflammatoires, suggérant que l'inflammation pourrait avoir un rôle dans la pathogénie de la FPIc. Par ailleurs, certaines de ces cytokines ont également des propriétés profibrotiques. Le gène de la PLUNC était l'un de ceux dont l'expression était nettement réprimée. Le rôle de cette protéine reste encore à définir, elle pourrait notamment intervenir dans la réponse

inflammatoire et l'immunité innée. Les voies du développement faisait également partie des voies altérées dans la FPIc. Parmi les gènes impliqués, l'analyse par RT-PCR quantitative a confirmé une surexpression de la FAP, protéine normalement exprimée dans les zones de remodelage tissulaire lors du développement embryonnaire et également régulée positivement lors de FPI chez l'homme.

Cette étude a permis de démontrer qu'une signalisation active en TGFB1 existait au sein des poumons atteints de FPIc, notamment au niveau de l'épithélium pathologique. Elle suggère également que les voies de stockage et d'activation du TGFB1 sont altérées lors de FPIc. Des taux élevés de TGFB1 circulant sont retrouvés dans les races prédisposées, ce qui pourrait au moins partiellement influencer leur susceptibilité à la FPIc. Au regard des propriétés profibrotiques du TGFB1 et de ces résultats, nous pouvons suggérer que le TGFB1 est probablement impliqué dans la pathogénie de la FPIc et que la modulation de son stockage, de son activation ou de sa signalisation intracellulaire représente des cibles thérapeutiques potentielles.

Nos premiers résultats ne sont pas en faveur d'une modification importante des voies de la sérotonine dans la FPIc et donc de son implication dans la pathogénie. Une expression pulmonaire plus faible du transporteur 5HTT a toutefois été notée chez les chiens atteints de FPIc en comparaison de chiens sains. Cette régulation négative de l'expression du 5HTT pourrait avoir un impact sur la quantité de sérotonine présente au sein du tissu. Il s'agit toutefois de spéculations et d'autres études sont nécessaires pour conclure.

Au cours de ce travail, différents biomarqueurs potentiels ont été identifiés et certains ont été évalués en détail. Alors que les mesures sériques réalisées lors de l'étude du TGFB1 et de la sérotonine indiquent que ces derniers n'ont pas d'intérêt en tant que biomarqueur diagnostique, il semble que l'ET1 et le CCL2 sériques présentent de très bonnes performances diagnostiques. Ces résultats doivent toutefois être validés sur une population indépendante. La combinaison de différents biomarqueurs identifiés par la suite pourrait également s'avérer intéressante.

## SUMMARY

---

Canine idiopathic pulmonary fibrosis (cIPF) is a fibrotic disease of the pulmonary parenchyma, mainly seen in the West Highland white terrier. It is characterized by exercise intolerance and cough with a progressive deterioration until death from respiratory insufficiency. Clinical, tomodesitometric and histological characteristics of cIPF have been described recently. However, this disease remains largely unknown and the clinicians are dealing with two major challenges: confirmation of the diagnosis, which requires many complementary exams, and absence of effective treatment. Identification of a targeted therapy is difficult without having a good understanding of the mechanisms leading to pulmonary parenchyma fibrosis. A similar disease, the idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is recognized in humans and cIPF might be interesting as a spontaneous model. This project in dogs was undertaken to answer, at least partly, to these challenges. The aims were to elucidate some mechanisms involved in cIPF pathogenesis and to identify biomarkers that could be used in the diagnosis process. The hypotheses were first that analysis of the transcriptome through microarray experiment would identify altered biological functions in cIPF, highlight specific molecules with an altered expression and identify potential biomarkers. Another hypothesis was the transforming growth factor beta 1 (TGFB1) pathways, considered central in the pathogenesis of IPF, would also be modified in cIPF. Finally, ET1, a known biomarker in human IPF, might also be an interesting biomarker in dogs.

Gene expression analysis through microarray analysis, combined with the use of IPA, a data analysis program, identified altered biological functions in cIPF: cellular growth and proliferation, developmental processes, cellular movement, cell to cell signaling and interaction and antigen presentation. Some genes highlighted in the microarray experiment were then analyzed individually. Quantitative RT-PCR analysis confirmed an upregulation of the expression of CCL2, CCL7, CXCL14, IL8 and FAP (fibroblast activation protein) as well as a downregulation of the expression of PLUNC (palate, lung and nasal epithelium associated). We then complete the gene expression analysis with a search for potential biomarkers. Thirty-four potential biomarkers were identified with 32 biomarkers potentially measurable in blood (including CCL2, serum amyloid 1, IL8) and 2 biomarkers measurable only in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) (PLUNC and mesothelin). This approach was validated by measurement in serum of one of this biomarker: CCL2. CCL2 serum concentration was higher in affected WHWT compared to healthy WHWT and also higher in dogs with cIPF compared to dogs with chronic bronchitis (CB) or eosinophilic bronchopneumopathy (EBP). Based on serum CCL2 determination, cIPF was diagnosed with a sensibility of 92% and a specificity of 80%.

We then studied TGFB1 and part of its storage, activation and signaling pathways. TGFB1 gene expression was not significantly different in the pulmonary parenchyma between affected and control dogs. However, in affected dogs, increased TGFB1 protein levels were seen by immunohistochemistry in fibrotic areas. High expression of both TGFB1 type I receptor and phosphorylated Smad2/3, markers of an active intracellular TGFB1 signal, were seen in epithelial cells. No difference in expression for the storage proteins LTBP1 and LTBP2 was seen while expression of LTBP4 was significantly decreased in dogs with cIPF. Concerning the proteins involved in TGFB1 activation, gene expression was decreased for integrin subunit  $\beta$ 8, increased for thrombospondin-1 and not modified for integrin subunit  $\beta$ 6. Expression of Smad 7, involved in intracellular TGFB1 signal inhibition, was not modified. No difference for TGFB1 serum concentration was seen between WHWT with cIPF and healthy WHWT. A multivariate analysis performed on healthy dogs showed no age effect but a significant breed effect with higher levels in predisposed breeds.

We evaluated part of the serotonin pathway, as one of its receptor (5HTR2B) was highlighted during the gene expression analysis. Serotonin has also been involved in the pathogenesis of human IPF and described to be of potential use (?) as a biomarker in degenerative mitral valve disease in dogs. Expression of 2 serotonin receptors (5HTR2A and 5HTR2B), evaluated by quantitative RT-PCR in pulmonary tissue, was not different between dogs with cIPF and control dogs while expression of the serotonin transporter (5HTT) was significantly lower in affected dogs. No difference in serotonin serum level was seen between affected and healthy WHWT or between dogs with cIPF, CB or EBP.

ET1 was evaluated as a biomarker in serum and BALF. ET1 serum concentration was not different between healthy WHWT and Beagles. Covariance analysis did not reveal any significant age effect. Serum levels were significantly higher in dogs with cIPF compared to dogs with CB or EBP. ROC curve analysis was then used to evaluate its diagnostic performances. The area under the curve was 0,818 with a sensitivity of 91.7% and a specificity of 87.5%. ET1 was also measured in the BALF in a small number of dogs. Its concentration was measurable in all dogs with cIPF while it was below the detection limit in all other dogs tested (healthy and with CB).

Even though cIPF and human IPF are not completely identical from clinical, tomodesitometric or histological points of view, these results show that both canine and human diseases share molecular pathways, supporting the idea that cIPF might have an interest as spontaneous model.

This work allowed a better understanding of cIPF pathogenesis. Gene expression analysis in the pulmonary parenchyma of affected dogs first identified several altered biological functions that should be analyzed in details in further studies. A more targeted analysis of some genes confirmed an upregulated expression of CCL2, CCL7, CXCL14, IL8 and FAP. Such a positive regulation of the expression of various inflammatory cytokines tends to suggest that inflammation might have a role in cIPF pathogenesis. Some of these cytokines also have profibrotic properties. PLUNC was one of the top down-regulated genes. Roles of the protein are still largely unknown; it might have a role in the inflammatory response and in the innate immunity. Developmental pathways were also altered in cIPF and quantitative RT-PCR confirmed an upregulation of FAP, a protein normally expressed in areas of tissue remodeling during fetal development and also positively regulated in human IPF.

This study has shown that there is an active TGFB1 signal in the lungs of dogs with cIPF, especially at the level of the pathological epithelium. TGFB1 storage and activation pathways also seemed to be altered. Elevated TGFB1 circulating levels were found in predisposed breeds, which might explain at least partly their susceptibility for cIPF. Because of these results and its well-known profibrotic properties, we can suggest that TGFB1 is probably involved in cIPF pathogenesis and that modulation of its storage, activation or intracellular signaling might offer potential therapeutic targets.

Our preliminary results are not in favor of a significant modification of the serotonin pathways in cIPF, although a decreased expression of 5HTT was seen in affected dogs and might have an impact on the amount of serotonin present locally. However, other studies are needed to conclude.

Finally, several potential biomarkers have been identified and some of them were evaluated in details. While serum measurements performed for TGFB1 and serotonin indicated that these molecules have no interest as diagnostic biomarkers, ET1 and CCL2 were identified as interesting candidates with good diagnostic performances. However these results need to be confirmed in an independent validation cohort and the interest of combining both biomarkers should be evaluated.



## LISTE DES ABREVIATIONS

---

(A-a)O <sub>2</sub>	gradient alvéolo-artériel
$\alpha$ SMA	$\alpha$ smooth muscle actin
5HTR2A	récepteur de la sérotonine de type 2A
5HTR2B	récepteur de la sérotonine de type 2B
5HTT	transporteur de la sérotonine
ALK	activin receptor-like
CEA	cellules épithéliales alvéolaires
CCL	chimiokine ligand (famille CC)
CO	monoxyde de carbone
COX-2	cyclooxygénase 2
CTGF	connected tissue growth factor
CVF	capacité vitale forcée
CXCL	chimiokine ligand (famille CXC)
DLCO	capacité de diffusion du monoxyde de carbone
ET1	endothéline-1
FAP	fibroblast activation protein
FPI	fibrose pulmonaire idiopathique
FPIc	fibrose pulmonaire idiopathique canine
IL	interleukine
KL-6	antigen Krebs von den lungen-6
LAP	latency associated peptide
LBA	lavage bronchoalvéolaire
LLBA	liquide de lavage bronchoalvéolaire
LLC	large latent complex
LTBP	latent TGF binding protein
MMP	matrix metalloprotease
PAI-1	activateur du plasminogène 1
PaCO <sub>2</sub>	pression artérielle partielle en dioxyde de carbone
PaO <sub>2</sub>	pression artérielle partielle en dioxygène
PAR1	proteinase-activated receptor 1
PDGF	platelet-derived growth factor
PIC	pneumopathie interstitielle commune
PIIINP	pro-collagène aminoterminal de type III
PLUNC	palate, lung and nasal epithelium associated
RAGE	receptor for advanced glycation end products
ROC	receiver operating characteristic
qRT-PCR	PCR inverse quantitative
SLC	small latent complex
SP-A	protéine A du surfactant
SP-D	protéine D du surfactant
TDM-HR	tomodensitométrie en haute résolution
TEM	transition épithélio-mésenchymateuse
TGFB1	transforming growth factor beta 1
TGFBRI	récepteur spécifique du TGFB de type I
TGFBRII	récepteur spécifique du TGFB de type II

THBS1	thrombospondine-1
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase
TNF $\alpha$	tumor necrosis factor $\alpha$
UPR	unfolded protein response
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHWT	West Highland white terrier

## TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>15</b>
---------------------------	-----------

---

<b>1. La fibrose pulmonaire idiopathique humaine (FPI) .....</b>	<b>15</b>
1.1 Définition .....	15
1.2 Présentation clinique .....	16
1.3 Incidence et prévalence .....	16
1.4 Diagnostic.....	17
1.4.1 Examen radiographique.....	18
1.4.2 Examen tomodensitométrique en haute résolution .....	18
1.4.3 Examen histologique .....	18
1.4.4 Tests fonctionnels.....	19
1.4.5 Recherche de complications et comorbidités.....	19
1.4.6 Limites actuelles.....	20
1.5 Evolution .....	20
1.5.1 Forme accélérée.....	21
1.5.2 Exacerbation aigue .....	21
1.6 Pronostic.....	22
1.7 Biomarqueurs diagnostiques et pronostiques.....	23
1.7.1 Etudes ciblées de biomarqueurs candidats .....	23
1.7.1.1 Chimioquinas .....	23
1.7.1.1.1 Chimioquine ligand 2 (famille CC) CCL2 .....	23
1.7.1.1.2 Interleukine 8 (IL8) .....	24
1.7.1.1.3 Autres chimioquinas.....	25
1.7.1.2 Marqueurs issus des cellules épithéliales .....	25
1.7.1.2.1 Protéines A et D du surfactant (SP-A et SP-D).....	25
1.7.1.2.2 Antigen Krebs von den lungen-6 (KL-6) .....	25
1.7.1.2.3 Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (vascular endothelial growth factor VEGF) .....	26
1.7.1.3 Endothéline-1 (ET1).....	26
1.7.1.4 Métalloprotéases matricielles 1 et 7 (matrix metalloproteases MMP1, MMP7)..	26

1.7.2 Etudes à large échelle .....	27
1.7.3 Combinaison de biomarqueurs .....	29
1.7.4 Conclusion.....	30
1.8 Traitement .....	31
1.9 Etio-pathogénie .....	31
1.9.1 Facteurs de risque.....	31
1.9.1.1 Facteurs environnementaux.....	32
1.9.1.2 Agents infectieux.....	32
1.9.1.3 Reflux gastroœsophagien .....	32
1.9.1.4 Facteurs génétiques .....	32
1.9.1.4.1 Formes familiales .....	32
1.9.1.4.2 Formes sporadiques.....	33
1.9.2 Mécanismes et voies impliqués dans la pathogénie de la FPI.....	33
1.9.2.1 Inflammation .....	34
1.9.2.2 Lésions et activation de l'épithélium alvéolaire.....	35
1.9.2.3 Stress oxydatif et stress du réticulum endoplasmique.....	35
1.9.2.4 Communication entre épithélium et mésenchyme .....	36
1.9.2.5 Fibroblastes .....	37
1.9.2.5.1 Origine des fibroblastes.....	37
1.9.2.5.1.1 Transition épithélio-mésenchymateuse (TEM).....	37
1.9.2.5.1.2 Fibrocytes circulants.....	37
1.9.2.5.2 Activation des fibroblastes .....	38
1.9.2.6 Rôle de la matrice extracellulaire.....	40
1.9.2.7 Activation de la cascade de coagulation.....	40
1.9.2.8 Angiogenèse et remodelage vasculaire .....	41
1.9.2.9 Réactivation aberrante des voies du développement.....	41
1.9.2.10 Epigénétique.....	42
1.9.3.11 Conclusion.....	42
1.9.3 Rôle central du transforming growth factor beta 1 (TGFB1).....	43
1.9.3.1 Généralités.....	43
1.9.3.1.1 Synthèse et stockage.....	44
1.9.3.1.2 Activation .....	46
1.9.3.1.2.1 Activation par les intégrines.....	46

1.9.3.1.2.2 Activation par la thrombospondine 1( <i>THBS1</i> ).....	47
1.9.3.1.3 Signalisation .....	48
1.9.3.2 Rôles physiologiques du TGFB au niveau pulmonaire.....	50
1.9.3.3 Rôles du TGFB1 dans la pathogénie de la FPI .....	50
1.9.3.3.1 Polymorphismes dans le gène du TGB1 et FPI.....	51
1.9.3.3.2 Sources cellulaires du TGFB1 .....	51
1.9.3.3.3 Le TGFB1 et l'épithélium alvéolaire lésionnel .....	51
1.9.3.3.4 Le TGFB1 et le recrutement des fibroblastes.....	52
1.9.3.3.5 Le TGFB1 et l'activation des fibroblastes.....	53
1.9.3.3.6 Le TGFB1 et la régulation de la matrice extracellulaire .....	53
1.9.3.3.7 Autres .....	54
1.9.3.3.9 Particularités des voies du TGFB1 dans la FPI.....	56
1.9.3.3.9.1 Stockage .....	56
1.9.3.3.9.2 Activation par les intégrines.....	57
1.9.3.3.9.2.1 Intégrine $\alpha\beta 6$ .....	57
1.9.3.3.9.2.2 Autres intégrines.....	58
1.9.3.3.9.3 Activation par la <i>THBS1</i> .....	58
1.9.3.3.9.4 Récepteurs membranaires .....	58
<b>2. La fibrose pulmonaire idiopathique canine (FPIC).....</b>	<b>60</b>
2.1 Définition .....	60
2.2 Présentation clinique .....	61
2.3 Diagnostic.....	62
2.3.1 Tests de fonction pulmonaire .....	63
2.3.2 Examen radiographique.....	63
2.3.3 Examen échocardiographique.....	64
2.3.4 Examen tomодensitométrique en haute résolution .....	64
2.3.5 Examen bronchoscopique et lavage bronchoalvéolaire.....	65
2.3.6 Examen histologique .....	65
2.4 Pronostic.....	66
2.5 Evolution .....	66
2.6 Traitement .....	66

2.7 Challenges actuels .....	67
2.7.1 Diagnostic .....	67
2.7.2 Traitement .....	69
2.7.3 Etio-pathogénie .....	69
<b>OBJECTIFS .....</b>	<b>71</b>
<hr/>	
<b>ETUDES .....</b>	<b>72</b>
<hr/>	
<b>1. Recrutement des cas .....</b>	<b>72</b>
<b>2. Etude 1 : Analyse du profil d'expression génique dans la FPIc.....</b>	<b>73</b>
<b>3. Etude 2: Le TGFB1 et ses voies d'activation, de stockage et de signalisation dans la FPIc .....</b>	<b>86</b>
<b>4. Etude 3 : La sérotonine dans la FPIc .....</b>	<b>108</b>
4.1 Introduction .....	108
4.2 Matériel et méthode.....	109
4.2.1 Animaux.....	109
4.2.2 Prélèvements .....	109
4.2.3 RT-PCR quantitative .....	109
4.2.4 Dosage sérique de la sérotonine .....	110
4.2.5 Analyse statistique.....	110
4.3 Résultats .....	110
4.4 Discussion .....	111
<b>5. Etude 4 : La concentration en endothéline-1 (ET1) dans le sérum et le liquide de lavage bronchoalvéolaire en tant que biomarqueur diagnostique de la FPIc.....</b>	<b>113</b>
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>123</b>
<hr/>	
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>132</b>
<hr/>	

# INTRODUCTION

---

La fibrose pulmonaire idiopathie canine (FPIc) avait d'abord été évoquée dans le cadre du projet LUPA (Lequarre *et al.*, 2011) dont le but était d'améliorer les connaissances sur l'origine génétique de différentes pathologies humaines, en collectant et en analysant des échantillons d'ADN prélevés sur des chiens de pure race, sains ou souffrant de maladies pertinentes pour la médecine humaine. Le principe était de réaliser des études d'association sur génome entier sur des chiens sains et atteints dans une même race puis dans différentes races afin d'identifier des gènes et même des mutations associés à la présence de la maladie, ces mutations étant ensuite recherchées chez les patients atteints d'une maladie identique ou très semblable à la maladie canine. Le chien est en effet un modèle génétique particulièrement intéressant pour la réalisation d'études d'association sur génome entier en raison de son mode de sélection et de l'existence de différentes races (Ostrander et Kruglyak, 2000). La réalisation d'une étude d'association sur génome entier nécessite deux populations issues de la même race et parfaitement phénotypées (saine et atteinte) et avec un nombre suffisant de chiens dans chaque groupe (une centaine pour un trait complexe (Lindblad-Toh *et al.*, 2005)). Dans le cadre du projet LUPA, ce recrutement devait avoir lieu en une période réduite, le projet étant prévu pour une durée de 4 ans.

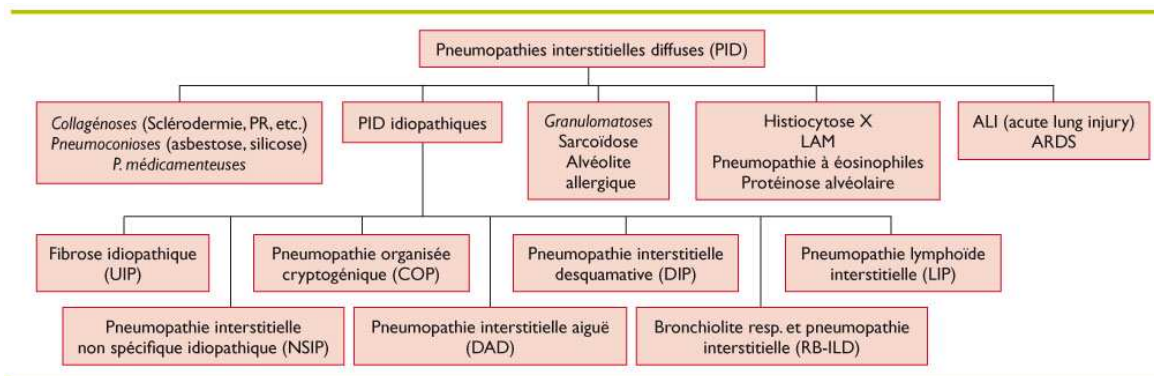
La FPIc avait été évoquée initialement comme maladie candidate, cette affection présente en effet une nette prédisposition raciale pour les terriers, en particulier le West Highland white terrier (WHWT), et elle semblait très similaire à la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) rencontrée chez l'homme. Néanmoins, le recrutement ne semblant pas réalisable durant la période dédiée, la FPIc n'a pas été incluse dans le projet LUPA. Tout d'abord, il s'agit d'une maladie rare et la confirmation du diagnostic est difficile, deux données qui compliquent le recrutement d'une population atteinte. Son apparition étant tardive, la population contrôle saine aurait donc dû être composée de WHWT âgés pour diminuer le risque que ces chiens développent par la suite une FPIc. Par ailleurs, même si les signes cliniques semblaient comparables à ceux de la FPI, aucune donnée ne confirmait qu'il s'agissait de la même affection dans les deux espèces. Il est donc rapidement apparu que, même si la FPIc constituait un modèle candidat potentiellement très intéressant pour la FPI humaine, il était nécessaire d'améliorer nos connaissances dans la FPIc avant d'envisager des études génétiques. Il s'agissait en particulier d'identifier des méthodes autres que la biopsie pulmonaire pour faciliter son diagnostic et d'étudier ses mécanismes pathogéniques afin de les comparer à ceux reconnus dans la FPI humaine. Le FPIc étant très peu connue au moment du démarrage de ce projet de thèse, nous nous sommes en partie appuyés sur les connaissances actuelles sur la FPI en médecine humaine pour identifier des pistes intéressantes à poursuivre.

## 1. La fibrose pulmonaire idiopathique humaine (FPI)

### 1.1 Définition

Les pneumopathies interstitielles diffuses représentent un groupe hétérogène d'affections de l'arbre respiratoire inférieur caractérisées par une altération du septum alvéolaire et une perte de l'unité fonctionnelle alvéolo-capillaire (Society, 2002). On distingue les pneumopathies interstitielles idiopathiques, qui surviennent en l'absence d'une cause ou d'un contexte identifiés, par opposition aux pneumopathies interstitielles dont l'étiologie est connue : pneumonies d'origine médicamenteuse, toxique, environnementale, pneumopathies associées à la sarcoïdose ou aux connectivites (sclérodémie systémique, polyarthrite rhumatoïde, lupus érythémateux disséminé...).

En 2002, un panel multidisciplinaire composé de l' « American Thoracic Society » et de l' « European Respiratory Society » a établi un consensus pour la classification des maladies pulmonaires interstitielles idiopathiques en 7 entités : la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI), la pneumopathie interstitielle non spécifique, la pneumopathie organisée cryptogénique, la pneumopathie interstitielle aiguë, la bronchiolite respiratoire avec maladie pulmonaire interstitielle, la pneumopathie interstitielle desquamative et la pneumopathie interstitielle lymphoïde (Society, 2002).



Suite aux nombreuses publications dans les années 2000, ce consensus international a récemment été mis à jour, spécifiquement pour la FPI (Raghu *et al.*, 2011).

La FPI est la forme la plus répandue de ces pneumopathies interstitielles diffuses (45 à 60% des cas (Society, 2002; Swigris *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006a; Raghu *et al.*, 2006b; Raghu *et al.*, 2011) et la plus sévère (affection généralement létale). Il s'agit d'une pneumopathie interstitielle spécifique idiopathique, d'évolution chronique et progressive, touchant principalement les adultes d'un certain âge, limitée aux poumons et associée à un pattern histologique et/ou radiologique de pneumopathie interstitielle commune (Raghu, 2011; Raghu *et al.*, 2011). Cette définition de la FPI implique l'exclusion d'autres formes de pneumonies interstitielles telles que les autres pneumonies interstitielles idiopathiques ainsi que les maladies pulmonaires interstitielles associées à un agent environnemental, à un toxique ou à une maladie systémique.

## 1.2 Présentation clinique

La FPI est rencontrée typiquement chez des individus de 60- 70 ans (Scott *et al.*, 1990; Mannino *et al.*, 1996; Gribbin *et al.*, 2006; Raghu *et al.*, 2006a) avec une légère prédominance masculine. La FPI est rare avant l'âge de 50 ans, d'autres diagnostics doivent être envisagés chez le sujet jeune, en particulier une connectivite au stade subclinique. La majorité des patients ont des antécédents de tabagisme (Scott *et al.*, 1990; Coultas *et al.*, 1994; Iwai *et al.*, 1994; Douglas *et al.*, 2000; King *et al.*, 2001b; Gribbin *et al.*, 2006).

Les patients atteints présentent une dyspnée d'effort d'apparition progressive, généralement associée à une toux non productive. A l'examen, des râles inspiratoires crépitants sont présents bilatéralement en région basilaire (Douglas *et al.*, 2000; King *et al.*, 2001b; Gribbin *et al.*, 2006; King *et al.*, 2011). Un hippocratisme digital est noté dans près de la moitié des cas (King *et al.*, 2011; Raghu *et al.*, 2011).

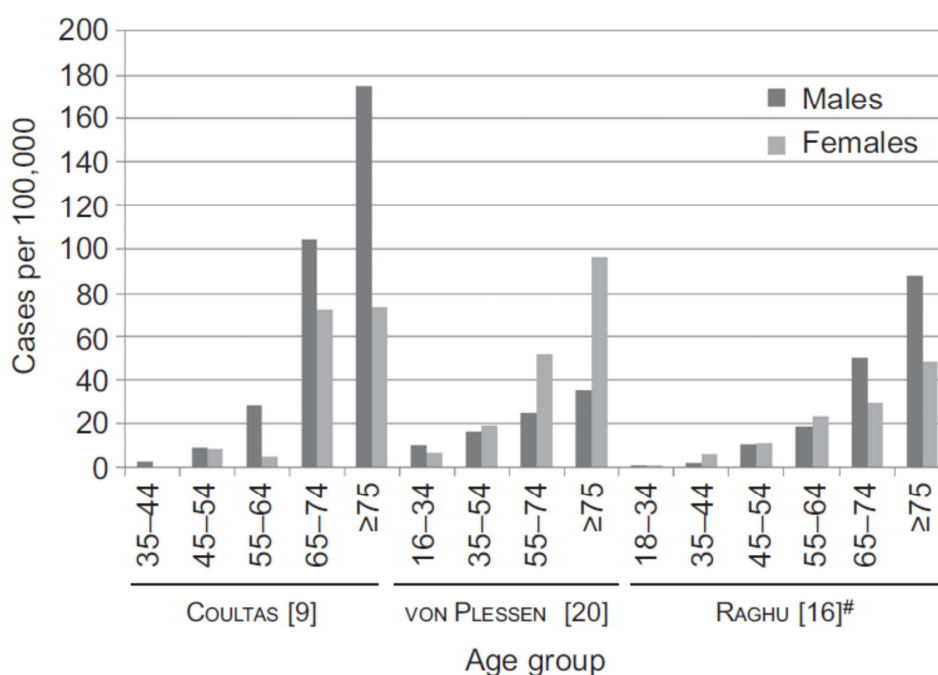
## 1.3 Incidence et prévalence

Il n'existe pas d'étude à large échelle permettant d'estimer avec fiabilité la prévalence et l'incidence de la FPI. Une publication récente a compilé les données issues de 15 études (Nalysnyk *et al.*, 2012). Cette prévalence est estimée aux États-Unis à entre 14 et 27,9 cas pour 100 000



habitants, en utilisant une définition très stricte des cas, contre 42,7 à 63 cas pour 100 000 habitants avec une définition plus large (incluant notamment les cas où la tomodynamométrie en haute résolution (TDM-HR) concluait à une « possible FPI »). En Europe, la prévalence varie entre 1,25 et 23,4 cas pour 100 000 habitants avec des critères d'inclusion très variables selon les auteurs. L'incidence annuelle aux Etats-Unis est estimée de 6,8 à 8,8 pour 100 000 habitants sur base d'une définition stricte, de 16,3 à 17,4 sur base d'une définition plus large. En Europe, l'incidence annuelle varie entre 0,22 et 7,4 cas pour 100 000 habitants. La grande variabilité entre ces chiffres peut s'expliquer par un manque d'uniformité dans les critères utilisés pour définir un cas de FPI avant la publication des dernières recommandations, mais également par des conceptions différentes des études ainsi que par des différences réelles entre les populations étudiées.

Figure 1 : Prévalence de la FPI en fonction de l'âge et du sexe, d'après (Nalysnyk *et al.*, 2012)



\* critères stricts d'inclusion

D'une manière générale, la FPI est considérée comme une maladie rare mais dont la prévalence et l'incidence sont en augmentation durant les dernières années en Europe. L'incidence et la prévalence augmente également avec l'âge (Coultas *et al.*, 1994; Mannino *et al.*, 1996; Gribbin *et al.*, 2006; Raghu *et al.*, 2006b). Il n'est pas déterminé à l'heure actuelle si elles sont influencées par des critères géographiques, ethniques ou culturels.

#### 1.4 Diagnostic

L'établissement d'un diagnostic de FPI nécessite (Raghu *et al.*, 2011; Wells, 2013b; Wells, 2013a) :

- L'exclusion d'autres causes de pneumopathie interstitielle diffuse (connectivite, toxique...)
- La présence d'un pattern de pneumopathie interstitielle commune (PIC) à la TDM-HR pour les patients non soumis à une biopsie pulmonaire
- La combinaison d'images tomodynamométriques et histologiques compatibles pour les patients soumis à une biopsie pulmonaire

Cette démarche est complexe et doit inclure une approche multidisciplinaire faisant intervenir pneumologues, radiologues et anatomopathologistes expérimentés dans le domaine des pneumopathies interstitielles diffuses (Flaherty *et al.*, 2004; Flaherty *et al.*, 2007; Hofer, 2007).

#### 1.4.1 Examen radiographique

L'examen radiographique est peu spécifique (Mathieson *et al.*, 1989) et met en évidence des opacités réticulaires périphériques prédominantes en région basilaire et une réduction du volume pulmonaire.

#### 1.4.2 Examen tomodensitométrie en haute résolution

La TDM-HR est un examen essentiel dans la démarche diagnostique de la FPI. Le pattern de PIC est caractérisé par la présence d'opacités réticulées (lignes plus ou moins épaisses), souvent associées à des bronchectasies de traction (Nishimura *et al.*, 1992; Johkoh *et al.*, 1999). Les « rayons de miel » sont fréquents et leur présence est indispensable pour établir un diagnostic définitif (Raghu *et al.*, 2011). Ils se traduisent à la TDM-HR par des travées linéaires denses de tissu interstitiel, aux contours nets, de forme polyédrique et entourant un groupe d'acini remplis d'air, dont les cloisons interalvéolaires ont disparu et d'un diamètre de 3 à 10mm, mais pouvant parfois atteindre 2,5cm. Ils sont situés en région sous pleurale et caractérisés par des parois bien délimitées (Hansell *et al.*, 2008). Des opacités en verre dépoli (hyperdensité du parenchyme à contours flous) sont fréquemment observées mais sont normalement moins extensives que les opacités réticulaires (Raghu *et al.*, 2011). Une discrète adénomégalie médiastinale (<1.5cm en petit axe) peut également être observée (Souza *et al.*, 2006; Hwang *et al.*, 2009). Lors de PIC, la distribution est hétérogène, bilatérale, basale et périphérique.

Dans un contexte clinique compatible (symptômes, examen physique, tests de fonction pulmonaire, examens de laboratoire), l'identification d'un pattern de PIC à l'examen tomodensitométrie est actuellement considérée comme suffisante pour établir un diagnostic de FPI (Hunninghake *et al.*, 2001; Flaherty *et al.*, 2003b; Quadrelli *et al.*, 2010). En effet, la TDM-HT a une excellente valeur prédictive de la présence d'un pattern de PIC à l'histologie, de l'ordre de 90 à 100% (Mathieson *et al.*, 1989; Grenier *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1994; Swensen *et al.*, 1997; Raghu *et al.*, 1999; Hunninghake *et al.*, 2001).

**Table 1 : Définition d'une pneumopathie interstitielle commune : critères tomodensitométrieques, d'après (Raghu *et al.*, 2011)**

UIP Pattern (All Four Features)	Possible UIP Pattern (All Three Features)	Inconsistent with UIP Pattern (Any of the Seven Features)
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Subpleural, basal predominance</li> <li>● Reticular abnormality</li> <li>● Honeycombing with or without traction bronchiectasis</li> <li>● Absence of features listed as inconsistent with UIP pattern (see third column)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Subpleural, basal predominance</li> <li>● Reticular abnormality</li> <li>● Absence of features listed as inconsistent with UIP pattern (see third column)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Upper or mid-lung predominance</li> <li>● Peribronchovascular predominance</li> <li>● Extensive ground glass abnormality (extent &gt; reticular abnormality)</li> <li>● Profuse micronodules (bilateral, predominantly upper lobes)</li> <li>● Discrete cysts (multiple, bilateral, away from areas of honeycombing)</li> <li>● Diffuse mosaic attenuation/air-trapping (bilateral, in three or more lobes)</li> <li>● Consolidation in bronchopulmonary segment(s)/lobe(s)</li> </ul>

*Definition of abbreviation: UIP = usual interstitial pneumonia.*

#### 1.4.3 Examen histologique

A l'histologie, la PIC est caractérisée à petit grossissement par une apparence hétérogène, avec alternance entre des zones de fibrose avec cicatrisation et « rayons de miel » et des zones de parenchyme normal (Society, 2000; Society, 2002; Raghu *et al.*, 2011). Les zones fibrotiques sont constituées principalement de collagène dense et comportent des foyers fibroblastiques (petits

agrégats de fibroblastes et myofibroblastes situés en région sous épithéliale et de forme convexe). Les « rayons de miel » sont constitués d'espaces aériens kystiques et fibreux fréquemment délimités par un épithélium bronchiolaire et remplis de mucine et de cellules inflammatoires. Une métaplasie des muscles lisses en région interstitielle est fréquemment retrouvée dans les zones de fibrose et de « rayons de miel ». Généralement, ces modifications affectent plus sévèrement le parenchyme en région souspleurale et paraseptale. L'inflammation est peu marquée et consiste en des infiltrats épars de lymphocytes et de plasmocytes associés à une hypertrophie des pneumocytes de type II et de l'épithélium bronchique.

Table 2 : Définition d'une pneumopathie interstitielle commune : critères histopathologiques, d'après (Raghu *et al.*, 2011)

UIP Pattern (All Four Criteria)	Probable UIP Pattern	Possible UIP Pattern (All Three Criteria)	Not UIP Pattern (Any of the Six Criteria)
<ul style="list-style-type: none"> <li>Evidence of marked fibrosis/ architectural distortion, ± honeycombing in a predominantly subpleural/ paraseptal distribution</li> <li>Presence of patchy involvement of lung parenchyma by fibrosis</li> <li>Presence of fibroblast foci</li> <li>Absence of features against a diagnosis of UIP suggesting an alternate diagnosis (see fourth column)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Evidence of marked fibrosis / architectural distortion, ± honeycombing</li> <li>Absence of either patchy involvement or fibroblastic foci, but not both</li> <li>Absence of features against a diagnosis of UIP suggesting an alternate diagnosis (see fourth column)</li> <li>OR</li> <li>Honeycomb changes only<sup>‡</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Patchy or diffuse involvement of lung parenchyma by fibrosis, with or without interstitial inflammation</li> <li>Absence of other criteria for UIP (see UIP PATTERN column)</li> <li>Absence of features against a diagnosis of UIP suggesting an alternate diagnosis (see fourth column)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hyaline membranes*</li> <li>Organizing pneumonia<sup>†</sup></li> <li>Granulomas<sup>†</sup></li> <li>Marked interstitial inflammatory cell infiltrate away from honeycombing</li> <li>Predominant airway centered changes</li> <li>Other features suggestive of an alternate diagnosis</li> </ul>

*Definition of abbreviations:* HRCT = high-resolution computed tomography; UIP = usual interstitial pneumonia.

\* Can be associated with acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis.

<sup>†</sup> An isolated or occasional granuloma and/or a mild component of organizing pneumonia pattern may rarely be coexisting in lung biopsies with an otherwise UIP pattern.

<sup>‡</sup> This scenario usually represents end-stage fibrotic lung disease where honeycombed segments have been sampled but where a UIP pattern might be present in other areas. Such areas are usually represented by overt honeycombing on HRCT and can be avoided by pre-operative targeting of biopsy sites away from these areas using HRCT.

#### 1.4.4 Tests fonctionnels

L'exploration fonctionnelle respiratoire par spirométrie met en évidence un trouble ventilatoire restrictif (diminution de la capacité vitale forcée (CVF) et de la capacité pulmonaire totale) (Martinez et Flaherty, 2006). Le résultat des gaz sanguins artériels reflète la diminution de la diffusion alvéolo-capillaire avec une diminution de la capacité de diffusion du monoxyde de carbone (DLCO) (aussi appelée facteur de transfert pulmonaire du CO) et une augmentation du gradient alvéolo-artériel (A-a)O<sub>2</sub>.

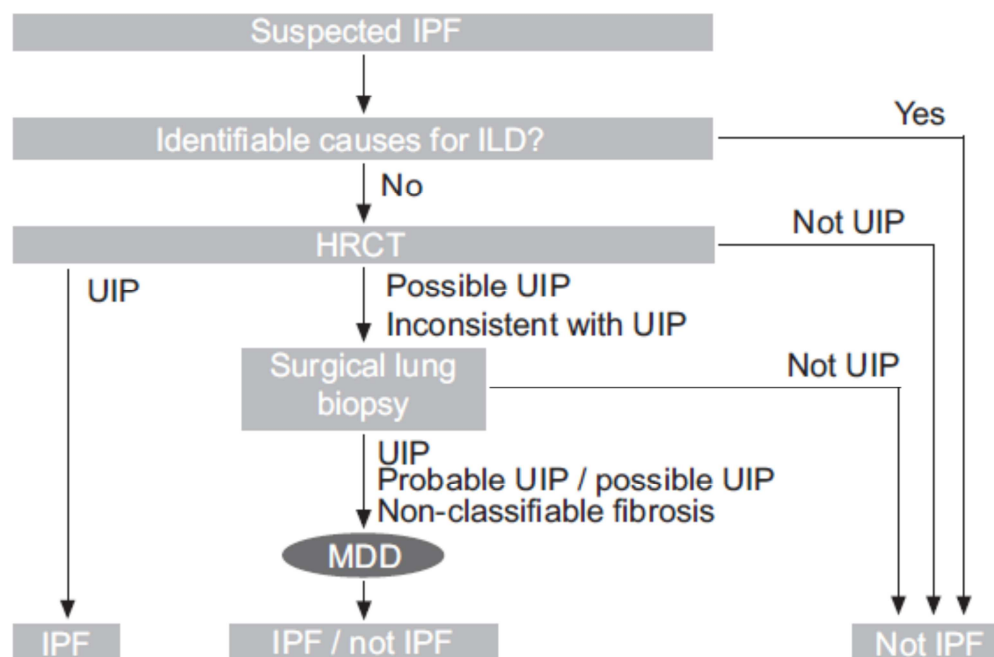
#### 1.4.5 Recherche de complications et comorbidités

De nombreuses complications et comorbidités ont été associées à la présence d'une FPI et doivent être recherchées. Le reflux gastro-œsophagien est ainsi très fréquent lors de FPI (Raghu *et al.*, 2006a) et pourrait, en association avec des microaspirations, être un facteur à l'origine de lésions répétées de l'épithélium alvéolaire (Lee *et al.*, 2010). L'hypertension pulmonaire est une autre condition dont la prévalence est importante chez les patients avec FPI (Nadrous *et al.*, 2005b; Raghu *et al.*, 2011; Loomis-King *et al.*, 2013). Il semblerait que la distorsion du parenchyme rencontrée dans les cas avancés entraîne des anomalies au niveau de la vascularisation pulmonaire dont une altération de la production de l'oxyde nitrique et une vasoconstriction (Loomis-King *et al.*, 2013). Les patients avec FPI sont également considérés comme à risque de thromboembolies pulmonaires (Loomis-King *et al.*, 2013). La combinaison d'une fibrose pulmonaire et d'un emphysème chez certains patients est de plus en plus reconnue (Cottin *et al.*, 2005; Cottin *et al.*, 2010) et est retrouvée dans environ 10% des patients dans une étude récente (Ryerson *et al.*, 2013).

### 1.4.6 Limites actuelles

Un algorithme diagnostique a ainsi mis à disposition des cliniciens dans les dernières recommandations internationales afin de les guider dans la démarche diagnostique (Raghu *et al.*, 2011). Il est repris dans le schéma ci-dessous.

Figure 2 : Algorithme diagnostique lors de suspicion de fibrose pulmonaire idiopathique (Raghu *et al.*, 2011; Wells, 2013a)



*ILD: interstitial lung disease; IPF: idiopathic pulmonary fibrosis; HRCT: high resolution computed tomography; MDD: multidisciplinary discussion; UIP: usual interstitial pneumonia (PIC)*

Néanmoins, le diagnostic de FPI reste difficile et certains points portent toujours à confusion (Wells, 2013b; Wells, 2013a), tels que l'intérêt du LBA ou l'établissement du diagnostic lorsqu'une biopsie pulmonaire ne peut être réalisée ou lorsque les résultats des examens sont discordants. L'exclusion des autres affections associées à un pattern tomographique ou histologique de PIC est également une étape à part entière de la démarche diagnostique.

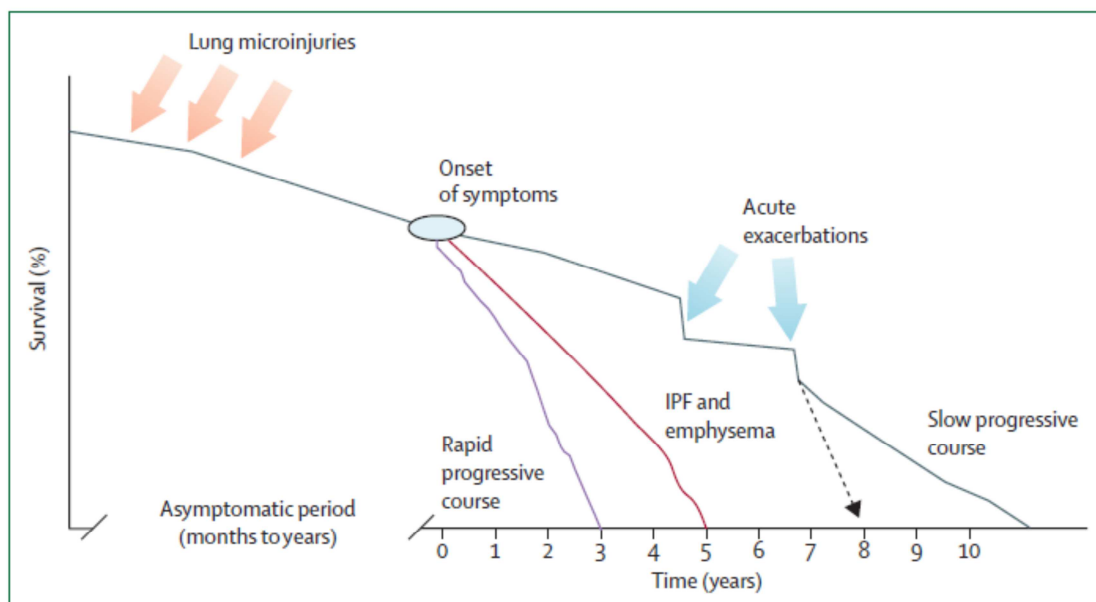
### 1.5 Evolution

L'évolution de la FPI est classiquement décrite comme un déclin progressif de la fonction respiratoire jusqu'au décès par insuffisance respiratoire ou secondaire à une comorbidité (Raghu *et al.*, 2011). Même si le pronostic global de la FPI est sombre, il apparaît par ailleurs que les patients peuvent connaître différentes évolutions de leur pathologie (Raghu, 1987; McCormack *et al.*, 1995; Martinez *et al.*, 2005). La majorité connaît une dégradation progressive, lente, sur plusieurs années, telle que classiquement décrit. Certains patients restent stables alors que d'autres vont connaître un déclin beaucoup plus rapide (Selman *et al.*, 2007). Enfin, dans certains cas, un ou plusieurs épisodes de détérioration respiratoire brutale sont observés après une période de stabilité ou de détérioration lente (Ambrosini *et al.*, 2003; Collard *et al.*, 2007). A l'heure actuelle, il n'a pas encore été déterminé si ces différentes évolutions représentent des phénotypes différents de FPI ou si l'évolution est influencée par des facteurs géographiques, ethniques, culturels... L'existence de

comorbidités (emphysème, hypertension pulmonaire...) pourrait également influencer l'évolution de la maladie (Wells *et al.*, 2003; Lettieri *et al.*, 2006; Mejia *et al.*, 2009).

La FPI est déclarée progressive en cas d'aggravation de la dyspnée, d'une diminution d'au moins 10% de la CVF, 15% de la DLCO, d'une progression du pattern de fibrose à la tomodensitométrie ou en cas d'exacerbation aiguë (Raghu, 2011; Raghu *et al.*, 2011).

Figure 3 : Différentes évolutions possibles lors de fibrose pulmonaire idiopathique, d'après (King *et al.*, 2011)



### 1.5.1 Forme accélérée

La forme accélérée de la FPI concerne un sous-groupe de patients, notamment des fumeurs de sexe masculin qui connaissent une évolution rapide de la maladie (évolution des symptômes depuis moins de 6 mois au moment du diagnostic) avec un temps de survie réduit. Au moment du diagnostic, les résultats d'imagerie, des tests de fonction pulmonaire ou de l'analyse histologique sont identiques entre ces patients et ceux qui auront une évolution plus lente (Selman *et al.*, 2007). La proportion des patients ayant une forme accélérée est encore inconnue (26 patients sur 167 dans l'étude de Selman (Selman *et al.*, 2007)).

### 1.5.2 Exacerbation aiguë

Des observations récentes suggèrent que les épisodes d'aggravation respiratoire brutale ont lieu chez une petite minorité de patients (environ 5-10% (Azuma *et al.*, 2005; Collard *et al.*, 2007; King *et al.*, 2008; King Jr *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2011)). Ces épisodes peuvent apparaître secondairement à une pneumonie, une embolie pulmonaire, ou une décompensation cardiaque. Quand aucune cause ne peut être identifiée, le terme d'exacerbation aiguë est utilisé. Les critères classiquement utilisés pour définir une exacerbation aiguë de FPI incluent une aggravation non expliquée de la dyspnée en 1 mois, la présence d'une hypoxémie caractérisée par une altération plus marquée des échanges gazeux, l'apparition d'opacités surnuméraires à la TDM-HR et l'absence d'explication pour cette détérioration brutale (Collard *et al.*, 2007). Histologiquement, elle se caractérise par des images de dommage alvéolaire diffus ou plus rarement par une pneumopathie organisée dans des zones avec une architecture relativement conservée, à distance des zones plus fibrotiques (Collard *et al.*, 2007). Une exacerbation aiguë peut être notée à tout

moment de l'évolution d'une FPI et en est parfois la première manifestation. Il n'est pas clair à l'heure actuelle si ces exacerbations sont la conséquence d'un processus non identifié (embolie, infection) ou s'il s'agit une accélération du processus pathophysiologique à l'origine du développement de la FPI. Des décompensations respiratoires brutales ont également été associées à une chirurgie thoracique(Zegdi *et al.*, 1998; Utz *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2003; Kondoh *et al.*, 2006; Yuksel *et al.*, 2006) ou un LBA(Hiwatari *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 2006b; Sakamoto *et al.*, 2012). Ces épisodes pourraient correspondre à des vraies exacerbations ou à des simples complications de ces procédures (Raghu *et al.*, 2011).

## 1.6 Pronostic

Aucune étude longitudinale ne permet une évaluation claire de la médiane de survie lors de FPI. De nombreuses études rétrospectives suggèrent une médiane de survie de l'ordre de 2 à 3 ans après diagnostic(Bjoraker *et al.*, 1998; Nicholson *et al.*, 2000; King *et al.*, 2001a; Flaherty *et al.*, 2002; Rudd *et al.*, 2007) et une survie à 10 ans de l'ordre de 10% seulement(King *et al.*, 2001b). Néanmoins, des données récentes issues d'essais cliniques sur des patients avec une fonction pulmonaire initialement préservée indiquent qu'elle pourrait avoir été sous-estimée (Raghu *et al.*, 2004; King *et al.*, 2008; King Jr *et al.*, 2009).

Le pronostic global de la FPI est mauvais mais d'un point de vue individuel, très variable d'un patient à l'autre au moment du diagnostic. En particulier, le pronostic associé aux épisodes d'exacerbation aigue est sombre, la mortalité durant l'hospitalisation atteignant les 65% et ceux qui survivent à l'épisode ont un taux de mortalité dans les 6 mois de plus de 90%(Collard *et al.*, 2007; Hyzy *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2011). De nombreuses études ont ainsi été réalisées afin de déterminer des facteurs pronostiques et ainsi prévoir l'évolution de la FPI. L'identification des patients qui vont connaître une forme rapidement évolutive ou des épisodes d'exacerbation aigue permettrait notamment d'envisager précocement une transplantation dans ces cas. Toutefois, la fiabilité des facteurs prédictifs identifiés est limitée par la nature rétrospective de la plupart de ces études cliniques et la variabilité de leur conception.

Ainsi, différents paramètres démographiques (âge, sexe<sup>15,41,68,74-78</sup>, tabagisme<sup>71,79</sup>) ou clinique (sévérité de la dyspnée<sup>15,75,80-83</sup>), ont été associés à un pronostic défavorable dans certaines études(Schwartz *et al.*, 1994; King *et al.*, 2001b; Flaherty *et al.*, 2002; Collard *et al.*, 2004; Jegal *et al.*, 2005; Nadrous *et al.*, 2005b; Nadrous *et al.*, 2005a; Enomoto *et al.*, 2006). Les résultats des tests de fonction pulmonaire ont été associés de manière variable avec la survie lors de FPI. Plus que les résultats obtenus au moment du diagnostic<sup>15,75,76,78,83,87-89</sup>, l'évolution des différents paramètres (CVF, DLCO, capacité pulmonaire totale, (A-a)O<sub>2</sub>) semble être un facteur pronostic important<sup>78,83,87,91,92</sup>. Bien que le test de la marche de 6 minutes soit largement utilisé en clinique, et que certaines études aient mis en évidence un intérêt pronostic de l'apparition d'une désaturation (Enright, 2003; Lama *et al.*, 2003; Hallstrand *et al.*, 2005) ou de la distance parcourue<sup>87,90-92</sup>, sa valeur pronostique est limitée par un manque de standardisation (Eaton *et al.*, 2005). Des paramètres tomodensitométriques(Flaherty *et al.*, 2003b; Jeong *et al.*, 2005; Best *et al.*, 2008; Shin *et al.*, 2008; Sumikawa *et al.*, 2008), ou histologiques(King *et al.*, 2001a; Nicholson *et al.*, 2002; Flaherty *et al.*, 2003a; Enomoto *et al.*, 2006; Hanak *et al.*, 2008) ont également été corrélés avec la survie dans certaines études et la présence de comorbidités, en particulier une hypertension pulmonaire<sup>52,54,77,98</sup> ou de l'emphysème(Cottin *et al.*, 2005; Mejia *et al.*, 2009), semble être associée à un pronostic défavorable.

Même si de nombreuses études ont ainsi permis d'identifier certains facteurs associés à une mortalité précoce, l'évolution pour un patient donné reste imprévisible au moment du diagnostic (Martinez *et al.*, 2005).

## 1.7 Biomarqueurs diagnostiques et pronostiques

Malgré une recherche intensive dans ce domaine, l'établissement du diagnostic et du pronostic lors de FPI reste difficile et fait l'objet de plusieurs controverses (Wells, 2013b). L'utilisation de biomarqueurs chez les patients atteints de FPI serait intéressante pour plusieurs raisons. D'abord l'établissement d'un diagnostic de FPI nécessite une expertise particulière, qui n'est disponible que dans quelques centres spécialisés. De plus, comme mentionné précédemment, la réalisation d'une biopsie pulmonaire n'est pas toujours possible pour les patients chez lesquels elle est indiquée. Par ailleurs, un biomarqueur qui reflèterait le niveau d'activité de la maladie pourrait permettre d'identifier les formes accélérées, de suivre l'évolution par des dosages sériés ainsi qu'évaluer précocement l'efficacité d'un traitement dans un essai clinique. Finalement, l'identification d'indicateurs fiables du pronostic et de la survie pourrait permettre d'améliorer la prise en charge des patients, notamment en permettant d'anticiper la nécessité d'une transplantation.

La recherche s'est donc portée sur l'identification de biomarqueurs qui pourraient faciliter la démarche diagnostique et prédire l'évolution de la maladie de manière individualisée. Un biomarqueur ou marqueur biologique correspond à une macromolécule mesurable dans un ou des fluides corporels et présentant un intérêt en médecine ou en physiologie (Prasse et Muller-Quernheim, 2009). La recherche en médecine humaine s'est notamment focalisée sur des biomarqueurs permettant de quantifier le degré de fibrose pulmonaire ou d'évaluer l'index d'activité du processus fibrotique (Prasse et Muller-Quernheim, 2009). Les biomarqueurs qui semblent les plus intéressants à première vue sont les biomarqueurs mesurables dans le sang de par leur facilité d'obtention et le fait qu'on puisse les obtenir de manière répétée (Van Den Blink *et al.*, 2010; Vij et Noth, 2012).

### 1.7.1 Etudes ciblées de biomarqueurs candidats

La majeure partie des études destinées à identifier des biomarqueurs de la FPI ont analysé une par une quelques molécules candidates, sélectionnées à priori d'après les données de la littérature (biomarqueurs connus dans d'autres affections, rôles identifiés ou suspectés dans la pathogénie...) (Bargagli *et al.*, 2011) ou marqueurs obtenus dans les bilans sanguins de routine. Différents marqueurs extrapulmonaires (hypoalbuminémie (Zisman *et al.*, 2009), indice de distribution des rouges (Nathan *et al.*, 2013), présence d'autoanticorps (Lee *et al.*, 2013), peptide cérébral natriurétique (Song *et al.*, 2009)) pourraient ainsi avoir un intérêt en tant que biomarqueurs pronostiques dans la FPI. Certaines cellules circulantes (lymphocytes et fibrocytes) ont aussi été évaluées comme biomarqueurs dans la FPI. Les fibrocytes circulants sont des dérivés des cellules progénitrices de type mésenchymal et issus de la moelle osseuse. Le nombre de fibrocytes circulants pourrait notamment avoir un intérêt pour l'établissement du pronostic lors de FPI ; un taux élevé ayant été associé à une survie réduite et à la présence d'épisodes d'exacerbation aigue (Moeller *et al.*, 2009). Un très grand nombre de biomarqueurs ont été évalués dans la FPI et certains sont détaillés ci-dessous.

#### 1.7.1.1 Chimiokines

##### 1.7.1.1.1 Chimiokine ligand 2 (famille CC) CCL2

Egalement appelée protéine chimiotactique pour les monocytes 1 (MCP-1), CCL2 est l'une des principales molécules chimiotactiques pour les monocytes mais également pour les lymphocytes T et les cellules dendritiques immatures (Datta *et al.*, 2011). Elle peut participer au processus de fibrose en induisant l'expression du « transforming growth factor beta 1 » (TGFB1) et de collagène par les fibrocytes (Gharraee-Kermani *et al.*, 1996). Il a été démontré que CCL2, ainsi que d'autres chimiokines (CCL3 et CCL4) étaient en quantité augmentée dans le LLBA de patients

atteints de FPI par rapport aux contrôles (Car *et al.*, 1994; Suga *et al.*, 1999; Baran *et al.*, 2007; Shinoda *et al.*, 2009; Vasakova *et al.*, 2009). Cette concentration dans le LLBA était inversement corrélée avec la DLCO et la pression artérielle partielle en dioxygène (PaO<sub>2</sub>) (Car *et al.*, 1994; Shinoda *et al.*, 2009). Shinoda et ses collègues (Shinoda *et al.*, 2009) ont suggéré que la mise en évidence d'une concentration élevée en CCL2, CCL17 et CCL22 dans le LLBA pourrait prédire une évolution défavorable car elle était associée à de faibles taux de survie. Une étude portant sur 86 patients avec différentes pneumopathies interstitielles diffuses (Suga *et al.*, 1999) a également mis en évidence une augmentation de la concentration sérique en CCL2 lors de FPI par rapport à des individus sains. Toutefois, cette augmentation est également retrouvée dans d'autres pneumopathies et ne permettait donc pas de les différencier d'une FPI. Dans cette étude, une corrélation entre la concentration sérique en CCL2 et l'évolution clinique (toutes pneumopathies confondues) était également notée. Une étude d'Ohnishi (Ohnishi *et al.*, 2002) a évalué plus précisément les performances diagnostiques de CCL2, en comparaison avec d'autres biomarqueurs potentiels (KL6, SP-A et SP-D ; cf. ci-après) chez 33 patients avec pneumopathies interstitielles diffuses (21 FPI et 12 pneumopathies associées aux connectivites) et 82 contrôles (12 pneumonies bactériennes et 70 volontaires sains). La valeur seuil optimale déterminée pour la concentration sérique en CCL2 était de 1080 pg/mL ; les performances correspondantes : sensibilité 51,5%, spécificité 92,7% et exactitude 80,9% étaient les moins bonnes de tous les biomarqueurs testés. L'utilisation de CCL2 comme biomarqueur diagnostique est donc limitée par sa faible sensibilité et son manque de spécificité au sein des pneumopathies interstitielles diffuses. De plus, certaines pathologies extrapulmonaires comme l'arthérosclérose (Vasakova *et al.*, 2009; Van Wijk *et al.*, 2010) s'accompagnent également d'une augmentation de sa concentration sérique et pourraient intervenir comme facteur confondant. D'un autre côté, la concentration sérique semble être corrélée avec l'évolution de la maladie, suggérant que CCL2 pourrait être utile comme biomarqueur pronostique (Prasse et Muller-Quernheim, 2009).

#### 1.7.1.1.2 Interleukine 8 (IL8)

L'IL8, également appelée facteur chimiotactique pour les neutrophiles, est un membre de la famille des CXC chimiokines (CXCL8). Elle agit comme un médiateur majeur de la réponse inflammatoire. Produite entre autres par les macrophages alvéolaires et les cellules épithéliales, elle fonctionne par tactisme pour les neutrophiles, les macrophages, les cellules endothéliales et les mastocytes et en stimulant l'angiogenèse (Rosenkilde et Schwartz, 2004). La concentration sérique en IL8 est influencée par de nombreux facteurs, dont la présence d'une maladie infectieuse (Friedland, 1996). Une première étude à petite échelle (Ziegenhagen *et al.*, 1998) a mis en évidence une augmentation significative de la concentration en IL8 dans le sérum et le LLBA lors de FPI comparée aux individus sains. D'un point de vue fonctionnel, la concentration sérique était corrélée avec la DLCO, la capacité pulmonaire totale, la capacité vitale et la PaO<sub>2</sub>. Après cette publication, d'autres études ont confirmé la présence d'une concentration élevée en IL8 dans le sérum de patients atteints de FPI ainsi qu'une corrélation inverse entre cette concentration et les paramètres fonctionnels (principalement la CVF) (Totani *et al.*, 2002; Tsoutsou *et al.*, 2006). De plus, dans une de ces études (Totani *et al.*, 2002), une différence était notée en fonction de la forme évolutive de la FPI : les patients avec une forme stable avaient des taux faibles alors que ceux avec une forme progressive avaient des taux élevés. Une étude récente à grande échelle (Richards *et al.*, 2012) a analysé la concentration sérique de 92 protéines chez 241 patients avec FPI en incluant une première étape de sélection de biomarqueurs potentiels sur une première population suivie d'une validation de ces biomarqueurs dans une deuxième population. L'IL8 faisait partie des 5 protéines (MMP7, ICAM-1, VCAM-1, S100A12) associées de manière significative avec la mortalité et/ou la progression de la maladie. Une concentration plasmatique en IL8 >7,2pg/mL était ainsi associée



de manière indépendante à une mortalité accrue (rapport de risque ajusté 2,4) dans la cohorte de dérivation de 140 patients mais seule une tendance vers l'association était retrouvée dans la cohorte de validation (101 patients, rapport de risque ajusté 2,3,  $p=0,069$ ). L'IL8 semble donc être un biomarqueur pronostique très prometteur notamment pour prédire le mode d'évolution de la FPI ainsi que la survie.

#### 1.7.1.1.3 Autres chimiokines

D'autres chimiokines ont été évaluées en tant que biomarqueurs potentiels. On peut notamment citer la CCL18 qui pourrait notamment avoir une valeur pronostique (Prasse *et al.*, 2009) et l'IL18 qui pourrait être utile pour distinguer la FPI d'une sarcoïdose (Liu *et al.*, 2011).

#### 1.7.1.2 Marqueurs issus des cellules épithéliales

##### 1.7.1.2.1 Protéines A et D du surfactant (SP-A et SP-D)

Le surfactant est un ensemble de complexes de lipoprotéines synthétisés par les cellules de Clara au niveau des voies aériennes et les cellules épithéliales alvéolaires et sécrétés comme une couche liquidienne qui recouvre l'épithélium (Goerke, 1998). Bien qu'il soit composé en majorité de lipides, les protéines représentent 5 à 10% des complexes (Kishore *et al.*, 2006). On distingue notamment les protéines A et D, membres du sous-groupe collectines (collagène-lectines). Plusieurs études ont analysé leur valeur diagnostique et pronostique. Dans une étude de 2003 (Ishii *et al.*, 2003), la concentration en SP-A dans le LLBA était significativement plus faible chez les individus atteints de FPI par rapport à des individus sains mais comparable à celle notée dans d'autres pneumopathies interstitielles diffuses. La concentration en SP-D dans le LLBA lors de FPI n'était pas différente de celle mesurée chez des contrôles sains mais était significativement plus faible comparée à des patients avec d'autres maladies interstitielles pulmonaires (Ishii *et al.*, 2003). Au contraire, leurs concentrations sériques étaient significativement plus élevées chez les patients atteints de FPI comparées à des individus sains ou atteints d'une autre maladie interstitielle pulmonaire (Ishii *et al.*, 2003), résultats comparables à ceux obtenus en 2002 (Greene *et al.*, 2002; Ohnishi *et al.*, 2002). Dans l'étude d'Ohnishi (Ohnishi *et al.*, 2002) comparant les performances de CCL2, KL6, SP-A et SP-D, la sensibilité et la spécificité de SP-A et SP-D étaient inférieures à celles obtenues avec un autre biomarqueur KL6 (cf. ci-après). Concernant l'association de SP-A avec la mortalité, une concentration sérique élevée au moment du diagnostic a été associée avec la mortalité dans 3 études (Takahashi *et al.*, 2000; Greene *et al.*, 2002; Kinder *et al.*, 2009). Deux de ces publications ont également mis en évidence une association entre une concentration sérique élevée en SP-D et une mortalité accrue (Takahashi *et al.*, 2000; Greene *et al.*, 2002). Dans l'étude de Kinder (Kinder *et al.*, 2009), aucune association n'avait été mise en évidence mais la combinaison de SP-A et SP-D améliorait la prédiction de la mortalité à 1 an (aire sous la courbe de 0,89 pour les deux paramètres contre 0,76 pour SP-A seul,  $p=0,03$ ). D'après ces résultats, SP-A et SP-D semblent être de bons candidats comme biomarqueurs éventuellement diagnostiques mais surtout pronostiques.

##### 1.7.1.2.2 Antigen Krebs von den lungen-6 (KL-6)

KL-6 est une glycoprotéine de type mucine exprimée à la surface des cellules alvéolaires de type II et des cellules épithéliales bronchiolaires (Bandoh *et al.*, 2000), il est également nommé mucine de type 1 (MUC1). Il a été étudié dans de nombreuses maladies interstitielles pulmonaires comme un marqueur non spécifique de fibrose (Ishikawa *et al.*, 2012). La concentration sérique en KL-6 était significativement augmentée chez les patients atteints de FPI comparés à des volontaires sains (Ohnishi *et al.*, 2002; Ishii *et al.*, 2003) et à des patients avec d'autres pneumopathies interstitielles diffuses (Ishii *et al.*, 2003). Dans l'étude d'Ohnishi (Ohnishi *et al.*, 2002), la mesure sérique du KL-6 apportait de meilleures performances diagnostiques que tous les autres

biomarqueurs testés (SP-A, SP-D et CCL2). Ainsi pour une valeur seuil de 45U/L, les sensibilité, spécificité et exactitude étaient de 93,9%, 96,3%, and 95,7%, respectivement. La concentration sérique en KL-6 a également été associée à la survie dans une étude prospective sur les pneumopathies interstitielles idiopathiques et associées aux connectivites (taux sérique >1000U/mL, rapport de risque 2,95) (Sato *et al.*, 2006). Dans une étude à petite échelle, une augmentation de la concentration en KL-6 lors de dosages sériques répétés était pareillement associée à une détérioration de la survie (Yokoyama *et al.*, 1998). Ces différentes études suggèrent que KL-6 pourrait avoir une utilité diagnostique et pronostique dans la FPI (Ishikawa *et al.*, 2012).

#### 1.7.1.2.3 Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (vascular endothelial growth factor VEGF)

Le VEGF est une glycoprotéine exprimée par les cellules épithéliales alvéolaires (Monacci *et al.*, 1993) qui induit une perméabilité vasculaire et est un régulateur majeur de l'angiogenèse (Ando *et al.*, 2010). Deux études ont mis en évidence une concentration en VEGF dans le LLBA significativement plus faible lors de FPI comparée à des individus sains (Meyer *et al.*, 2000; Koyama *et al.*, 2002). Une étude (Ando *et al.*, 2010) a analysé le lien entre VEGF et résultats des tests de fonction pulmonaire et survie. La concentration sérique en VEGF était significativement plus élevée chez les patients avec un (A-a)O<sub>2</sub> élevé par rapport à ceux avec un gradient faible et à des individus sains. Une corrélation inverse était notée entre la concentration sérique initiale et les changements mensuels de la CVF. Cette étude a également identifié une tendance entre une concentration sérique supérieure à la médiane et un pronostic plus défavorable (taux de survie à 5 ans de 42,9% contre 80%). Ces données suggèrent que la concentration sérique en VEGF pourrait refléter la sévérité de la maladie et prédire le déclin de la fonction respiratoire. Il s'agit toutefois d'une étude rétrospective à petite échelle, d'autres données sont donc nécessaires avant de pouvoir conclure à un intérêt pronostic du VEGF.

#### 1.7.1.3 Endothéline-1 (ET1)

L'ET1 est un peptide vasoactif qui intervient également comme molécule pro-inflammatoire et pro-fibrotique (Ross *et al.*, 2010; Swigris et Brown, 2010). L'ET1 est incriminée dans de nombreuses affections respiratoires et ainsi retrouvée en concentration augmentée dans le sang ou le LLBA de manière peu spécifique. Des taux élevés en ET1 dans le sérum et/ou LLBA ont en effet été notés dans différentes maladies pulmonaires interstitielles autres que la FPI (Yamakami *et al.*, 1997); sclérodermie avec atteinte pulmonaire (Morelli *et al.*, 1995), sarcoïdose (Abraham *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1999; Reichenberger *et al.*, 2001; Terashita *et al.*, 2006). Lors de mucoviscidose, la concentration sérique en ET1 augmente également lorsque la fonction pulmonaire est altérée (Sihanidou *et al.*, 2000). Elle est présente en quantité augmentée dans le sérum (Ugucioni *et al.*, 1995) et le LLBA (Reichenberger *et al.*, 2001) des patients atteints de FPI. Toutefois, des taux les plus élevés dans le LLBA sont retrouvés lors de sclérodermie et non lors de FPI. Dans le cadre de la FPI, aucune publication n'a évalué l'intérêt pronostic de l'ET1, excepté une étude rapportant que l'immunoréactivité au niveau du parenchyme pulmonaire était corrélée avec le grade histologique (Giaid *et al.*, 1993).

#### 1.7.1.4 Métalloprotéases matricielles 1 et 7 (matrix metalloproteases MMP1, MMP7)

Les métalloprotéases matricielles sont une famille structurale et fonctionnelle de protéases zinc-dépendantes impliquées dans la dégradation des composants de la matrice extracellulaire (Oikonomidi *et al.*, 2009). Les membres de cette famille ont des substrats et des patterns d'expression variés. MMP1 est la collagénase dont l'expression est la plus élevée au niveau interstitiel, elle dégrade les fibrilles de collagène (Sauter *et al.*, 2008). MMP7 (ou matrilysine) est

la plus petite protéine de cette famille et dégrade de nombreux composants de la matrice extracellulaire. Des taux élevés en MMP7 ont été retrouvés dans le LLBA chez des patients avec FPI en comparaison d'individus sains (Vuorinen *et al.*, 2007; Huh *et al.*, 2008; Fujishima *et al.*, 2010). Toutefois, la MMP7 ne semble pas spécifique de la FPI, sa concentration dans le LLBA et son expression au niveau pulmonaire ne semblant pas différentes entre des patients avec une FPI ou une pneumopathie organisée cryptogénique (Huh *et al.*, 2008) ou d'autres pneumopathies interstitielles (Vuorinen *et al.*, 2007). Une étude a confirmé que les taux de MMP7 étaient plus élevés dans le sérum et le LLBA chez des patients atteints de FPI comparés à des individus sains, le même schéma étant retrouvé pour MMP1 (Rosas *et al.*, 2008). Bien que la mesure sérique unique de MMP1 ou de MMP7 ne différenciât pas individus sains et atteints de FPI, la combinaison des deux biomarqueurs ( $MMP1 \geq 2,15 \text{ ng/mL}$  et  $MMP7 \geq 1,99 \text{ ng/mL}$ ) permettait de distinguer ces deux populations mais également de différencier une FPI d'une pneumopathie d'hypersensibilité. MMP7 a également été étudiée en tant que biomarqueur pronostique. Sa concentration dans le LLBA a été corrélée négativement avec la CVF ( $r = -0,348$ ,  $p = 0,02$ ) (Vuorinen *et al.*, 2007). Cette association a également été démontrée pour la concentration sérique : pour chaque augmentation de la concentration en MMP7 de  $1 \text{ ng/mL}$ , la CVF diminuait de 4% ( $r = -0,51$ ,  $p = 0,002$ ) et la DLCO de 4,1% ( $r = -0,53$ ,  $p = 0,002$ ) (Rosas *et al.*, 2008). Dans cette étude, chez les patients avec une FPI asymptomatique, un taux sérique augmenté en MMP7 était également noté, bien que de manière moins importante que pour les patients symptomatiques. Ces résultats suggèrent que MMP7 pourrait être un indicateur de sévérité de la maladie et ce de manière très précoce. Dans l'étude récente de Richards (Richards *et al.*, 2012), MMP7 faisait également partie des 5 protéines associées de manière significative avec la mortalité et/ou la progression. Une concentration plasmatique en MMP7  $> 4,3 \text{ ng/mL}$  était ainsi associée de manière indépendante à une mortalité globale accrue (rapport de risque ajusté 2,9,  $p = 0,0013$ ) dans la cohorte de dérivation de 140 patients mais seule une tendance vers l'association était retrouvée dans la cohorte de validation (101 patients, rapport de risque ajusté 2,2,  $p = 0,071$ ). Lorsque seule la durée sans transplantation était prise en compte, cette association devenait significative (rapport de risque ajusté 2,8,  $p = 0,0075$ ). Les auteurs ont également développé un index incorporant le sexe, la CVF, la DLCO et la concentration sérique en MMP7, qui permettait de prédire la mortalité dans la cohorte de validation.

D'après ces résultats, il semblerait que MMP1 et MMP7 aient un potentiel limité en tant que biomarqueurs diagnostiques étant donné leur manque de spécificité. Une combinaison des deux ou avec d'autres biomarqueurs pourrait par contre être intéressante. MMP7 pourrait aussi être utile pour évaluer la sévérité, établir le pronostic ou suivre l'évolution de la maladie par des dosages répétés.

### 1.7.2 Etudes à large échelle

Plus récemment, des techniques à large échelle ont été appliquées afin de travailler sans « à priori » et/ou de tester simultanément un très grand nombre de molécules. Des immuno-essais multiples ont d'abord été utilisés, cette technique permettant de mesurer simultanément des dizaines de protéines dans un liquide biologique, plasma ou LLBA. Même si elle représente un gain de temps important et conduit à un screening plus large, les protéines étudiées sont choisies à l'avance, ce que ne permet pas la découverte d'un « nouveau » marqueur dont l'intérêt n'avait jamais été mis en avant auparavant. Rosas (Rosas *et al.*, 2008) a par exemple choisi de mesurer 49 protéines incluant des cytokines, des chimiokines, des facteurs de croissance et angiogéniques, des MMP et des marqueurs d'apoptose. Plus récemment, Richards (Richards *et al.*, 2012) a utilisé un panel plus large de 92 protéines mais de fonction similaire : cytokines, chimiokines, MMP, marqueurs de l'apoptose et des lésions épithéliales. Dans ces études, ces techniques ont été

appliquées sur une première population (« cohorte de dérivation ») afin d'identifier quelques marqueurs d'intérêt dont les performances ont ensuite été vérifiées dans une deuxième population (« cohorte de validation »). Ce processus en 2 étapes est plus contraignant et nécessite un grand nombre de patients bien phénotypés mais est indispensable à la validation d'un biomarqueur.

De véritables méthodes de screening ont ensuite été appliquées à la recherche de biomarqueurs dans la FPI : protéomique ou transcriptomique (Rottoli *et al.*, 2009). Le principe est ici d'analyser simultanément, dans un tissu ou un fluide biologique, l'ensemble des protéines ou des ARNm, respectivement. Ceci permet d'établir un tableau d'ensemble, un « profil » de la maladie, que l'on peut ensuite comparer à celui obtenu chez des individus sains ou atteints d'autres affections. Les techniques de protéomique ont d'abord été appliquées au LLBA afin d'en analyser la composition protéique (Wattiez *et al.*, 2000). Dans l'étude de Magi (Magi *et al.*, 2002) portant la FPI et la sarcoïdose, 37 protéines ou fragments protéiques ont pour la première fois été identifiés. La comparaison des profils obtenus dans ces deux maladies a permis de mettre en évidence 32 spots dont l'abondance différait. Ainsi, le LLBA issu de patients avec FPI comportait une quantité augmentée de protéines de faible poids moléculaire, dont la plupart sont impliquées dans l'inflammation (comme la MIP ou la calgranuline) ou la réponse antioxydante (comme une enzyme peroxysomale ou la thiorédoxine peroxydase 2), profil retrouvé également dans une autre étude (Rottoli *et al.*, 2005). Au contraire, peu de différences ont été observées entre la FPI et la forme fibrotique de pneumopathie interstitielle non spécifique (Korfei *et al.*, 2013). Plus récemment, des analyses protéomiques ont été appliquées sur du tissu pulmonaire (Korfei *et al.*, 2011; Korfei *et al.*, 2013), mais cette fois non pas pour la découverte de biomarqueurs, mais plus spécifiquement pour l'étude des mécanismes à l'origine de la fibrose.

Concernant les techniques de transcriptomique, une première étude a mis en évidence une différence entre le profil d'expression génique pulmonaire chez les patients avec une forme stable de FPI et ceux avec une forme progressive (Boon *et al.*, 2009); suggérant que l'analyse du transcriptome sur une biopsie pulmonaire au moment du diagnostic pourrait aider à prévoir l'évolution de la maladie chez un patient donné. Par ailleurs, dans l'étude de Yang (Yang *et al.*, 2012), le profil d'expression génique de la FPI, obtenu cette fois ci dans le sérum, était différent de celui de contrôles sains. Des différences étaient également notées entre une FPI sévère (évaluée par la DLCO) et une FPI discrète. Cette étude suggère que le transcriptome sanguin pourrait identifier la présence d'une FPI et d'en estimer l'étendue.

Ces techniques permettent également d'identifier quelques molécules d'intérêt parmi ces profils (présentes en quantité très élevée, ou très faible, par rapport aux contrôles) et ainsi découvrir de nouveaux marqueurs encore non identifiés. L'intérêt de ces marqueurs est ensuite souvent validé de manière individuelle (RT-PCR quantitative s'il s'agit d'un ARNm, ELISA, immunohistochimie pour une protéine). Certains biomarqueurs précédemment mis en avant, ont été retrouvés par ces méthodes : MMP1, MMP7, IL8 (Rosas *et al.*, 2008; Richards *et al.*, 2012), mais d'autres ont été ainsi « découverts » comme ICAM-1, VCAM-1, S100A12 (Richards *et al.*, 2012), le facteur inhibiteur de la migration des macrophages (macrophage migration inhibitory factor, MIF) ou la calgranuline B (ou S100A9). Une étude récente (Hara *et al.*, 2012) a notamment comparé les performances diagnostiques de la calgranuline B à celles de KL-6, SP-A et SP-D. La concentration en calgranuline B était plus élevée dans le LLBA, mais pas dans le sérum, chez les patients atteints de FPI en comparaison des autres groupes. L'aire sous la courbe ROC (« receiver operating characteristic ») (distinction FPI/ autres pneumopathies) était de 0,972 pour la calgranuline dans le LLBA contre 0,571 pour KL-6, 0,684 pour SP-D et 0,726 pour SP-A. Pour une valeur seuil optimale de 1ng/mL en calgranuline, la sensibilité était de 96,4% et la spécificité de 87,8%.

### 1.7.3 Combinaison de biomarqueurs

Il semble peu probable que l'utilisation d'un seul biomarqueur puisse apporter une sensibilité et une spécificité parfaites pour établir le diagnostic et le pronostic lors de FPI. Toutefois, la combinaison de plusieurs biomarqueurs pourrait permettre d'améliorer les performances globales. Ainsi, dans l'étude de Rosas (Rosas *et al.*, 2008) la combinaison de 5 biomarqueurs (MMP7, MMP1, MMP8, IGFBP1 et TNFRSF1A) permettait de distinguer patients avec FPI et contrôles avec une sensibilité de 98,6% et une spécificité de 98,6% ; performances supérieures à celles de chaque biomarqueur utilisé de manière individuelle. D'autres études comparant des patients avec différentes maladies interstitielles pulmonaires sont toutefois nécessaires pour confirmer l'intérêt de cette combinaison.

Figure 4 : Exemple de l'utilisation combinée de plusieurs biomarqueurs sanguins pour le diagnostic de la fibrose pulmonaire idiopathique, d'après (Rosas *et al.*, 2008)

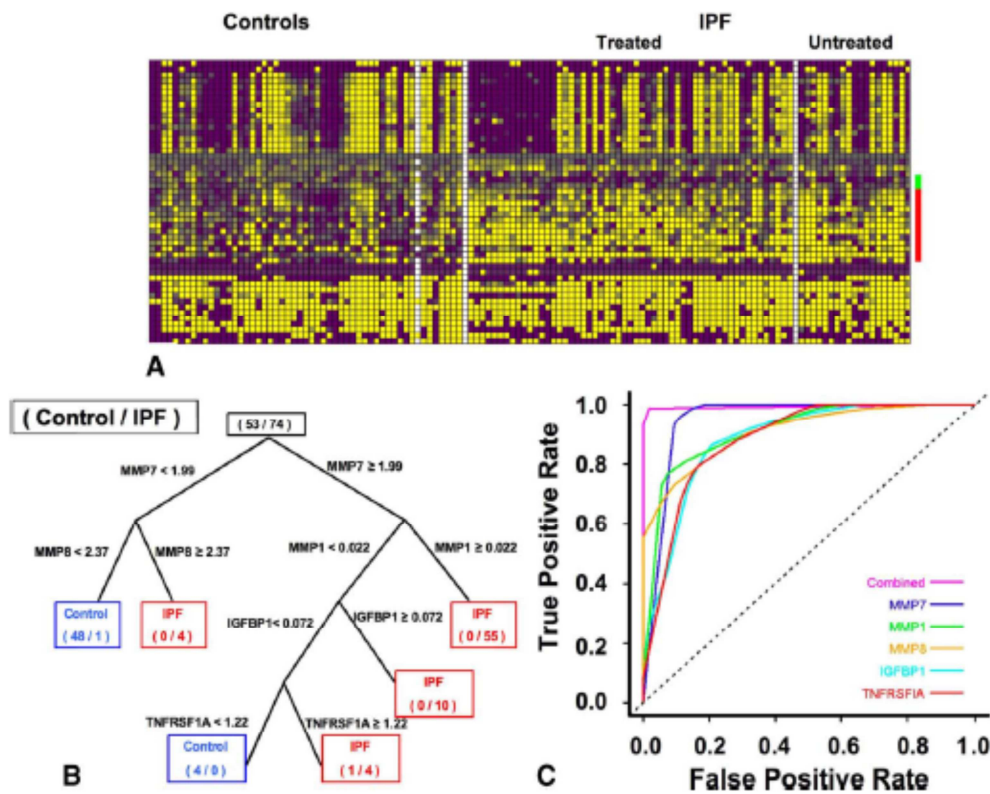


Figure 1. Peripheral Blood Proteins Distinguish IPF Patients from Controls

(A) Heatmap of proteins measured in the plasma of IPF and control patients. Columns, individual patients; rows, proteins. Every protein level was divided by the geometric mean of values for the same proteins for all patients and log based 2 transformed. Increasing shades of yellow, increased; increased shades of purple, decreased; gray, unchanged. Proteins were clustered using Genomica. Red vertical line, cluster of proteins increased in IPF; green vertical line, cluster of proteins decreased in IPF.

(B) Classification tree obtained by CART applied to plasma protein concentration data from IPF patients and controls. A blue box identifies a terminal node as control; a red box as IPF. All counts are listed as control/IPF. Concentrations are in ng/ml. In the subgroup with high MMP7 concentration but low MMP1 concentration (14 IPF samples, five control samples), splitting on IGFBP1 and TNFRSF1A improves classification, while in the subgroup with low MMP7, MMP8 improves classification.

(C) ROC curves for using each of five markers, or their combination, to classify samples as IPF or control. Sensitivity, or true positive rate, is plotted on the y-axis, and false positive rate, or 1 - specificity, on the x-axis. The area under each ROC curve is equivalent to the numerator of the Mann-Whitney U-statistic comparing the marker distributions between IPF and control samples. The magenta line labeled "Combined" is for the combinatorial classifier using all five markers. The identity line at 45° represents a marker that performed no better than classifying samples as IPF or control by flipping a fair coin.

D'un point de vue du pronostic, une étude récente (Song *et al.*, 2013) a évalué l'intérêt de combiner plusieurs biomarqueurs (MMP7, KL-6, SP-A et SP-D) par rapport à de simples paramètres cliniques. L'analyse multivariée a mis en évidence que MMP7 (rapport de risque 1,056), SP-A (rapport de risque 1,011) mais également l'âge, la CVF et le degré d'extension des rayons de miels à la TDM-HR étaient des indicateurs de survie. Les patients avec une concentration

élevée à la fois en MMP7 et en SP-A avaient une survie plus courte (pourcentage de survie à 1 an de 59%) et une fréquence plus élevée de détérioration de la fonction respiratoire (42%) comparés à ceux avec une concentration élevée pour un seul des 2 biomarqueurs (taux de survie à 1 an de 81%, fréquence de déclin de la fonction respiratoire de 27%) ou un taux faible pour les 2 biomarqueurs (83,3% et 9%, respectivement). L'analyse des modèles composites indiquait que l'adjonction de MMP7 et de SP-A aux indicateurs cliniques standards n'apportait qu'une amélioration marginale pour la prédiction de la mortalité (index de concordance pour les paramètres cliniques seuls de 0,686, en ajoutant MMP7 et SP-A : 0,730;  $p=0,061$ ). L'ajout d'un troisième biomarqueur (KL-6) permettait de passer le seuil de significativité (index de 0,730,  $p=0,037$ ). Cette étude rétrospective suggère que les biomarqueurs n'auraient qu'un intérêt limité dans l'établissement du pronostic ; la mesure d'au moins 3 biomarqueurs étant nécessaire pour améliorer la prédiction de la mortalité comparée aux seuls paramètres cliniques.

#### *1.7.4 Conclusion*

De très nombreux biomarqueurs ont ainsi été investigués ou sont en cours d'étude dans la FPI. Toutefois, les résultats obtenus présentent certaines limites. Tout d'abord, les critères diagnostiques de la FPI ont été modifiés à plusieurs reprises. Par exemple, aucune distinction n'était faite au départ entre la FPI et la pneumopathie interstitielle non spécifique. Ainsi, les études réalisées avant 2002 ou incluant des échantillons obtenus avant cette date peuvent comporter des patients pour lesquels le diagnostic de FPI est incertain ou erroné. De plus, les concentrations n'ont généralement été mesurées qu'à un seul moment, ce qui ne permet pas de suivre leur évolution au cours du temps et d'évaluer l'intérêt pronostique des mesures répétées. Par ailleurs, ces biomarqueurs sont des variables continues, une valeur seuil doit donc encore être déterminée pour pouvoir estimer leur sensibilité et spécificité et éventuellement les utiliser en pratique. Finalement, la quasi-totalité de ces biomarqueurs ont été analysés dans une seule cohorte et donc non validés dans une cohorte séparée.

Ainsi, bien que de nombreuses publications suggèrent un potentiel non négligeable de ces biomarqueurs, leur intérêt dans l'établissement du diagnostic et du pronostic lors de FPI reste incertain. Leur utilité doit notamment encore être évaluée dans la pratique quotidienne au chevet des patients mais également dans le cadre de la recherche thérapeutique. En effet, si l'on confirme que certains d'entre eux peuvent prédire l'évolution de la maladie ou estimer la sévérité de la fibrose, ils pourront être très utiles dans les études cliniques pour évaluer précocement l'efficacité d'un traitement et ainsi limiter la durée et les coûts associés à ces études.

Dans cette optique, une étude est en cours (PROFILE pour « Prospective observation of fibrosis in the lungs clinical endpoints », identifiant : NCT01134822 (Maher, 2013)) afin de collecter un maximum de données sur le phénotype des patients avec FPI au cours du temps. Le premier objectif de cette étude est de valider de manière prospective les biomarqueurs identifiés précédemment sur une population de grande taille et parfaitement phénotypée. Les techniques de biologie moléculaire à large échelle (protéomique, transcriptomique) seront ensuite appliquées à des échantillons prélevés sur cette population afin d'identifier une empreinte de la FPI et ainsi mieux comprendre sa pathogénie et identifier de futures cibles thérapeutiques. Cette étude devrait également permettre d'analyser de manière prospective l'évolution de la maladie dans l'objectif de déterminer des critères cliniques et biologiques pour les utiliser par la suite dans les études cliniques. Une autre étude est également en cours (« Genomic and Proteomic Analysis of Disease Progression in Idiopathic Pulmonary Fibrosis IPF(GAP) », identifiant : NCT00373841) et va utiliser spécifiquement les techniques de génomique et de protéomique. Les marqueurs génétiques et biologiques obtenus seront corrélés avec l'évolution des symptômes dans le but de pouvoir identifier les patients qui connaîtront un déclin rapide de la fonction respiratoire.

## 1.8 Traitement

Le traitement de la FPI fait l'objet d'une recherche intensive depuis les dernières décennies, néanmoins aucune thérapeutique n'a pour l'instant fait preuve de son efficacité. Plusieurs études ont ainsi testé l'impact de thérapies immunomodulatrices, d'anticoagulants, d'antagonistes de récepteurs de l'ET1, de vasodilatateurs, d'antifibrotiques et d'inhibiteurs de différentes cytokines, sans succès (Rafii *et al.*, 2013). Il a été démontré que l'utilisation des corticostéroïdes n'avait aucun intérêt, tandis que la trithérapie (prednisone, azathioprine et N-acétylcystéine), longtemps préconisée, s'est récemment révélée délétère (Raghu *et al.*, 2012) et n'est donc plus recommandée. La N-acétylcystéine ne semble pas non plus avoir d'intérêt en monothérapie (Martinez *et al.*, 2014). Une molécule, la pirfénidone, a récemment obtenu l'autorisation de mise sur le marché pour le traitement de la FPI au Japon puis en Europe. Ses propriétés anti-fibrotiques, anti-oxydantes et anti-inflammatoires ont été bien établies dans les modèles murins de fibrose. Dans une étude japonaise sur des patients atteints de FPI, la pirfénidone ralentissait le déclin de la fonction respiratoire (Taniguchi *et al.*, 2010) et une étude récente (King *et al.*, 2014) a confirmé que l'administration de pirfénidone permettait de ralentir l'évolution de la maladie, telle que reflétée par l'évaluation de la fonction pulmonaire, de la tolérance à l'exercice et de la survie sans progression chez les patients traités par rapport à un groupe placebo. Les inhibiteurs des tyrosines kinases sont également évalués dans le traitement de la FPI; on peut notamment citer la nintedanib pour laquelle deux essais cliniques de phase 3 (Richeldi *et al.*, 2014) ont récemment mis en évidence une réduction du déclin de la CVF, suggérant un effet positif sur la progression de la maladie. La transplantation pulmonaire est toutefois la seule intervention ayant à l'heure actuelle prouvée son efficacité en termes de prolongation de la survie (Rafii *et al.*, 2013).

Les résultats de ces recherches sont d'autant plus décevants que des résultats très prometteurs avaient été obtenus dans des modèles murins de fibrose pulmonaire, démontrant les limites de ce type de modèle expérimentaux (Moeller *et al.*, 2008). Afin d'avancer dans la recherche d'un traitement de la FPI, il semble important de définir d'autres modalités ou modèles pour tester les molécules d'intérêt mais également de mieux les sélectionner. Cette sélection passe avant tout par une meilleure compréhension des processus conduisant et perpétuant le phénomène de fibrose. De nombreuses avancées ont été faites dernièrement dans ce domaine et il est probable que d'autres molécules arriveront bientôt sur le marché. Une stratégie thérapeutique efficace de la FPI ciblera probablement non pas un mais plusieurs de ces mécanismes.

## 1.9 Etio-pathogénie

Des formes familiales (c'est-à-dire affectant 2 membres ou plus d'une même famille) ont été reportées dans la FPI, bien qu'elles correspondent à moins de 5% des cas (Bitterman *et al.*, 1986; Marshall *et al.*, 2000b; Hodgson *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2005; Allam et Limper, 2006). Les critères diagnostiques des formes familiales sont les mêmes que pour les formes sporadiques et ces deux formes ne sont d'ailleurs pas discernables d'un point de vue clinique ou histologique (Marshall *et al.*, 2000b; Hodgson *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2005). Toutefois les formes familiales peuvent apparaître de manière plus précoce (Mageto et Raghu, 1997; Marshall *et al.*, 2000b; Hodgson *et al.*, 2002), et les études de transcriptomique ont identifié des profils d'expression génique différents dans ces deux formes (Yang *et al.*, 2007a).

### 1.9.1 Facteurs de risque

Bien que la FPI soit, par définition, une affection dont l'étiologie est inconnue, plusieurs facteurs de risque potentiels ont été décrits.

#### 1.9.1.1 Facteurs environnementaux

Un risque plus élevé de développer une FPI a été associé avec une grande variété de facteurs environnementaux (Iwai *et al.*, 1994; Baumgartner *et al.*, 1997; Hubbard *et al.*, 2000; Hubbard, 2001; Miyake *et al.*, 2005; Steele *et al.*, 2005; Taskar et Coultas, 2006; Gustafson *et al.*, 2007); en particulier le tabac, les poussières de métal et de bois. Le travail d'agriculteur ou de coiffeur, le travail de la pierre, l'élevage d'oiseaux, ou l'exposition à des poussières animales ou végétales ont également été associés avec la FPI (Baumgartner *et al.*, 1997). La découverte de particules inorganiques dans les nœuds lymphatiques des patients avec FPI supporte cette hypothèse (Kitamura *et al.*, 2007). Toutefois ces résultats doivent être interprétés avec précaution, ces études épidémiologiques étant toujours sujettes à de nombreux biais et limitations.

#### 1.9.1.2 Agents infectieux

Plusieurs études ont investigué le possible rôle des infections virales chroniques dans l'étiologie de la FPI (Ueda *et al.*, 1992; Irving *et al.*, 1993; Egan *et al.*, 1995; Meliconi *et al.*, 1996; Kuwano *et al.*, 1997; Wangoo *et al.*, 1997; Yamaguchi *et al.*, 1997; Yonemaru *et al.*, 1997; Stewart *et al.*, 1999; Tsukamoto *et al.*, 2000; Lok *et al.*, 2001; Idilman *et al.*, 2002; Kelly *et al.*, 2002; Arase *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2003; Miyake *et al.*, 2005; Procop *et al.*, 2005; Zamo *et al.*, 2005). La plupart se sont focalisées sur les virus d'Epstein-Barr (Egan *et al.*, 1995; Kuwano *et al.*, 1997; Wangoo *et al.*, 1997; Stewart *et al.*, 1999; Tsukamoto *et al.*, 2000; Lok *et al.*, 2001; Kelly *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2003; Zamo *et al.*, 2005) et de l'hépatite C (Ueda *et al.*, 1992; Irving *et al.*, 1993; Meliconi *et al.*, 1996; Yamaguchi *et al.*, 1997; Idilman *et al.*, 2002; Arase *et al.*, 2003; Miyake *et al.*, 2005). Malgré ce grand nombre d'études, une conclusion définitive sur le rôle des agents infectieux dans le développement de la FPI n'a toutefois pas encore été établie.

#### 1.9.1.3 Reflux gastroœsophagien

Plusieurs études ont suggéré qu'un reflux gastroœsophagien anormal, entraînant des microaspirations, est un facteur de risque de FPI (Gribbin *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010). Du reflux gastroœsophagien est fréquemment observé chez les patients avec FPI (Tobin *et al.*, 1998; Patti *et al.*, 2005; Raghu *et al.*, 2006a). Ces reflux sont les plus souvent asymptomatiques (Tobin *et al.*, 1998; Raghu *et al.*, 2006a) et la présence de régurgitation ou de sensation de brûlure au niveau de la poitrine ne permet pas de distinguer les patients avec ou sans reflux (Patti *et al.*, 2005). Toutefois, les reflux gastroœsophagiens sont également fréquents dans la population générale et chez des individus avec d'autres maladies pulmonaires avancées (D'ovidio *et al.*, 2005; Fortunato *et al.*, 2008). Le rôle des reflux gastroœsophagiens doit donc encore être déterminé.

#### 1.9.1.4 Facteurs génétiques

##### 1.9.1.4.1 Formes familiales

Le mode de transmission le plus probable est de type autosomal dominant avec pénétrance incomplète (Musk *et al.*, 1986; Lee *et al.*, 2005; Steele *et al.*, 2005; Allam et Limper, 2006; Rosas *et al.*, 2007). Un lien avec le chromosome 14 a été suggéré (Musk *et al.*, 1986). Toutefois, les associations les plus fortes ont été retrouvées avec des mutations dans le gène de la protéine C du surfactant (Thomas *et al.*, 2002). Des mutations rares de la protéine A2 du surfactant ont également été associées avec les formes familiales de fibrose pulmonaire et les cancers du poumon (Wang *et al.*, 2009); le locus a été découvert par analyse des liaisons génétiques dans un large pedigree et deux mutations ont été identifiées par séquençage des gènes candidats à l'intérieur du locus. Des rapports récents ont documenté l'existence de variants dans les gènes de la télomérase (TERC et TERT). Ces mutations sont retrouvées jusque dans 15% des cas de fibrose pulmonaire familiale (Armanios *et al.*, 2007; Tsakiri *et al.*, 2007; Cronkhite *et al.*, 2008; Mushiroda *et al.*, 2008). Une



étude d'association sur génome entier réalisée sur 82 familles avec des cas de FPI a mis en évidence un lien entre la maladie et un SNP sur le chromosome 11 (Seibold *et al.*, 2011). Une analyse plus précise a révélé qu'un allèle particulier (rs35705950) juste en amont du gène MUC5B était retrouvé chez 34% des individus avec une fibrose pulmonaire familiale.

#### 1.9.1.4.2 Formes sporadiques

L'association avec les mutations de la protéine C du surfactant n'a pas été retrouvée chez les patients avec une forme sporadique (Lawson *et al.*, 2004; Markart *et al.*, 2007). Les mutations de TERT et TERC sont retrouvées dans 3% des cas de formes sporadiques de FPI. Toutefois, bien que ces mutations n'affectent qu'une faible minorité de patients, une proportion beaucoup plus importante a des télomères de taille diminuée (Alder *et al.*, 2008). Le SNP en amont du gène MUC5 a également été retrouvé chez 38% des cas d'une cohorte de patients avec une FPI sporadique et seulement 9% des individus sains (Seibold *et al.*, 2011). L'expression pulmonaire en MUC5B était 37,4 fois plus importante chez les individus sains comportant au moins un allèle muté rs35705950 par rapport aux individus sains homozygotes sauvages. Une analyse indépendante a également révélé l'association de cet allèle avec la forme sporadique de la FPI dans deux cohortes (Zhang *et al.*, 2011) avec présence du SNP chez 34% des cas contre seulement 11% des individus contrôles. Toutefois, il reste à déterminer comment la surexpression de MUC5B pourrait contribuer au développement de la fibrose.

Des polymorphismes dans des gènes codant pour des cytokines (interleukine 1 $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), lymphotoxine  $\alpha$ , IL4, IL6, IL8, IL10 et IL12 (Renzoni *et al.*, 2000; Whyte *et al.*, 2000; Freeburn *et al.*, 2001; Pantelidis *et al.*, 2001; Hutyrova *et al.*, 2002; Latsi *et al.*, 2003; Whittington *et al.*, 2003; Riha *et al.*, 2004; Vasakova *et al.*, 2006; Vasakova *et al.*, 2007), des enzymes (antitrypsine  $\alpha$ 1 (Geddes *et al.*, 1977; Hubbard *et al.*, 1997), enzyme de conversion de l'angiotensine (Morrison *et al.*, 2001), des molécules profibrotiques (TGFB1 (Xaubet *et al.*, 2003)), des protéines des voies de la coagulation (inhibiteurs 1 et 2 de l'activateur du plasminogène), des protéines du surfactant (SP-A, SP-B (Selman *et al.*, 2003) mais pas SP-C), des protéines immunomodulatrices (récepteur 1 du complément, NOD2/CARD15 (Zorzetto *et al.*, 2005)) et une métalloprotéase de la matrice (MMP1 (Checa *et al.*, 2008)) ont été retrouvés avec une fréquence augmentée chez les patients avec une FPI sporadique. Nombre d'entre eux ont également été associés à la progression de la maladie. Toutefois, aucun de ces résultats n'a été confirmé par la suite. Les haplotypes de l'antigène HLA de classe I et II ont une distribution déséquilibrée au sein des patients avec FPI (Falfan-Valencia *et al.*, 2005) et l'origine ethnique pourrait également avoir un rôle dans l'évolution de la maladie (Lederer *et al.*, 2006). Les résultats d'une étude d'association sur génome entier sur des patients avec pneumopathies interstitielles idiopathiques fibrosantes ont été publiés récemment (Fingerlin *et al.*, 2013). Cette étude a confirmé une association avec TERT, MUC5B et TERC et a identifié 7 nouveaux loci associés avec la fibrose pulmonaire : FAM13A, DSP, OBFC1, ATP11A, DPP9 et 2 régions situées en 7q22 et 15q14-15.

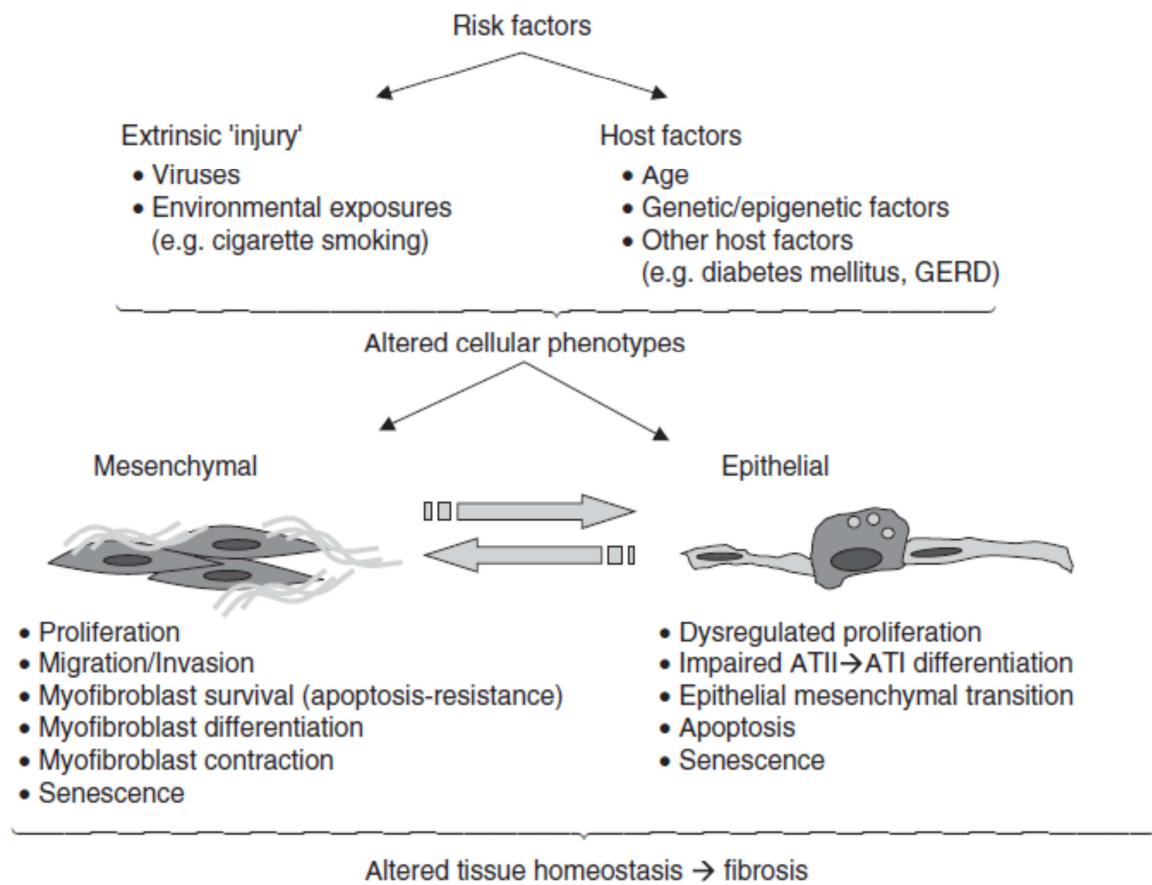
Ces études d'association doivent encore être investiguées dans de plus grandes cohortes et, pour l'instant, aucun facteur génétique n'a été associé de manière systématique aux cas sporadiques de FPI.

#### 1.9.2 Mécanismes et voies impliqués dans la pathogénie de la FPI

Le concept sur la pathogénie de la FPI a évolué ces dernières années. Un phénomène inflammatoire chronique a été d'abord évoqué (Bitterman *et al.*, 1983). Une des hypothèses qui prévalent à l'heure actuelle est celle d'une cicatrisation aberrante secondaire à une atteinte initiale et probablement répétée de l'épithélium alvéolaire (Selman *et al.*, 2001). D'autres concepts récents font référence à un processus multifactoriel et hétérogène incluant une sénescence cellulaire en particulier des cellules épithéliales alvéolaires (CEA), un stress oxydatif, un stress du réticulum

endoplasmique, une altération des voies de la coagulation et de l'angiogenèse, une plasticité cellulaire accrue ou l'épigénétique (Ding *et al.*, 2011; King *et al.*, 2011; Wolters *et al.*, 2013). Chez un sujet prédisposé génétiquement ou épigénétiquement, l'exposition à des agents lésionnels pourrait induire des altérations phénotypiques des cellules pulmonaires. Ces altérations conduiraient à des interactions anormales entre épithélium et mésenchyme et finalement à la fibrose. La FPI peut donc être considérée comme un problème d'une homéostasie altérée et d'une communication aberrante entre les différentes cellules pulmonaires. Ces mécanismes complexes font l'objet d'une littérature très abondante et seules les voies principales et en rapport avec la suite de notre travail seront présentées ici.

Figure 5 : Pathogénie de la fibrose pulmonaire idiopathique, d'après (Ding *et al.*, 2011)



AT: alveolar epithelial cell; GERD: gastro-oesophageal reflux disease

### 1.9.2.1 Inflammation

Le rôle que joue l'inflammation dans le développement de la fibrose est incertain (Bringardner *et al.*, 2008). La plupart des modèles expérimentaux murins de fibrose (par exemple suite à l'administration de bléomycine) présentent une réponse inflammatoire précoce et exubérante, suivie par un processus inflammatoire plus chronique. Dans l'hypothèse d'atteintes lésionnelles répétées de l'épithélium, on peut présumer qu'une inflammation accompagne ces lésions. Il est toutefois probable que ces lésions initiales aient lieu des années avant que le patient ne commence à présenter des symptômes et que la réponse inflammatoire initiale se soit dissipée au moment du diagnostic (Loomis-King *et al.*, 2013). Une réponse immunitaire adaptative dérégulée et l'inflammation secondaire pourraient participer à la pathogénie de la FPI.

### 1.9.2.2 Lésions et activation de l'épithélium alvéolaire

Les cellules épithéliales alvéolaires (CEA) de type I recouvrent la majeure partie de la surface alvéolaire. Quand les CEA de type I sont lésées ou manquantes, les CEA de type II subissent une prolifération hypertrophique afin de recouvrir la membrane basale exposée. Si ce processus est inefficace, les alvéoles peuvent se collaber et se consolider. Lors d'une cicatrisation normale, les CEA de type II hypertrophiques subissent par la suite une apoptose régulée et les cellules restantes prolifèrent et se différencient pour devenir des CEA de type I.

Un point commun de la plupart des mutations identifiées dans la FPI est qu'elles affectent des gènes qui sont soit exprimés par les CEA (SP-A, SP-C, MUC5B) soit qui entraînent des changements moléculaires identifiés à leur niveau (TERT, TERC) (Wolters *et al.*, 2013). Par exemple, les mutations affectant les gènes du surfactant sont associées à une instabilité des protéines après traduction. Ces protéines du surfactant mutées ne peuvent pas former de polymères organisés et sont retenues de manière anormale dans le réticulum endoplasmique des CEA (Wolters *et al.*, 2013); leur accumulation peut entraîner des lésions au sein de ces cellules (King *et al.*, 2011). Les mutations des gènes TERC et TERT peuvent entraîner une diminution de la taille des télomères et à terme ainsi entraîner l'apoptose cellulaire, donc la mort des CEA. Les différents facteurs de risques environnementaux évoqués précédemment (Lee *et al.*, 2010; Raghu *et al.*, 2011), mais également les infections virales chroniques (en particulier herpétique) (Kelly *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2003; Korfei *et al.*, 2008; Lawson *et al.*, 2008) pourraient également contribuer aux lésions de l'épithélium et à l'induction d'une apoptose dans la FPI. Les patients avec FPI ont donc une perte importante des pneumocytes de type I. De plus, la différenciation des CEA de type II en CEA de type I, indispensable pour rétablir un épithélium alvéolaire fonctionnel, est défectueuse dans la FPI, peut-être à cause d'anomalies sous-jacentes de la matrice extracellulaire et d'une interruption de la membrane basale de l'épithélium (King *et al.*, 2011). Cette perte en CEA de type I pourrait provoquer une réduction de la concentration en certaines molécules antifibrotiques, normalement produites par les CEA, en particulier la cavéoline-1 (Wang *et al.*, 2006). Par ailleurs, le « receptor for advanced glycation end products » (RAGE) est aussi en quantité diminuée lors de FPI. Le RAGE est un membre des immunoglobulines de la superfamille des récepteurs cellulaires de surface, qui est normalement abondamment exprimé par les CEA de type I (Fehrenbach *et al.*, 1998; Demling *et al.*, 2006). La perte de ce récepteur pourrait résulter en une diminution de l'attachement de ces cellules à la membrane basale, empêchant ainsi la ré-épithélialisation.

Malgré l'existence de lésions et d'une apoptose épithéliales, un nombre accru de CEA hypertrophiques est une des caractéristiques de la FPI (King *et al.*, 2011). Les cellules épithéliales sont hautement actives et entraînent une dysrégulation du processus de cicatrisation qui semble en permanence activé malgré la disparition du stimulus primaire (Selman *et al.*, 2001). Dans des circonstances pathologiques et en présence du TGF $\beta$ 1, les fibroblastes s'accumulent dans les zones lésées et se différencient en myofibroblastes exprimant l' $\alpha$ SMA ( $\alpha$  smooth muscle actin) et sécrétant du collagène et d'autres protéines de la matrice extracellulaire (Society, 2002). L'examen histologique des tissus atteints met d'ailleurs en évidence que les CEA à proximité des foyers fibroblastiques sont souvent hypertrophiques et anormales au lieu de connaître une réparation appropriée (Noble *et al.*, 2012).

### 1.9.2.3 Stress oxydatif et stress du réticulum endoplasmique

Le stress oxydatif correspond à un déséquilibre entre la production des radicaux libres (dérivés réactifs de l'oxygène et du nitrogène) et la capacité des tissus à les détoxifier notamment grâce aux molécules antioxydantes (superoxyde dismutases, glutathion) (Ding *et al.*, 2011). Les radicaux libres provoquent des dommages directs sur l'ADN, l'oxydation des acides gras polyinsaturés au niveau des membranes cellulaires et l'inactivation d'enzymes. La surproduction

relative de radicaux libres altère les phénotypes cellulaires et entraîne à terme des dommages tissulaires (Lambeth, 2007). Elle peut également influencer l'apparition d'un microenvironnement favorisant la fibrose au lieu de la régénération. En effet, un stress oxydatif exagéré peut entraîner une induction prématurée de la sénescence cellulaire (Dasari *et al.*, 2006; Macnee, 2009), et les fibroblastes peuvent acquérir un phénotype résistant à l'apoptose en conséquence de cette sénescence (Wang, 1995; Campisi et D'adda Di Fagagna, 2007). Ces fibroblastes en sénescence arrêtent leur réplication tout en restant actifs sur le plan métabolique et génèrent des quantités importantes de radicaux libres (Toussaint *et al.*, 2000). Le peroxyde d'hydrogène ainsi produit par les myofibroblastes peut avoir des effets profibrotiques localement en induisant l'apoptose des cellules épithéliales (Larios *et al.*, 2001; Waghay *et al.*, 2005). Les résultats de différentes études ont démontré que les poumons sont le siège d'un déséquilibre oxydatif important lors de FPI, probablement suite à une augmentation en molécules oxydantes associée à un déficit extracellulaire en glutathion (Kuwano *et al.*, 1996; Montuschi *et al.*, 1998; Kuwano *et al.*, 2003; Kinnula *et al.*, 2005). En effet, la charge oxydante est augmentée au niveau tissulaire (Cantin *et al.*, 1987; Jack *et al.*, 1996) et des taux élevés en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et en 8-isoprostane ont été retrouvés dans l'air expiré par les patients atteints (Psathakis *et al.*, 2006). En mesurant les peroxydes d'hydrogène sériques, Daniil a identifié une concentration plus élevée de radicaux libres circulants chez les patients avec FPI comparés à des contrôles sains d'âge similaire. Cette concentration était également inversement corrélée avec le volume pulmonaire et la DLCO (Daniil *et al.*, 2008).

Le stress oxydatif a également été proposé comme mécanisme potentiel de déclenchement d'un stress du réticulum endoplasmique (Korfei *et al.*, 2008). Le réticulum endoplasmique est un compartiment cellulaire où les protéines membranaires et sécrétées sont produites, assemblées et mûrissent avant d'être prises en charge par l'appareil de Golgi. Le stress du réticulum endoplasmique apparaît lors de déséquilibre entre la demande cellulaire en synthèse protéique et la capacité du réticulum endoplasmique à synthétiser ces protéines. Dans ce cas, une réponse cellulaire est activée, appelée la « unfolded protein response (UPR) ». Quand cette réponse ne suffit pas à combler la demande, une UPR terminale est activée et la cellule se sacrifie par déclenchement des voies de l'apoptose (Ding *et al.*, 2011). Différentes études ont mis en évidence que des marqueurs de l'UPR sont en quantité augmentée dans les cellules épithéliales alvéolaires de type II (Korfei *et al.*, 2008; Lawson *et al.*, 2008; Cha *et al.*, 2012). Bien qu'il y ait des évidences fortes pour une activation de l'UPR au niveau des CEA chez les patients avec FPI, il reste encore à déterminer si cette activation suffit au développement de la fibrose.

D'autres causes possibles d'un stress du réticulum endoplasmique ont été identifiées chez les patients avec FPI, telles que les mutations de SP-A et SP-C (Bridges *et al.*, 2006; Maitra *et al.*, 2010; Lawson *et al.*, 2011; Tanjore *et al.*, 2011) ou la production de protéines virales herpétiques (Lawson *et al.*, 2008). Toutefois d'autres causes doivent encore être identifiées car les mutations des gènes du surfactant ne sont retrouvées que dans un faible pourcentage des cas et les herpès virus ne sont présents que chez une partie des patients atteints (Lawson *et al.*, 2008; Kropski *et al.*, 2012).

#### 1.9.2.4 Communication entre épithélium et mésenchyme

Dans les conditions normales d'homéostasie, il semble que ces CEA de type I contrôlent les cellules mésenchymateuses par la sécrétion de différents médiateurs et par contact cellulaire direct. Une altération de cette communication pourrait également intervenir dans la pathogénie de la FPI (Wolters *et al.*, 2013). Dans les poumons sains ou atteints de FPI, les cellules épithéliales et les fibroblastes sont accolés, notamment au niveau des foyers fibroblastiques où une couche de cellules épithéliales recouvrent les fibroblastes. Dans ces zones, les cellules épithéliales pourraient ainsi agir sur les fibroblastes directement en libérant différents médiateurs solubles. Des évidences

fortes indiquent ainsi que les CEA sont la source principale de médiateurs agissant comme facteurs chimiotactiques ou mitogènes pour les cellules mésenchymateuses, incluant le facteur dérivé des plaquettes (platelet-derived growth factor, PDGF), le TGFB1, le TNF $\alpha$  et l'ET1 (Selman et Pardo, 2006; King *et al.*, 2011). Ces facteurs contribuent notamment à la migration, la prolifération et la différenciation des cellules mésenchymateuses résidentes. Un exemple est la libération de TGFB1 par les cellules épithéliales (Xu *et al.*, 2003) et son activation par l'intégrine épithéliale  $\alpha\text{v}\beta 6$ ; le TGFB1 actif convertit ensuite les fibroblastes en myofibroblastes exprimant l' $\alpha$ SMA. Le PDGF peut contribuer à la fibrose en stimulant la prolifération des fibroblastes (Bergeron *et al.*, 2003; Hetzel *et al.*, 2005). Les autres médiateurs solubles produits par les cellules épithéliales qui peuvent agir sur les fibroblastes adjacents sont les protéines Wnt (Wolters *et al.*, 2013).

#### 1.9.2.5 Fibroblastes

Tout comme les CEA, les fibroblastes sont considérés comme centraux dans la pathogénie de la FPI. Ils sont retrouvés en nombre augmenté et sous un phénotype activé dans l'interstitium (King *et al.*, 2011; Wolters *et al.*, 2013). Les différents mécanismes cellulaires pouvant conduire à l'accumulation de fibroblastes et de myofibroblastes dans les poumons avec FPI incluent l'expansion de cellules mésenchymateuses résidentes, la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et la différenciation de précurseurs circulants : les fibrocytes. Alors que le rôle de l'accumulation et l'activation des fibroblastes résidents quiescents dans la pathogénie de la FPI est bien établi, la contribution de la TEM et des fibrocytes circulants à cette accumulation est moins claire.

##### 1.9.2.5.1 Origine des fibroblastes

###### 1.9.2.5.1.1 Transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)

La TEM est le processus par lequel des cellules épithéliales acquièrent des caractères moléculaires et physiologiques normalement associés aux cellules mésenchymateuses (Wolters *et al.*, 2013). Ce processus intervient dans trois contextes : le développement, les processus cancéreux et la fibrose (Kim *et al.*, 2006c; Willis et Borok, 2007; Kage et Borok, 2012). L'homéostasie normale d'un tissu ne nécessite pas la TEM ; au contraire, la TEM est activée lors de lésions ou de remodelage tissulaires (Kalluri et Neilson, 2003; Willis et Borok, 2007). L'existence d'une TEM des cellules alvéolaires lors de FPI a été suspectée suite à la mise en évidence dans le tissu pulmonaire d'une co-localisation par immunohistochimie de protéines associées aux cellules épithéliales et aux cellules mésenchymateuses (Willis *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006c; Marmai *et al.*, 2011). Bien que ces résultats indiquent que les cellules épithéliales peuvent acquérir des caractéristiques propres aux cellules mésenchymateuses dans les poumons avec FPI, la contribution de ces changements dans le processus de fibrose reste indéterminée. Que ces cellules épithéliales acquièrent suffisamment ou pas assez de marqueurs mésenchymateux pour être classées comme fibroblastes est encore sujet à controverse, notamment car il n'existe pas à l'heure actuelle de marqueurs spécifiques pour les fibroblastes (Ding *et al.*, 2011; Wolters *et al.*, 2013).

Une relation entre activation de l'UPR et TEM a été reportée (Tanjore *et al.*, 2011; Zhong *et al.*, 2011). En effet, quand les CEA sont exposées à des inducteurs du stress du réticulum endoplasmique, elles changent de morphologie et diminuent l'expression de marqueurs épithéliaux tout en augmentant celle de marqueurs mésenchymateux.

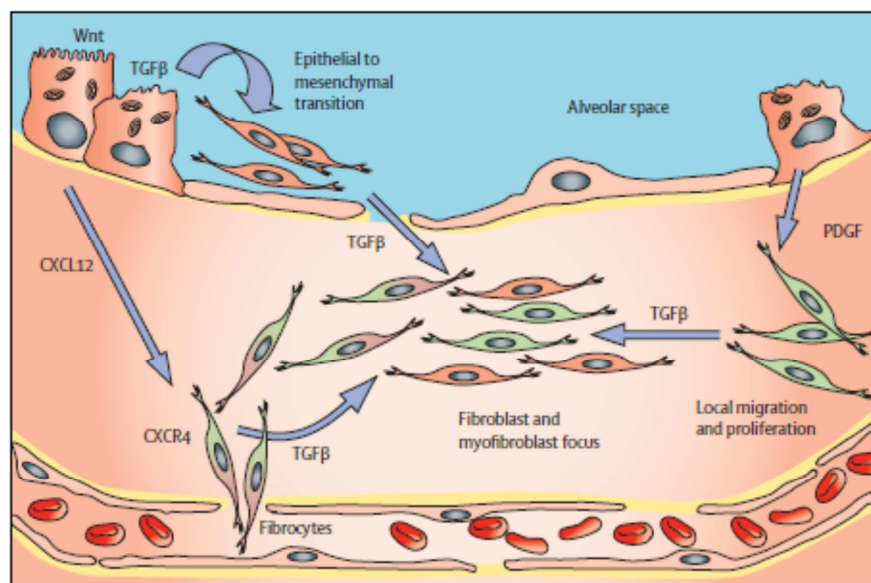
###### 1.9.2.5.1.2 Fibrocytes circulants

Les fibrocytes sont des cellules mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse qui peuvent être identifiées dans la circulation ou dans les tissus grâce à leur co-expression de marqueurs des précurseurs des cellules hématopoïétiques (CD34 ou CD45) et des cellules mésenchymateuses (collagène de type I, fibronectine) (Bucala *et al.*, 1994). Il a été proposé que les

fibrocytes contribuent au développement de la fibrose pulmonaire, soit directement en produisant des protéines de la matrice extracellulaire (collagène de type I et III), soit en se différenciant en fibroblastes ou myofibroblastes, soit en produisant des cytokines induisant la déposition de collagène (Strieter *et al.*, 2009; Maharaj *et al.*, 2012). Les fibrocytes ont été retrouvés dans la circulation (Mehrad *et al.*, 2007; Andersson-Sjoland *et al.*, 2008; Moeller *et al.*, 2009) et le parenchyme pulmonaire (Andersson-Sjoland *et al.*, 2008) des patients avec FPI. Une augmentation de la quantité de fibrocytes circulants a été corrélée avec les épisodes d'exacerbation aigue (Moeller *et al.*, 2009) et ce taux élevé retournait à la valeur de base une fois l'épisode résolu. De plus, les patients pour lesquels les fibrocytes représentaient plus de 5% des leucocytes avaient un pronostic plus mauvais que ceux avec un pourcentage inférieur.

L'épithélium alvéolaire pourrait jouer un rôle dans le recrutement de ces fibrocytes lors de FPI. Les fibrocytes expriment les récepteurs des chimiokines CXCR4, récepteur membranaire de la chimiokine CXCL12 (Andersson-Sjoland *et al.*, 2008; Strieter *et al.*, 2009) et CCR2, récepteur de la chimiokine CCL2 (Ekert *et al.*, 2011). Lors de FPI, l'épithélium alvéolaire exprime le CXCL12, un ligand pour CXCR4 (Mehrad *et al.*, 2007; Andersson-Sjoland *et al.*, 2008). De plus, les taux circulants en CXCL12 sont augmentés dans le plasma des patients avec FPI (Mehrad *et al.*, 2007; Andersson-Sjoland *et al.*, 2008). Lors de FPI, l'épithélium alvéolaire exprime également le CCL2 (Mercer *et al.*, 2009), un ligand pour CCR2. Ces observations suggèrent que les fibrocytes circulants pourraient être recrutés au niveau pulmonaire dans la FPI par l'intermédiaire de l'axe CXCR4/ CXCL12 et/ou CCL2/ CCR2 et pourraient contribuer au développement de la fibrose pulmonaire (Wolters *et al.*, 2013).

**Figure 6 : Sources cellulaires des fibroblastes lors du développement de la fibrose pulmonaire idiopathique, d'après (King *et al.*, 2011)**



*CXCL12* chimiokine ligand 12(CXC family); *CXCR4*: receptor 4 of the CXC family; *PDGF*: platelet-derived growth factor; *TGFβ*: transforming growth factor beta

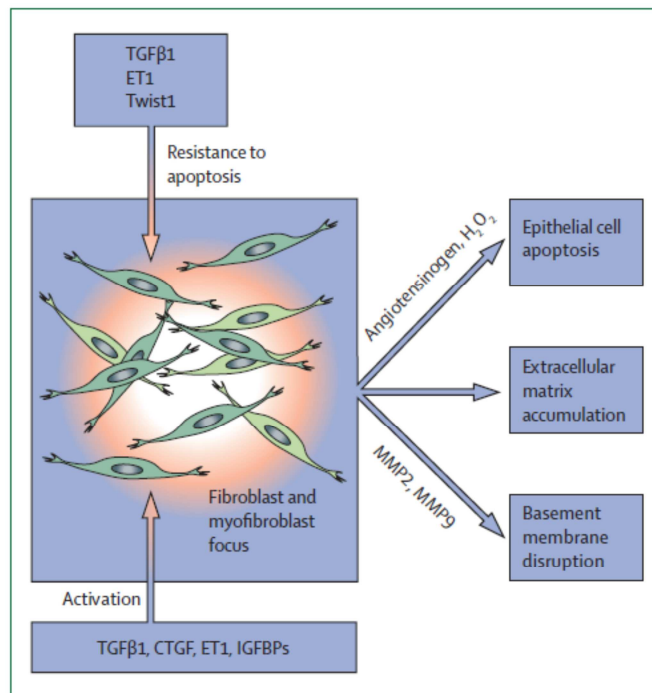
#### 1.9.2.5.2 Activation des fibroblastes

Les fibroblastes présents dans l'interstitium lors de FPI sont majoritairement des myofibroblastes (Scotton et Chambers, 2007). Il s'agit d'un phénotype activé et contractile, avec un potentiel profibrotique accru. Comparés aux fibroblastes résidents, les myofibroblastes sécrètent

une quantité excessive de matrice extracellulaire, incluant du collagène de type I (Klingberg *et al.*, 2013), entraînant ainsi la fibrose et le remodelage pulmonaire. Les myofibroblastes activés sécrètent de l'angiotensinogène et du peroxyde d'hydrogène qui participent à l'apoptose des cellules épithéliales. Ils produisent également des métalloprotéases de la matrice, telles que MMP2 ou MMP9, qui sont impliquées dans la rupture de la membrane basale (Wang *et al.*, 1999b; Waghray *et al.*, 2005). Les trois facteurs principaux induisant la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes sont les stress mécaniques, une augmentation locale de la concentration en TGFβ1 activé et la présence de protéines de la matrice dont la fibronectine (Hinz *et al.*, 2007).

D'une manière plus globale, les dysfonctions épithéliales et la signalisation aberrante entre l'épithélium et le mésenchyme conduisent à l'activation des fibroblastes et par la suite au dépôt et au remodelage de la matrice extracellulaire (Wolters *et al.*, 2013). L'activation chronique de ces fibroblastes semble contribuer au développement de la fibrose, notamment par l'acquisition d'une résistance à l'apoptose et d'un phénotype invasif (Ramos *et al.*, 2001; Xia *et al.*, 2008; Maher *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011c). Durant la cicatrisation normale, les fibroblastes sont éliminés par l'activation des voies de l'apoptose. Ce mécanisme de clairance des fibroblastes limite la déposition continue de la matrice et donc la fibrose. Au contraire de fibroblastes normaux, les fibroblastes dans la FPI résistent à l'apoptose quand ils sont exposés au ligand FAS (Maher *et al.*, 2010) et ont de plus grandes capacités de prolifération. Les fibroblastes dans la FPI pourraient être protégés de l'apoptose entre autre grâce à la présence de TGFβ1 et d'ET1 (Kulasekaran *et al.*, 2009) ou à la présence de faibles taux de cyclooxygénase 2 (COX-2) (Wilborn *et al.*, 1995). Toutefois, les raisons pour lesquelles fibroblastes et myofibroblastes survivent alors que les CEA meurent au sein du même microenvironnement n'ont pas encore été élucidées (Thannickal et Horowitz, 2006), le terme de paradoxe de l'apoptose étant employé. Une explication envisagée est qu'une déficience en prostaglandine E2, classiquement observée lors de FPI, pourrait augmenter la sensibilité des CEA à l'apoptose mais diminuer celle des fibroblastes (Maher *et al.*, 2010).

Figure 7 : Foyers fibroblastiques : formation et conséquences, d'après (King *et al.*, 2011)



CTGF: connective tissue growth factor; ET1: endothelin-1; insulin growth factor-binding protein; MMP: matrix metalloproteinase; TGFβ1: transforming growth factor beta 1

#### 1.9.2.6 Rôle de la matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire est profondément altérée dans les poumons atteints de FPI. Une autre explication pour la progression de la FPI est que la matrice remodelée de manière pathologique contient des molécules qui induisent les cellules mésenchymateuses à libérer des composants supplémentaires de la matrice extracellulaire (Wolters *et al.*, 2013). Il est possible qu'au-delà d'un seuil critique de matrice extracellulaire déposée, un rétrocontrôle positif s'installe avec une auto amplification du dépôt et de remodelage de la matrice (Wolters *et al.*, 2013). Une étude microdamier récente, à partir d'une matrice décellularisée issue de poumons atteints de FPI, a mise en évidence plus de 40 protéines sur ou sous-exprimées (Booth *et al.*, 2012). Beaucoup de ces protéines sont connues pour activer des voies de signalisation dans les cellules qui les ont sécrétées (Wolters *et al.*, 2013). De plus, la matrice extracellulaire est nettement plus rigide lors de la FPI comparée à des poumons contrôles (Booth *et al.*, 2012). Il semblerait que lorsque les fibroblastes sont cultivés sur une matrice rigide, ils adoptent spontanément un phénotype de myofibroblastes activés (Liu *et al.*, 2010b; Booth *et al.*, 2012; Marinkovic *et al.*, 2013), incluant une expression augmentée de l' $\alpha$ SMA et diminuée pour la COX-2 ; caractéristique des fibroblastes de la FPI.

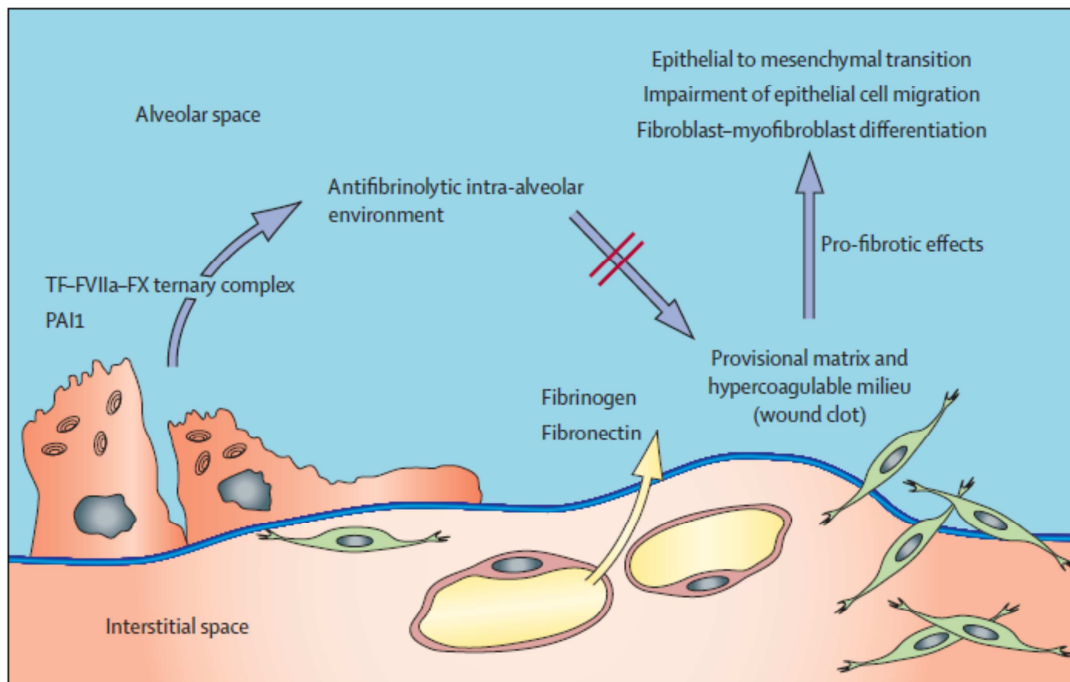
Il est donc suspecté que des changements dans la composition ou la rigidité de la matrice extracellulaire contribuent à la propagation de la fibrose pulmonaire (Wolters *et al.*, 2013). Il reste toutefois à déterminer si ces changements dans les protéines de la matrice extracellulaire sont en relation avec les cellules épithéliales et s'ils sont suffisants pour expliquer le phénotype des fibroblastes de la FPI.

#### 1.9.2.7 Activation de la cascade de coagulation

Un autre processus important impliqué dans la pathogénie de la FPI est l'activation de la cascade de la coagulation, qui a différents effets profibrotiques (Selman et Pardo, 2006; Borensztajn *et al.*, 2008). Suite à une lésion pulmonaire, il y a une fuite capillaire de protéines, dont du fibrinogène et de la fibronectine, vers l'espace interstitiel et alvéolaire, avec formation d'une matrice provisoire (caillot) (King *et al.*, 2011). Dans la FPI, le complexe facteur tissulaire- facteur VIIa et facteur X s'assemble sur l'épithélium alvéolaire, permettant l'activation du facteur X. Le facteur X activé convertit la prothrombine en thrombine, qui à son tour, clive le fibrinogène en fibrine. De plus, les cellules épithéliales sécrètent l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (PAI-1), qui contribue à la création d'un microenvironnement antifibrinolytique et hypercoagulable ; empêchant ainsi la dégradation de la matrice provisoire. La persistance du caillot et les protéases activées de la cascade de coagulation stimulent plusieurs mécanismes impliqués dans le remodelage fibrotique des tissus. Par exemple, la matrice provisoire, formée de fibrine et de fibronectine, peut stimuler la TEM, même en l'absence de TGFB1 (Kim *et al.*, 2006c). De plus, la thrombine et le facteur X activé induisent la différenciation des fibroblastes pulmonaires en myofibroblastes par l'intermédiaire du récepteur PAR1 (proteinase-activated receptor 1) (Bogatkevich *et al.*, 2001; Scotton *et al.*, 2009). Ces résultats indiquent qu'un signal procoagulant est activé dans la FPI. Les CEA empêchent ensuite la fibrinolyse, fournissant ainsi une matrice provisoire, à partir de laquelle le processus de fibrose se développe (King *et al.*, 2011).



Figure 8 : Rôles profibrotiques de l'activation de la cascade de coagulation, d'après (King *et al.*, 2011)



*FVIIa: factor VIIa, FX: factor X; PAI: plasminogen activator inhibitor; TF: tissue factor*

#### 1.9.2.8 Angiogenèse et remodelage vasculaire

La néovascularisation est un processus fondamental dans la réparation tissulaire et est modulée par l'équilibre entre différents facteurs, principalement des chimiokines, qui stimulent ou inhibent l'angiogenèse (Strieter *et al.*, 2007). L'angiogenèse est accrue dans les modèles expérimentaux de fibrose pulmonaire, son rôle est toutefois plus incertain dans la FPI. Un remodelage vasculaire aberrant existe dans les poumons avec FPI mais le tissu fibrotique comporte peu de vaisseaux sanguins, alors les tissus adjacents, non fibrosés, sont hautement vascularisés (Ebina *et al.*, 2004). Il n'y a quasiment pas de vaisseaux au sein de foyers fibroblastiques, suggérant que le processus de fibrose dans la FPI ne nécessite pas de néovascularisation (Cosgrove *et al.*, 2004).

#### 1.9.2.9 Réactivation aberrante des voies du développement

Les voies du développement, intervenant lors de l'embryogénèse, peuvent être activées transitoirement lors de la cicatrisation pulmonaire mais sont normalement inactives dans le poumon sain. Au contraire, une activation prolongée est souvent un marqueur d'une transformation maligne (Selman *et al.*, 2008). Une réactivation de ces voies a été suspectée dans la FPI (Selman *et al.*, 2008). La TEM est en particulier un processus clé de l'embryogénèse (Moustakas et Heldin, 2007). Son existence au sein de poumons adultes lors de FPI représente un changement majeur dans le phénotype cellulaire qui nécessite une intervention de ces programmes embryonnaires (Selman *et al.*, 2008). Une analyse des profils d'expression génique a également mis en évidence que les poumons issus de patients avec FPI étaient riches en gènes normalement associés avec le développement pulmonaire (Studer et Kaminski, 2007). Cette dérégulation de certaines voies de l'embryogénèse pourrait ainsi expliquer au moins en partie le comportement anormal des CEA et des fibroblastes lors de FPI (Selman *et al.*, 2008; King *et al.*, 2011).

#### 1.9.2.10 Epigénétique

L'influence de l'épigénétique sur l'expression génique a récemment été reconnue. Par ce mécanisme, les stress, entre autre environnementaux, peuvent induire des changements dans le phénotype cellulaire, tissulaire et même à l'échelle de l'individu (Yang et Schwartz, 2011; Yang, 2012). Les phénomènes épigénétiques peuvent être définis comme des modifications de l'expression des gènes sans modification de la séquence nucléotidique. Ils incluent l'altération de la méthylation de l'ADN, les modifications des histones ou l'expression des microARN (Yang et Schwartz, 2011; Rabinovich *et al.*, 2012b). Les microARN sont des ARN non codants de 21 à 22 nucléotides qui répriment la traduction et/ou induisent la dégradation de l'ARNm des gènes cibles en se liant à l'extrémité 3'-UTR. Des facteurs environnementaux comme la fumée de tabac (Launay *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010a) ou la pollution, ou l'âge peuvent entraîner des changements épigénétiques de l'ADN. Quelques études récentes ont démontré que les microARN jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie de la matrice extracellulaire. Une expression aberrante des microARN a été reliée au processus de fibrose dans différents organes, dont la FPI (Liu *et al.*, 2010c; Pandit *et al.*, 2010).

Un autre mécanisme intervenant dans l'épigénétique a été étudié dans la FPI. Une analyse de la méthylation à l'échelle du génome a ainsi mis en évidence un grand nombre de gènes différemment méthylés dans les poumons avec FPI (Rabinovich *et al.*, 2012a; Sanders *et al.*, 2012). Ces changements de méthylation de l'ADN étaient en accord avec l'expression en ARNm pour de nombreux gènes, dont certains avec un rôle connu dans la fibrose, comme la régulation de l'apoptose ou les processus de synthèse cellulaire (Cisneros *et al.*, 2012; Rabinovich *et al.*, 2012a; Sanders *et al.*, 2012).

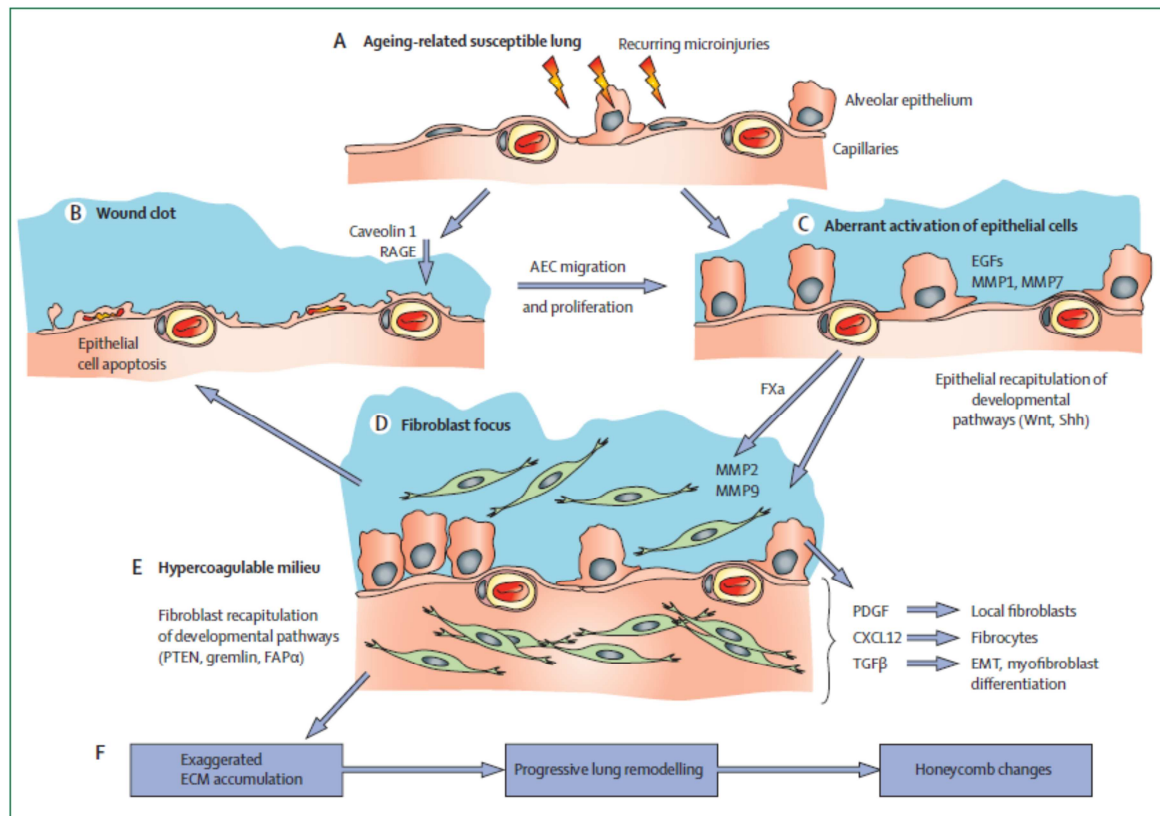
Ces résultats suggèrent que la méthylation de l'ADN et/ou d'autres changements épigénétiques pourraient être importants dans la pathogénie de la FPI.

#### 1.9.3.11 Conclusion

Parmi les processus évoqués, nombreux ont été reliés au vieillissement. Ainsi, le raccourcissement des télomères s'aggravent progressivement avec chaque division cellulaire et donc avec l'âge (Armanios *et al.*, 2007). Le vieillissement a également été associé avec une augmentation du stress oxydatif (Selman *et al.*, 2010) et une dysrégulation de l'expression des microARN (Lanceta *et al.*, 2010). Au-delà de 65 ans, on observe également une perte progressive de la méthylation de l'ADN, qui semble proportionnelle à l'espérance de vie (Christensen *et al.*, 2009).

De très nombreuses voies ont ainsi été étudiées dans la FPI et indiquent qu'il s'agit d'une maladie multifactorielle, très complexe, avec une dysrégulation de nombreux mécanismes intervenant normalement dans l'homéostasie tissulaire. De très nombreuses cytokines, protéases etc... semblent impliquées dans la pathogénie de la FPI en participant à un ou plusieurs de ces mécanismes, en particulier le TGF $\beta$ 1 considéré actuellement comme une molécule clé de la pathogénie de la FPI.

Figure 9 : Pathogénie de la fibrose pulmonaire idiopathique : mécanismes potentiels, d'après (King *et al.*, 2011)



**Figure 4: Proposed mechanisms involved in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis**

(A) In the initial step, ageing-related susceptible lung (eg, by genetic or epigenetic changes, abnormal telomere shortening, poor regenerative capacity) is targeted by repetitive microinjuries (ie, viruses, cigarette smoke, microaspiration) that provokes type I and type II epithelial cell death. (B) After microinjuries and epithelial cell apoptosis, increased vascular permeability to proteins (eg, fibrinogen, fibronectin) causes the formation of a provisional matrix (wound dot). (C) This pathological process is followed by bronchiolar and AEC migration and proliferation in a frustrated effort of lung repair (ie, aberrant activation of epithelial cells). Several epidermal growth factors (eg, hepatocyte growth factor and hepatoma-derived growth factor) participate in the proliferative response. Furthermore, MMP1 and MMP7 contribute to the epithelial cell migration. In this microenvironment, epithelial cells are abnormally activated (epithelial recapitulation of developmental pathways) and produce diverse growth factors and chemokines, inducing the migration of resident fibroblasts and bone marrow-derived progenitors of fibroblasts (fibrocytes) to the sites where the microinjuries are occurring. Additionally, they secrete and activate the latent TGFβ1, which promotes EMT and the differentiation of fibroblasts to myofibroblasts. (D) Together, and in unknown proportions, these cells (fibrocytes, local mesenchymal cells, and myofibroblasts derived from EMT) participate in the formation of the fibroblast and myofibroblast focus. Matrix metalloproteinases, such as MMP2 and MMP9, contribute to the activation of TGFβ and to the disruption of the basement membranes. (E) In the alveolar epithelium, the TF-FVIIa-FX complex is assembled, with the subsequent activation of FX to FXa. This procoagulation state provokes a hypercoagulable milieu that avoids the degradation of the provisional matrix and enhances a fibrogenic milieu. Fibroblasts and myofibroblasts are also indicative of recapitulation of developmental pathways. (F) In the foci, myofibroblasts secrete excessive amounts of extracellular matrix proteins, mainly fibrillar collagens, and can also provoke additional epithelial apoptosis through hydrogen peroxide and other molecules. In this progressive abnormal lung remodelling, several neighbouring scars, together with the disproportionate secretion of some enzymes (eg, MMP1) can provoke the formation of the honeycomb cysts through mechanical forces. AEC=alveolar epithelial cells. CXCL12=CXC chemokine ligand 12. ECM=extracellular matrix. EGF=epithelial growth factor. EMT=epithelial-mesenchymal transition. FVIIa=Factor VIIa. FX=Factor X. FXa=Factor X activated. FAPα=fibroblast activation protein α. MMP=matrix metalloproteinase. PDGF=platelet-derived growth factor. PTEN=phosphatase and tensin homologue. RAGE=receptor for advanced glycation end products. Shh=sonic hedgehog. TF=tissue factor. TGFβ=transforming growth factor β.

### 1.9.3 Rôle central du transforming growth factor beta 1 (TGFB1)

La plupart des mécanismes impliqués dans la pathogénie de la FPI sont complexes et ont vraisemblablement de multiples interactions entre eux, et qu'il n'est pas facile d'identifier. Une molécule semble commune à ces voies et est considérée comme centrale : le TGFB1 (Bartram et Speer, 2004; Sheppard, 2006; Araya et Nishimura, 2010; Fernandez et Eickelberg, 2012; Tatler et Jenkins, 2012).

#### 1.9.3.1 Généralités

Le TGFB appartient à une famille de facteurs de croissance et de différenciation, incluant entre autres les « bone morphogenetic proteins », les activines, les inhibines et les protéines Nodal

(Massague et Wotton, 2000). Les membres de cette famille de cytokines influencent un grand nombre de processus cellulaires normaux, tels que la sécrétion de la matrice extracellulaire ; l'adhésion, la prolifération et l'apoptose cellulaire et ont donc un rôle prépondérant dans la morphogénèse des tissus et le développement des organes. Lors de lésions tissulaires, les membres de la famille TGF $\beta$  jouent également un rôle important à la fois en cloisonnant les espaces lésés et en régulant de manière négative l'inflammation innée et acquise (Sheppard, 2006). Le TGF $\beta$ , en particulier, est une cytokine pléiotrope qui est exprimée de manière ubiquitaire par toutes les cellules et tissus dans l'organisme (Tatler et Jenkins, 2012). Il a été démontré que les isoformes du TGF $\beta$  sont essentielles pour un développement embryonnaire et fœtal normal et qu'elles jouent un rôle dans la fonction et l'homéostasie des organes (Shull *et al.*, 1992; Kulkarni *et al.*, 1993; Sanford *et al.*, 1997). Chez les mammifères, il existe trois isoformes de TGF $\beta$  : TGF $\beta$ 1, -2 et -3 qui sont chacune issues d'un gène différent. Leur structure est comparable avec 60 à 80% d'homologie dans leur séquence (Grande, 1997). In vitro, ces trois isoformes se lient aux mêmes récepteurs, activent des voies canoniques de signalisation similaires et entraînent des effets très proches sur le comportement cellulaire. Par contre, les souris knockout pour chaque gène présentent des phénotypes très différents (Kulkarni *et al.*, 1993; Kaartinen *et al.*, 1995; Sanford *et al.*, 1997). Ainsi même si la plupart de leurs activités biologiques sont identiques ou diffèrent seulement en intensité, des fonctions distinctes ont été découvertes (Grande, 1997).

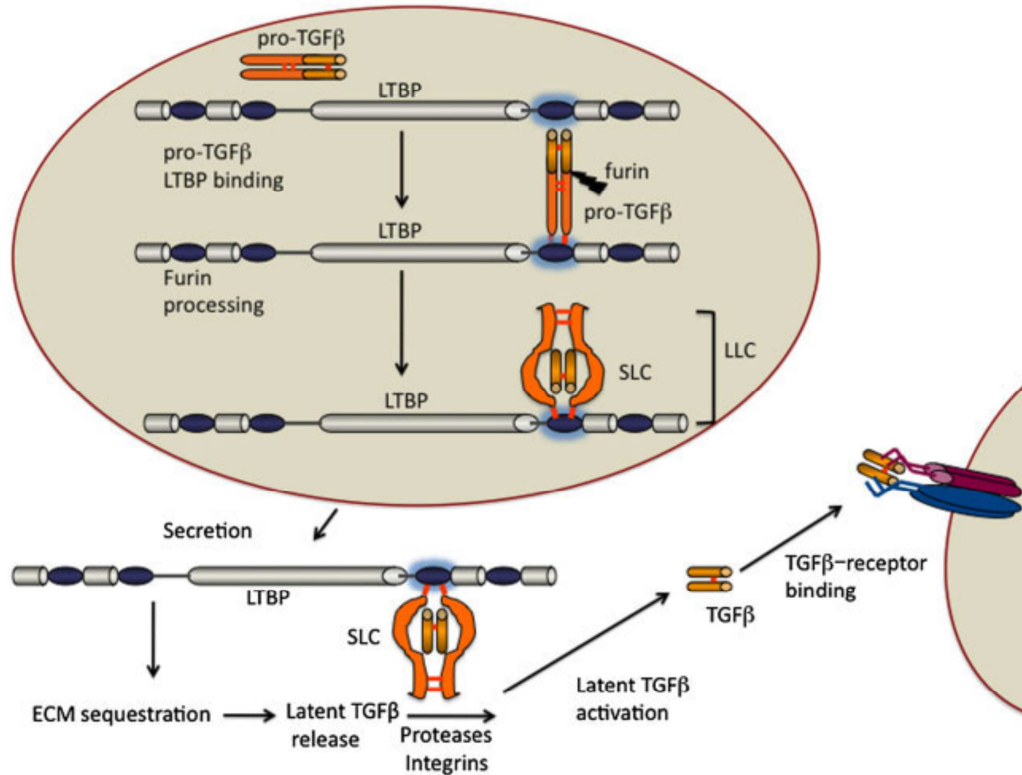
Une quantité insuffisante de TGF $\beta$  peut conduire à des désordres immunologiques et inflammatoires, des anomalies du développement, un défaut de cicatrisation et une tumorigénèse exacerbée (Kulkarni *et al.*, 1993; Boivin *et al.*, 1995). A l'inverse, une activité excessive du TGF $\beta$  peut entraîner une cicatrisation exubérante, le développement d'affections fibrotiques dans différents organes et semble pouvoir faciliter la progression des tumeurs en phase avancée (Roberts *et al.*, 1986; Border et Ruoslahti, 1992; Shah *et al.*, 1994; Sheppard, 2006). La localisation et la concentration en TGF $\beta$  doivent donc être finement régulées. Les mécanismes potentiels de régulation du TGF $\beta$  incluent la régulation de la transcription du gène, de la stabilité de l'ARNm correspondant, de la traduction de cet ARNm, du stockage du TGF $\beta$  sous forme latente, de l'activation des complexes latents, de l'inactivation de la forme active du TGF $\beta$  par des protéines circulantes et des macromolécules de la matrice extracellulaire, de l'expression des récepteurs et de la signalisation intracellulaire (Grande, 1997). La régulation de la production et de la sécrétion des protéines TGF $\beta$  est un mécanisme trop lent pour s'adapter rapidement aux changements du microenvironnement et ne permet pas un contrôle précis de la localisation cellulaire (Sheppard, 2006). Comme de nombreuses cytokines et facteurs de croissance, les isoformes du TGF $\beta$  sont donc produites en excès dans la plupart des organes et sont stockées sous forme inactive (Munger *et al.*, 1997; Sheppard, 2006). L'activation des formes latentes constituent alors un mécanisme important de régulation de la fonction du TGF $\beta$ .

#### 1.9.3.1.1 Synthèse et stockage

La transcription des gènes des isoformes du TGF $\beta$  est activée par l'interaction entre le promoteur et différents facteurs de transcription (Bartram et Speer, 2004; Sheppard, 2006). A partir de l'ARNm obtenu, chaque isoforme est synthétisée sous la forme d'une grande molécule, contenant un petit peptide signal et une pro-protéine. Ce pré-pro-peptide est clivé dans le réticulum endoplasmique par l'endoprotéase furine et forme un complexe contenant la forme active de la cytokine en région carboxyterminale (112 acides aminés pour le TGF $\beta$ 1 mature) et un inhibiteur endogène de l'activité du TGF $\beta$  appelé le « latency associated peptide » (LAP). La transformation et le clivage de ce propeptide conduit à la formation d'homodimères disulfides LAP et d'homodimères disulfides TGF $\beta$ . Ces homodimères restent liés de façon non-covalente et forment le petit complexe latent TGF $\beta$  (« small latent complex » SLC). Ce SLC ne peut pas se fixer aux

récepteurs et constitue une forme inactive. Avant sécrétion dans l'espace extracellulaire, la grande majorité des SLC sont associés à une protéine de liaison (les « latent TGF binding proteins » LTBP) par ponts disulfides pour former un grand complexe latent (« large latent complex » LLC).

Figure 10 : Formation, sécrétion et activation des complexes latents du « transforming growth factor beta 1 », d'après (Todorovic et Rifkin, 2012)



ECM: extracellular matrix; LLC: large latent complexe; LTBP: latent TGFβ binding protein; SLC: small latent complex; TGFβ: transforming growth factor beta

Les LTBP sont des glycoprotéines extracellulaires de grande taille, de structure proche des fibrillines (Ramirez et Pereira, 1999; Todorovic et Rifkin, 2012). Ces protéines contiennent des domaines spécifiques de 8 résidus cystéines (Annes *et al.*, 2003) ; une partie des domaines cystéines permettent la formation de ponts disulfures avec le LAP (Saharinen et Keski-Oja, 2000), tandis que les autres associent les LTBP à des composants de la matrice extracellulaire dont la fibrilline-1 et la fibronectine (Unsold *et al.*, 2001; Annes *et al.*, 2003; Hyytiainen *et al.*, 2004; Koli *et al.*, 2005). Toutes les isoformes à l'exception de la LTBP2 (LTBP1, LTBP3 et LTBP4) sont capables de se lier au LAP et former un LLC (Saharinen et Keski-Oja, 2000). Par son association avec une LTBP, le TGFβ est ainsi stocké sous forme latente et inactive dans la matrice extracellulaire dans la plupart des organes (Sheppard, 2006). Les LTBP n'ont toutefois pas uniquement un rôle de stockage du TGFβ (Annes *et al.*, 2003; Todorovic et Rifkin, 2012), elles facilitent également sa sécrétion (Miyazono *et al.*, 1991; Rifkin, 2005) et son activation (Rifkin, 2005; Yoshinaga *et al.*, 2008). L'utilisation d'un anticorps dirigé contre la LTBP1 empêche l'activation du TGFβ latent (Flaumenhaft *et al.*, 1993; Dallas *et al.*, 1995; Nakajima *et al.*, 1997; Gualandris *et al.*, 2000) et les souris knock-out pour LTBP1 (Drews *et al.*, 2008), LTBP3 (Dabovic *et al.*, 2002) ou LTBP4 (Sterner-Kock *et al.*, 2002) présentent un phénotype compatible avec une altération de

l'activité du TGF $\beta$ . Les fibroblastes des souris knock-out pour la LTBP4 synthétisent par ailleurs une quantité normale de TGF $\beta$ 1 latent mais une quantité réduite de TGF $\beta$ 1 sous forme active (Koli *et al.*, 2004). Il a été suggéré récemment que chaque isoforme de LTBP ait des fonctions spécifiques (Klopfleisch *et al.*, 2010; Vehvilainen *et al.*, 2011); néanmoins, le rôle de chaque LTBP est encore mal établi. Il est possible que chaque LTBP stocke différemment les LLC et qu'elle s'associe préférentiellement à une isoforme du TGF $\beta$  (Annes *et al.*, 2003). Par exemple, il a été rapporté que les domaines cystéines de la LTBP4 ne se lient qu'avec le TGF $\beta$ 1 et ce avec une faible affinité (Saharinen et Keski-Oja, 2000; Todorovic et Rifkin, 2012). Les LTBP font partie de la matrice extracellulaire et interagissent avec certains de ses composants (cytokines, fibres élastiques) (Todorovic et Rifkin, 2012). Une proportion non négligeable de LTBP1 et LTBP4 sont également sécrétées seules, sans association avec un SLC (Todorovic et Rifkin, 2012). Leurs rôles ne sont donc probablement pas limités à la signalisation du TGF $\beta$ .

#### 1.9.3.1.2 Activation

L'activité du TGF $\beta$  est principalement régulée par la conversion des formes latentes en TGF $\beta$  actif (Annes *et al.*, 2003). A cause de son rôle central dans de nombreux mécanismes cellulaires et de l'importance de la régulation de ce signal, les voies d'activation du TGF $\beta$  ont été largement étudiées. In vitro, les complexes latents peuvent être activés par un très grand nombre de stimuli dont une dénaturation protéique par la température ou le pH ou l'exposition à des oxydants ou des radiations ionisantes (Munger *et al.*, 1997). De plus, le clivage du LAP par de nombreuses protéases (dont MMP2 et MMP9 (Dancer *et al.*, 2011)) permet également la libération de TGF $\beta$  actif. Toutefois, le rôle joué par ces différents mécanismes in vivo reste controversé (Sheppard, 2006). Deux mécanismes ont démontré leur importance dans l'activation du TGF $\beta$  in vivo : l'interaction avec la thrombospondine-1 (THBS1) (Crawford *et al.*, 1998) et l'activation par les intégrines de la famille  $\alpha\beta$  (en particulier  $\alpha\beta$ 6 (Munger *et al.*, 1999) et  $\alpha\beta$ 8 (Travis *et al.*, 2007)). Toutefois, les souris transgéniques knock-out pour la THBS1 et l' $\alpha\beta$ 6 (Ludlow *et al.*, 2005) arrivent à terme et présentent un phénotype nettement moins altéré que les souris knock-out pour le TGF $\beta$ 1, 2 ou 3 ; indiquant que d'autres mécanismes d'activation du TGF $\beta$  doivent intervenir in vivo. La plupart des mécanismes d'activation décrits sont ubiquitaires sauf l'activation par l'intégrine  $\alpha\beta$ 6 qui est strictement limitée à l'épithélium (Tatler et Jenkins, 2012).

##### 1.9.3.1.2.1 Activation par les intégrines

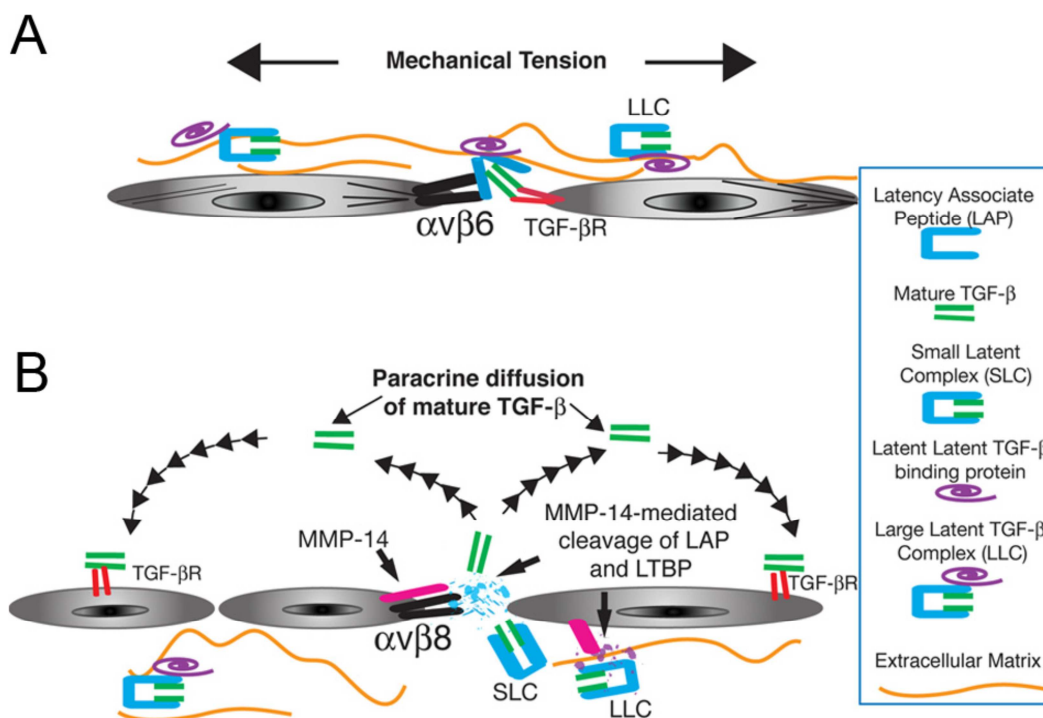
Les intégrines sont des protéines hétérodimériques transmembranaires capables de transmettre un signal dans les deux directions (Tatler et Jenkins, 2012). Chez les mammifères, le génome code 26 sous-unités pour les intégrines dont 18 sous-unités  $\alpha$  et 8 sous-unités  $\beta$  qui peuvent s'assembler pour former 24 combinaisons différentes  $\alpha\beta$ . Huit intégrines, dont les 5 contenant la sous-unité  $\alpha$ v, se lient à leur ligand par l'intermédiaire d'une séquence arginine- glycine- aspartate (motif « RGD »). Ce motif RGD est retrouvé dans le LAP du TGF $\beta$ 1 et du TGF $\beta$ 3, ce qui permet l'activation de ces 2 isoformes de TGF $\beta$  par au moins 4 intégrines avec la sous-unité  $\alpha$ v ( $\alpha\beta$ 3,  $\alpha\beta$ 5,  $\alpha\beta$ 6 et  $\alpha\beta$ 8) in vitro (Goodwin et Jenkins, 2009). In vivo, une activation par ces intégrines a été démontrée pour  $\alpha\beta$ 5,  $\alpha\beta$ 6 et  $\alpha\beta$ 8 (Munger *et al.*, 1999; Travis *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007b). Le LAP du TGF $\beta$ 2 ne contient pas de motif RGD et aucune activation par l'intermédiaire d'une intégrine n'a été décrite pour cette isoforme.

L'intégrine  $\alpha\beta$ 6 est strictement limitée à l'épithélium (Breuss *et al.*, 1993; Prieto *et al.*, 1993; Weinacker *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1998a; Goodwin et Jenkins, 2009) et a été la première intégrine impliquée dans l'activation du TGF $\beta$ 1 (Munger *et al.*, 1999). L'intégrine  $\alpha\beta$ 6 se lie directement avec le LAP des complexes latents des TGF $\beta$ 1 et TGF $\beta$ 3 (Annes *et al.*, 2002) et induit un changement de conformation de ces complexes qui active le TGF $\beta$  sans le libérer. L'activation par l'intégrine  $\alpha\beta$ 6 semble donc dépendante d'un contact intercellulaire direct et ne libère aucun

peptide mature de TGFB (Munger *et al.*, 1999). Un tel mécanisme est particulièrement important au niveau de l'espace alvéolaire où toutes les cellules d'intérêt sont en contact direct, notamment à travers une membrane basale discontinue au niveau de l'épithélium (Sheppard, 2006). L'activation par l' $\alpha\text{v}\beta\text{6}$  dépend également de l'incorporation du TGFB1 dans la matrice extracellulaire sous forme de LLC et donc la présence de LTBP1 (Annes *et al.*, 2004; Wipff *et al.*, 2007) et de fibronectine ; la fibronectine fixant le LTBP1 et facilitant ainsi l'action de l' $\alpha\text{v}\beta\text{6}$  (Fontana *et al.*, 2005). Cette activation par l'intégrine  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$  dépend également de la transduction de forces de traction pour induire un changement de la conformation du LLC (Keski-Oja *et al.*, 2004; Wipff et Hinz, 2008). Le même type de mécanisme (nécessité d'une LTBP et d'une traction mécanique) semble exister pour les intégrines  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  et  $\alpha\text{v}\beta\text{5}$  (Goodwin et Jenkins, 2009).

L'intégrine  $\alpha\text{v}\beta\text{8}$  est exprimée par les cellules épithéliales, neuronales, immunitaires et mésenchymateuses (Nishimura *et al.*, 1994; Araya *et al.*, 2006; Araya *et al.*, 2007). Le mécanisme d'activation par cette intégrine est complètement différent et indépendant des forces de tension. Il semble que cette intégrine présente les complexes latents à la protéase transmembranaire MMP14, qui clive le LAP et libère du TGFB actif (Mu *et al.*, 2002). Ce mécanisme ne dépend donc pas d'un contact intercellulaire et produit du TGF libre et diffusible, qui peut donc agir de manière paracrine, sur des cibles cellulaires situées à distance de la cellule exprimant l' $\alpha\text{v}\beta\text{8}$ .

Figure 11 : Activation du « transforming growth factor beta 1 » par les intégrines  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$  (A) et  $\alpha\text{v}\beta\text{8}$  (B), d'après (Nishimura, 2009)



MMP: matrix metalloproteinase ; TGF- $\beta$ R : transforming growth factor receptor

#### 1.9.3.1.2.2 Activation par la thrombospondine 1 (THBS1)

La thrombospondine est une protéine multifonctionnelle qui existe à la fois en tant que protéine sécrétée et composant insoluble de la matrice extracellulaire (Murphy-Ullrich et Poczatek, 2000). La THBS1 est la mieux caractérisée des 5 isoformes de la thrombospondine et la seule capable d'activer le TGFB1 (Crawford *et al.*, 1998; Murphy-Ullrich et Poczatek, 2000). Ce mécanisme d'activation implique une interaction directe entre la THBS1 et le LAP induisant une

modification de la conformation du LAP qui rend le TGF $\beta$  accessible pour ses récepteurs (Schultz-Cherry et Murphy-Ullrich, 1993; Schultz-Cherry *et al.*, 1994a; Schultz-Cherry *et al.*, 1994b; Schultz-Cherry *et al.*, 1995; Ribeiro *et al.*, 1999). Les souris knock-out pour la THBS1 présentent un phénotype en partie comparable à celui des souris knock-out pour le TGF $\beta$  (Crawford *et al.*, 1998), confirmant le rôle *in vivo* de la THBS1. La THBS1 est notamment impliquée dans la réparation tissulaire de par son rôle dans la modulation de l'adhésion cellulaire, la stimulation de l'angiogenèse et la reconstruction de la matrice (Frazier, 1991). Elle est également exprimée dans différents tissus au cours du développement embryonnaire (Majack *et al.*, 1987; Iruela-Arispe *et al.*, 1993).

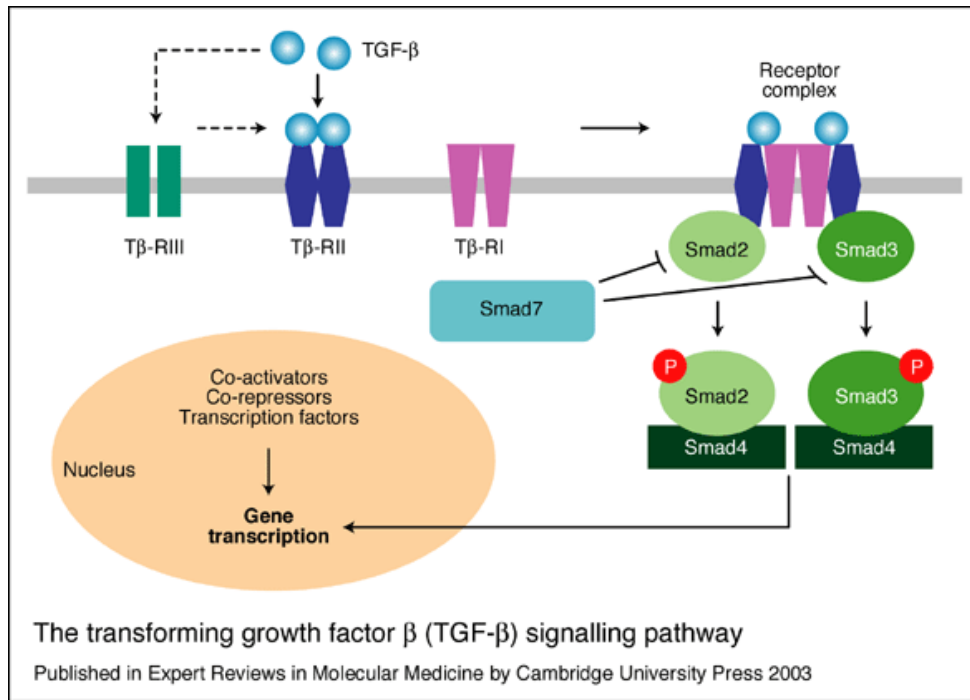
#### 1.9.3.1.3 Signalisation

Une fois activé, le TGF $\beta$  agit par l'intermédiaire des deux récepteurs sérine/ thréonine kinase qui agissent de manière séquentielle. La forme active du TGF $\beta$  se lie à un récepteur spécifique de type II (TGF $\beta$ RII), ce qui est suivi par le recrutement d'un récepteur de type I (TGF $\beta$ RI) pour former un complexe tétramérique (Massaous et Hata, 1997; Ring et Cho, 1999). Chaque membre de la famille TGF $\beta$  a ses propres récepteurs. Parmi les sept récepteurs de type I décrits, également nommés ALK (pour « activin receptor-like kinase »), celui de type 5 (ALK5) permet la signalisation du TGF $\beta$  (Huang et Chen, 2012). Une étape importante de l'activation de ces récepteurs est la phosphorylation du complexe tétramérique. Ces sites de phosphorylation sur TGF $\beta$ RII permettent par ailleurs de moduler le signal, certains étant nécessaires pour l'activation du récepteur, d'autres inhibant le signal (Heldin *et al.*, 1997). D'autres récepteurs ont également été décrits (dit de type III), comme le betaglycan ou l'endogline (Massague, 1998). Ils pourraient avoir un rôle de facilitateur de la signalisation ou accroître la réponse cellulaire en empêchant la dégradation du TGF $\beta$  actif (Massague et Chen, 2000).

Différents mécanismes de signalisation intracellulaire ont été décrits pour le TGF $\beta$ , le mieux étudié étant la voie canonique des protéines Smad (Heldin *et al.*, 1997; Massague, 1998; Massague et Wotton, 2000). L'activation du TGF $\beta$ RI entraîne la phosphorylation de Smad 2 et Smad 3, qui forment ensuite un complexe hétéromérique avec Smad 4. Ce complexe migre vers le noyau où, seul ou en association avec un co-facteur de liaison à l'ADN, il active des gènes cibles en se liant à des éléments spécifiques des promoteurs (Heldin *et al.*, 1997; Massague et Wotton, 2000). D'autres protéines Smad, de type inhibitrices, sont décrites : Smad 6 et Smad7. Smad 7 fonctionne comme un inhibiteur de la signalisation du TGF $\beta$  en se liant au TGF $\beta$ RI et en interférant avec la phosphorylation de Smad 2 et Smad 3 (Heldin *et al.*, 1997; Imamura *et al.*, 1997; Nakao *et al.*, 1997; Massague, 1998). L'expression de cette Smad antagoniste Smad 7 étant induite par le TGF $\beta$  (Nakao *et al.*, 1997), il pourrait s'agir d'un mécanisme de rétrocontrôle négatif dans la transduction du signal (Bartram et Speer, 2004). Selon le contexte, la signalisation intracellulaire du TGF $\beta$  peut également s'effectuer par l'intermédiaire des voies MAPK (« mitogen-activating protein kinases » dont ERK, p38 et JNK), de la kinase phosphatidylinositol 3 (PI3K/Akt) et des GTPases (Derynck et Zhang, 2003; Moustakas et Heldin, 2005; Zhang, 2009).

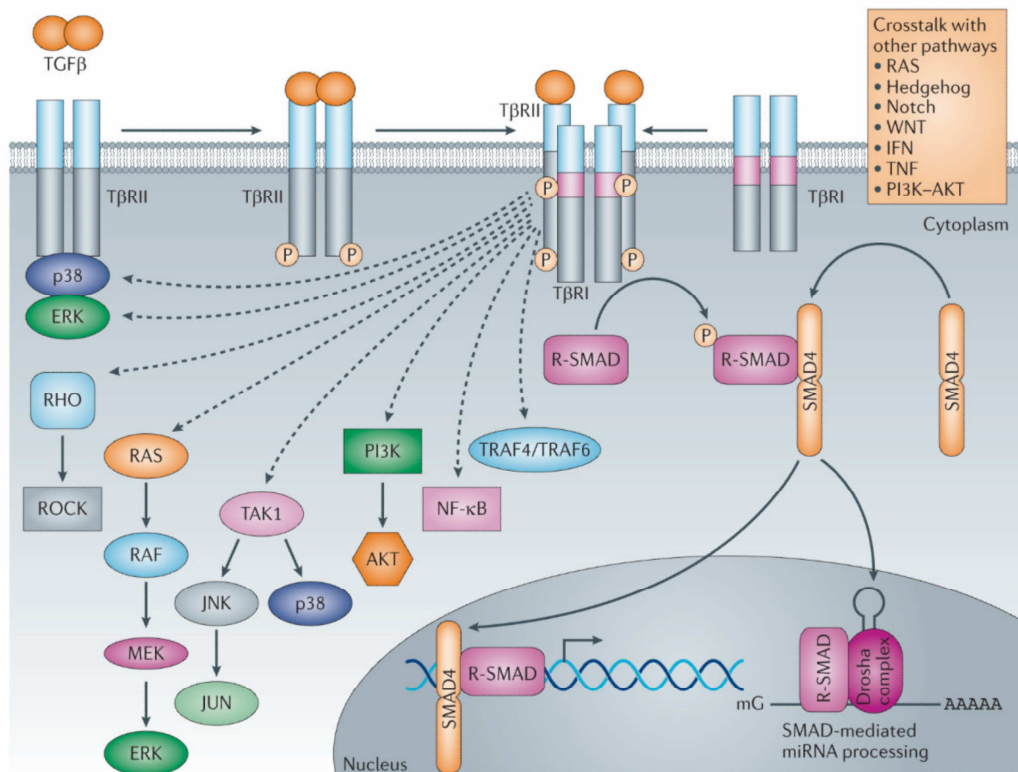


Figure 12 : Représentation schématique de la signalisation du « transforming growth factor beta » par la voie des protéines Smad



*P*: phosphorylated ; *T $\beta$ -RI* : TGF- $\beta$  type I receptor; *T $\beta$ -RII* : TGF- $\beta$  type II receptor; *T $\beta$ -RIII* : TGF- $\beta$  type III receptor; TGF- $\beta$ : transforming growth factor beta

Figure 13 : Représentation schématique de la signalisation du « transforming growth factor beta » par les voies non-canoniques et leur relation avec d'autres voies de signalisation, d'après (Akhurst et Hata, 2012)



### 1.9.3.2 Rôles physiologiques du TGFB au niveau pulmonaire

L'expression et le rôle du TGFB durant l'embryogénèse ont été étudiés en détail, les trois isoformes étant exprimées à des taux élevés durant le développement pulmonaire normal (Bartram et Speer, 2004). De faibles quantités de TGFB sous forme d'ARNm et de protéine ainsi que de TGFBRI et TGFBRII sont encore présentes dans le poumon après la fin du développement, le TGFB participant probablement au maintien de l'homéostasie (Bartram et Speer, 2004). Chez la souris, Coker (Coker *et al.*, 1996) a détecté de l'ARNm du TGFB1 au niveau de l'épithélium bronchiolaire, des cellules de Clara, de l'endothélium vasculaire, des cellules mésenchymateuses et alvéolaires (incluant les macrophages). Dans cette étude, l'ARNm du TGFB3 était distribué de manière similaire excepté qu'il était absent au niveau endothélial. A l'inverse, Pelton (Pelton *et al.*, 1991) a retrouvé de l'ARNm et des protéines pour les 3 isoformes du TGFB uniquement au niveau des voies respiratoires supérieures, et non pas au niveau alvéolaire. Dans cette étude, l'expression des protéines TGFB était confinée à l'épithélium bronchiolaire alors que de l'ARNm a été identifié dans les cellules musculaires lisses et les fibroblastes du tissu conjonctif à proximité de l'épithélium. De plus, une expression élevée des trois isoformes sous forme d'ARNm était notée dans les cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins de grande taille. Chez l'homme, les cellules épithéliales bronchiques contiennent les quantités les plus élevées de protéine TGFB, le signal étant toujours plus intense au pôle apical (Magnan *et al.*, 1994). Les isoformes du TGFB ainsi que leurs récepteurs ont également été identifiés dans les macrophages alvéolaires (Magnan *et al.*, 1994; Coker *et al.*, 1996; Khalil *et al.*, 1996; Jagirdar *et al.*, 1997; De Boer *et al.*, 1998; Khalil *et al.*, 2001b), les cellules mésenchymateuses (Coker *et al.*, 1996), les cellules musculaires lisses bronchiques et vasculaires (Magnan *et al.*, 1994; Khalil *et al.*, 1996; Jagirdar *et al.*, 1997; De Boer *et al.*, 1998) et les glandes bronchiques (Jagirdar *et al.*, 1997). Les cellules épithéliales contenaient également du TGFB2 et 3 (Khalil *et al.*, 1996). Alors que certaines études (Coker *et al.*, 1996; Jagirdar *et al.*, 1997; De Boer *et al.*, 1998) détectaient également du TGFB1 au niveau de l'épithélium normal, d'autres n'ont reporté la présence de TGFB1 au niveau épithélial qu'uniquement en cas de fibrose (Khalil *et al.*, 1996).

### 1.9.3.3 Rôles du TGFB1 dans la pathogénie de la FPI

Le TGFB est une des cytokines profibrotiques les plus étudiées (Bartram et Speer, 2004; Sheppard, 2006; Fernandez et Eickelberg, 2012; Tatler et Jenkins, 2012) et a été largement impliqué dans la pathogénie de la FPI mais également, entre autres, dans les lésions pulmonaires aiguës, la mucoviscidose, la bronchite chronique ou l'asthme (Bartram et Speer, 2004; Sheppard, 2006). La plupart des publications sur les pathologies respiratoires chez l'homme se sont concentrées sur le TGFB1, qui est l'isoforme impliquée dans la fibrose pulmonaire. En effet, même si les 3 isoformes sont présentes dans le poumon normal et que l'expression de chacune d'elles est augmentée dans le modèle de fibrose induite par l'administration de bléomycine (Phan *et al.*, 1991; Santana *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1995; Kumar *et al.*, 1996; Coker *et al.*, 1997; Maeda *et al.*, 1999), les isoformes TGFB2 et 3 ne semblent pas ou peu impliquées dans la pathogénie de la FPI chez l'homme (Khalil *et al.*, 1996; Coker *et al.*, 2001). Chez les patients avec FPI, des taux plus élevés de TGFB1 sont retrouvés dans le LLBA (Hiwatari *et al.*, 1997; Khalil *et al.*, 2001b) et le plasma (Yong *et al.*, 2001; Molina-Molina *et al.*, 2006). De plus, le TGFB1 sous forme d'ARNm et de protéine est surexprimé dans le tissu pulmonaire issu de patients atteints (Broekelmann *et al.*, 1991; Khalil *et al.*, 1991a; Khalil *et al.*, 1991b; Corrin *et al.*, 1994; Cao *et al.*, 2000; Coker *et al.*, 2001; Bergeron *et al.*, 2003; Tzortzaki *et al.*, 2007), en particulier au niveau des CEA de type II et des foyers fibroblastiques (Broekelmann *et al.*, 1991; Khalil *et al.*, 1991a; Khalil *et al.*, 1991b; Corrin *et al.*, 1994; Cao *et al.*, 2000; Lomas *et al.*, 2012). Une immunoréactivité intense pour la Smad 2 phosphorylée, preuve de la présence d'un signal TGFB1 actif, a également été mise en

évidence au niveau des cellules épithéliales hypertrophiques et du parenchyme (dont les foyers de fibroblastes) (Lepparanta *et al.*, 2012). Le TGFB1 est également présent en quantité augmentée dans le poumon dans les modèles murins de fibrose induite par l'administration de bléomycine (Santana *et al.*, 1995) ou de cyclophosphamide, et l'augmentation de sa production précède la synthèse de collagène (Hoyt et Lazo, 1988; Hoyt et Lazo, 1989). La surexpression du TGFB1 sous forme active induit une fibrose pulmonaire durable (Sime *et al.*, 1997), même chez les animaux considérés comme résistants à la fibrose (Brody *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2001), alors que le blocage de la signalisation du TGFB1 améliore la fibrose dans les modèles murins (Giri *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1999a; Zhao *et al.*, 2002; Bonniaud *et al.*, 2005a; Bonniaud *et al.*, 2005b). Le transfert intratrachéal de TGFB1 chez les rongeurs entraîne une accumulation très importante de fibroblastes ainsi que l'expression de collagène de type I et III autour des voies respiratoires et dans l'interstitium (Sime *et al.*, 1997; Kenyon *et al.*, 2003).

#### 1.9.3.3.1 Polymorphismes dans le gène du TGB1 et FPI

Des plus en plus de données indiquent une association entre des polymorphismes dans le gène du TGFB1 et la prédisposition aux maladies pulmonaires fibrosantes, dont la FPI. Différents polymorphismes dans le gène du TGFB1 ont été décrits, notamment au niveau du codon 10 et du codon 25. Ces changements interviennent dans la séquence « signal » et peuvent avoir des conséquences sur la transcription, la traduction et le transport de la protéine à travers le réticulum endoplasmique (Awad *et al.*, 1998); le polymorphisme au niveau du codon 25 a notamment été associé à une synthèse variable de TGFB1. Les résultats de différentes études (Awad *et al.*, 1998; El-Gamel *et al.*, 1999; Whyte, 2003; Xaubet *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2011b; Son *et al.*, 2013) suggèrent que les polymorphismes dans le gène du TGFB1, en particulier au niveau du codon 10, pourraient être liés à la susceptibilité à la FPI ainsi qu'à sa sévérité.

#### 1.9.3.3.2 Sources cellulaires du TGFB1

Différentes sources cellulaires de TGFB1 semblent activées dans les affections pulmonaires fibrosantes. Des taux élevés en TGFB1 ont été mis en évidence dans les cellules épithéliales et les macrophages des voies respiratoires terminales et des alvéoles, les neutrophiles, les CEA activées, les cellules endothéliales, les fibroblastes et les myofibroblastes (Khalil *et al.*, 1991a; Deguchi, 1992; Corrin *et al.*, 1994; Limper *et al.*, 1994; Khalil *et al.*, 1996; Jagirdar *et al.*, 1997; Vignola *et al.*, 1997; Charpin *et al.*, 1998; De Boer *et al.*, 1998; Salez *et al.*, 1998; Elssner *et al.*, 2000; Khalil *et al.*, 2001b; Bartram et Speer, 2004). Le TGFB1 est également présent dans les régions sous-épithéliales avec dépôt de tissu fibroconnectif dense (Broekelmann *et al.*, 1991; Khalil *et al.*, 1991b; Limper *et al.*, 1991; Corrin *et al.*, 1994; Limper *et al.*, 1994; Jagirdar *et al.*, 1997; Minshall *et al.*, 1997; Vignola *et al.*, 1997). Alors que dans les stades précoces les cellules épithéliales et les plaquettes semblent être un réservoir pour le TGFB1 (Border et Ruoslahti, 1992; Coker *et al.*, 1997), les macrophages alvéolaires sont une source importante de production et de sécrétion de TGFB dans différentes formes de maladies respiratoires chroniques durant la phase où les taux les plus élevés en TGFB sont retrouvés (Broekelmann *et al.*, 1991; Deguchi, 1992; Vanhee *et al.*, 1994; Santana *et al.*, 1995; Asakura *et al.*, 1996; Magnan *et al.*, 1996; De Boer *et al.*, 1998).

#### 1.9.3.3.3 Le TGFB1 et l'épithélium alvéolaire lésionnel

Le TGFB1 exerce de nombreux effets sur les cellules épithéliales qui ont un rôle dans la pathogénie de la FPI: stimulation de l'apoptose (Hagimoto *et al.*, 2002), inhibition de la prolifération (Ryan *et al.*, 1994), induction de la migration (Yu *et al.*, 2008) et induction de la TEM (Kim *et al.*, 2006c). Même si les mécanismes à l'origine de la mort des CEA ne sont pas complètement identifiés, il a été démontré que le TGFB1 a un rôle central comme inducteur puissant de l'apoptose (Siegel et Massague, 2003).

Le stress oxydatif a également un lien avec le TGFB1. Les dérivés réactifs de l'oxygène favorisent un environnement profibrotique en altérant la balance entre les MMP et leurs inhibiteurs mais également en activant directement ou indirectement le TGFB1 (Barcellos-Hoff *et al.*, 1994; Barcellos-Hoff et Dix, 1996). Le TGFB1 produit également des dérivés oxydatifs de l'oxygène comme élément de ses voies de signalisation (Kinnula *et al.*, 2005). Récemment, Hecker (Hecker *et al.*, 2009) a démontré que la NADPH oxydase 4, molécule qui génère des radicaux libres, était largement exprimée dans les foyers de fibroblastes des patients avec FPI et que le TGFB1 induit l'expression de la NADPH oxydase 4 par les cellules mésenchymateuses.

Par ailleurs, la régulation positive de PAI-1 au niveau épithélial, processus intervenant dans l'activation de la cascade de coagulation, est induite par une voie TGFB1/ Smad 3 (Dennler *et al.*, 1998). Senoo (Senoo *et al.*, 2010) a par ailleurs récemment démontré que l'inactivation de PAI-1 en utilisant de petits ARN interférents limitait le développement de la fibrose dans le modèle bléomycine, suggérant que l'inhibition de la coagulation alvéolaire via PAI-1 pourrait avoir des effets directs antifibrosants. L'expérimentation *in vitro* a également mis en évidence que l'inactivation de PAI-1 inhibait également la TEM médiée par le TGFB1 dans des lignées épithéliales d'origine pulmonaire.

Le TGFB1 semble également intervenir directement sur les cellules épithéliales pour l'initiation du processus de fibrose. Des études *in vitro* (Maniscalco et Campbell, 1994; Maniscalco *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2000) ont ainsi démontré que le TGFB1 peut augmenter la synthèse de protéoglycans et de fibronectine, ainsi que du facteur de croissance des fibroblastes de type 2 par les CEA de type II. Le rôle pivot du TGFB1 et des CEA de type II a également été mis en évidence par Li (Li *et al.*, 2011a). Dans cette étude, l'action du TGFB1 a été empêchée spécifiquement sur les CEA de type II par délétion du TGFBR2 au niveau épithélial. L'absence de signalisation du TGFB1 au niveau des CEA permettait une protection contre l'action de la bléomycine avec une induction de l'apoptose des cellules épithéliales, une diminution de l'activation des myofibroblastes et une préservation de l'équilibre des protéases (MMP/tissu inhibitor of metalloproteinase TIMP).

#### 1.9.3.3.4 Le TGFB1 et le recrutement des fibroblastes

L'origine la plus certaine pour l'augmentation du nombre de myofibroblastes en région sous-épithéliale et dans les foyers fibroblastiques est l'activation, la prolifération et la différenciation des fibroblastes résidents quiescents en myofibroblastes hautement contractiles. Ce processus apparaît en présence de facteurs de croissance profibrotiques dont le PDGF mais également le TGFB1 (Fernandez et Eickelberg, 2012). L'activité des voies canoniques et non canoniques du TGFB1 ont été impliquées car elles aboutissent toutes les deux à la formation de l' $\alpha$ SMA. Une étude récente d'Akhmetshina (Akhmetshina *et al.*, 2012) a souligné les interactions entre TGFB1 et la voie des Wnt comme facteur clé de l'activation des fibroblastes dans les processus fibrotiques.

Plusieurs études ont également mis en avant un rôle du TGFB1 dans la TEM, autre source possible de fibroblastes dans la FPI. Yao (Yao *et al.*, 2004) a d'abord mis en évidence que le TGFB1 était capable d'induire une TEM *in vitro*. Ces résultats ont été retrouvés par Willis (Willis *et al.*, 2005), qui a également mis en évidence que les cellules co-exprimant des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux étaient abondantes dans les tissus issus de patients avec FPI. Ces résultats ont été confirmés par différents groupes par des approches *in vitro* et également *in vivo* (Willis et Borok, 2007; Fernandez et Eickelberg, 2012). De plus, les modèles *in vivo* ont également confirmé un rôle central du TGFB dans la TEM et ce spécifiquement dans la fibrose pulmonaire. Un modèle sur-exprimant la forme active du TGFB1 au niveau pulmonaire grâce à un vecteur adéno-viral a notamment été utilisé (Kim *et al.*, 2006c). Dans les poumons lésionnels, des cellules

interstitielles positives pour l' $\alpha$ SMA présentaient également un marqueur des cellules épithéliales, démontrant l'existence in vivo d'une TEM induite par le TGF $\beta$ 1. La signalisation par les Smads mais également par d'autres voies ont été impliquées dans la TEM induite par le TGF $\beta$ 1 (Willis et Borok, 2007).

De la même manière que les fibroblastes résidents et les cellules épithéliales, les fibrocytes répondent à l'activation par le TGF $\beta$ 1 par une différenciation en myofibroblastes par l'intermédiaire des voies Smad2/3, SAPK/JNK et MAPK qui stimulent l'expression de l' $\alpha$ SMA (Hong *et al.*, 2007).

Récemment, Hashimoto (Hashimoto *et al.*, 2010) a décrit un nouveau mécanisme qui pourrait contribuer au pool de myofibroblastes : la transition endothélio-mésenchymateuse. Il a en effet démontré que les cellules endothéliales avaient la capacité de réguler négativement leurs marqueurs endothéliaux (CD31) et d'acquérir des marqueurs de type fibroblastique, comme l' $\alpha$ SMA et le collagène de type I, par la coopération des voies de signalisation TGF $\beta$ 1 et Ras/ERK/MAPK. Ce concept de transition endothélio-mésenchymateuse, similaire à la TEM, a été suggéré comme source supplémentaire de myofibroblastes activés dans la FPI (Nataraj *et al.*, 2010). Toutefois, même si cette transition a été décrite dans des modèles expérimentaux de fibrose cardiaque et rénale, des investigations plus poussées sont nécessaires pour la valider au niveau pulmonaire en général et dans la FPI en particulier.

#### 1.9.3.3.5 Le TGF $\beta$ 1 et l'activation des fibroblastes

Le TGF $\beta$ 1 est un chémoattractant pour les fibroblastes et les myofibroblastes (Postlethwaite *et al.*, 1987; Sime *et al.*, 1998), il stimule la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes et empêche l'apoptose des myofibroblastes (Zhang et Phan, 1999). Hill (Hill *et al.*, 1986) a également mis en évidence que le TGF $\beta$ 1 pouvait être mitogénique pour les fibroblastes immatures, effet qui n'a toutefois pas été retrouvé par Fine (Fine et Goldstein, 1987) et Liu (Liu *et al.*, 1995). Bien que le TGF $\beta$ 1 ne semble pas pouvoir stimuler directement la prolifération des fibroblastes matures (Raghu *et al.*, 1989), il peut exercer des effets mitogéniques sur les fibroblastes indirectement par l'intermédiaire de cytokines sécrétées par les macrophages et les fibroblastes, dont le PDGF et l'activateur du plasminogène de type urokinase (Leof *et al.*, 1986; Moses *et al.*, 1990; Bonner *et al.*, 1995; Shetty *et al.*, 1996). En effet, au moins une partie de l'action du TGF $\beta$ 1 sur les fibroblastes semble due à son influence sur l'activité du PDGF (Leof *et al.*, 1986; Moses *et al.*, 1990; Ludwicka *et al.*, 1995) et il a été suggéré que le PDGF et le TGF $\beta$ 1 fonctionnent de concert pour stimuler les événements cellulaires qui entraînent la fibrose. Le PDGF serait responsable de l'augmentation de la prolifération des fibroblastes tandis que le TGF $\beta$ 1 stimulerait la production de la matrice extracellulaire par ces fibroblastes (Bonner *et al.*, 1995).

#### 1.9.3.3.6 Le TGF $\beta$ 1 et la régulation de la matrice extracellulaire

Le TGF $\beta$ 1 est le plus puissant stimulateur connu de la synthèse de la matrice extracellulaire (Scotton et Chambers, 2007; Tatler et Jenkins, 2012). In vitro, toutes les isoformes du TGF $\beta$  sont capables d'induire une augmentation de l'expression du collagène (Ignatz et Massague, 1986; Fine et Goldstein, 1987; Raghu *et al.*, 1989; Liu *et al.*, 1995; Coker *et al.*, 1997). Le TGF $\beta$ 1, par l'intermédiaire de la voie Smad, augmente directement la transcription, par les cellules mésenchymateuses, des gènes de différents collagènes, en particulier de type 1A1, -A2 et -A3, type 5 et 6 (Cutroneo *et al.*, 2007). De plus, le TGF $\beta$ 1 induit également la transcription et la synthèse d'autres composants de la matrice extracellulaire par les fibroblastes immatures et matures, tels que la fibronectine, les aminoglycans et les protéoglycans (Ignatz et Massague, 1986; Dubaybo et Thet, 1990; Broekelmann *et al.*, 1991; Bonner *et al.*, 1995; Grande, 1997). Certaines des cytokines sécrétées par les fibroblastes, comme le CCL2, stimulent également l'expression du collagène par l'intermédiaire du TGF $\beta$ 1 (Gharaee-Kermani *et al.*, 1996).

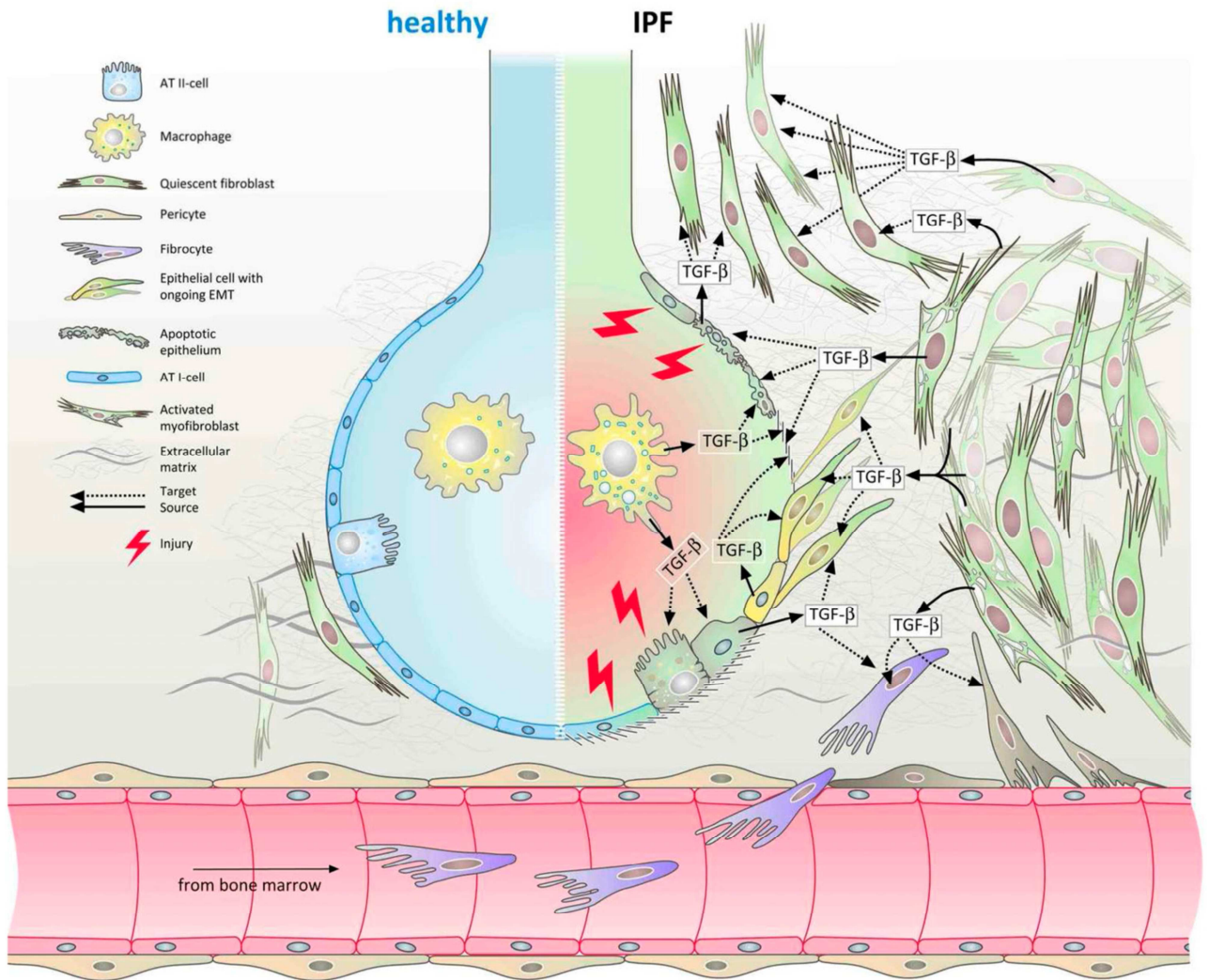
En plus de stimuler la synthèse de la matrice extracellulaire, le TGFB1 stabilise également la matrice nouvellement formée. Il crée un microenvironnement qui en favorise la déposition ; en induisant un déséquilibre entre les enzymes dégradant la matrice extracellulaire et leurs inhibiteurs. Le TGFB1 diminue l'induction des MMP collagénase et stromélysine stimulée par l'IL1 et le PDGF(Edwards *et al.*, 1987; Overall *et al.*, 1989) ; tout en augmentant l'expression des inhibiteurs des protéases dont les TIMP(Edwards *et al.*, 1987) et le PAI-1(Laiho *et al.*, 1986; Lund *et al.*, 1987; Keski-Oja *et al.*, 1988). Ces effets sont liés à des changements à la fois dans la transcription des gènes et dans la stabilité des ARN (Grande, 1997).

Le TGFB1 régule également les interactions entre les cellules et la matrice en modifiant l'expression des complexes protéiques d'adhésion cellule/ matrice. Les cellules traitées par le TGFB1 ont une affinité augmentée pour les composants de la matrice extracellulaire dont la fibronectine, le collagène et la laminine. Cet effet est dû à l'induction de l'expression des intégrines par le TGFB1 (Ignatz et Massague, 1987; Heino *et al.*, 1989).

#### 1.9.3.3.7 Autres

Le TGFB1 semble intervenir également dans d'autres mécanismes pathologiques évoqués dans la pathogénie de la FPI. La réactivation des voies du développement fait notamment intervenir un « cross-talk » avec le TGFB lors de la différenciation des myofibroblastes (Aoyagi-Ikeda *et al.*, 2011) ou dans les lésions épithéliales et la communication épithélium/ mésenchyme (Zhou *et al.*, 2012). Le TGFB1 a également été associé aux modifications épigénétiques observées lors de FPI (Pandit *et al.*, 2011).

Figure 14 : Représentation schématique des rôles potentiels du « transforming growth factor beta 1 » dans la pathogénie de la fibrose pulmonaire idiopathique, d'après (Fernandez et Eickelberg, 2012)



AT I: type 1 alveolar epithelial cell; AT II: type 2 alveolar epithelial cell; EMT: epithelial mesenchymal transition; TGF- $\beta$ : transforming growth factor beta

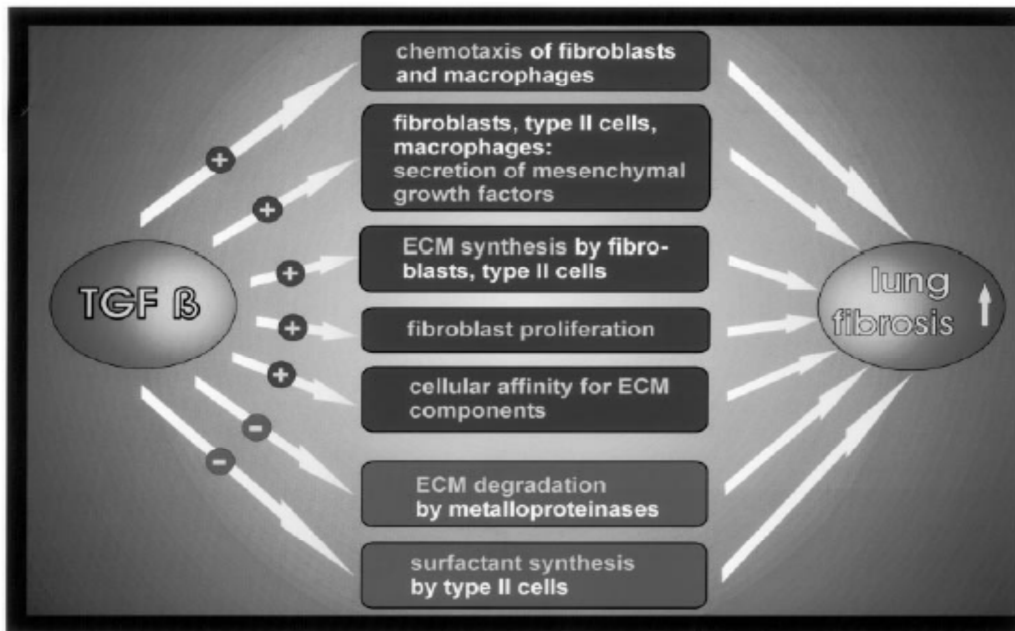


FIGURE 2. Direct and indirect promotion of lung remodeling and fibrosis by TGF $\beta$ . ECM = extracellular matrix. + = stimulating effect; - = inhibiting/inhibitory effect.

ECM: extracellular matrix; +: stimulation; -: inhibition

#### 1.9.3.3.9 Particularités des voies du TGF $\beta$ 1 dans la FPI

##### 1.9.3.3.9.1 Stockage

Peu d'études ont analysé l'expression et le rôle des LTBP dans la pathogénie de la FPI. La production de LTBP1 par les fibroblastes normaux augmente en présence de TGF $\beta$ 1 (Weikkolainen *et al.*, 2003). Dans une étude, aucune immunoréactivité n'avait été détectée pour la LTBP1 en région sous-épithéliale (Khalil *et al.*, 2001b), zone où le TGF $\beta$ 1 est habituellement retrouvé en association avec la matrice extracellulaire (Khalil *et al.*, 1991a; Khalil *et al.*, 1996). Ce résultat suggérait que l'incorporation du TGF $\beta$ 1 dans la matrice extracellulaire lors de FPI ne faisait pas intervenir la LTBP1 (Khalil *et al.*, 2001b). Dans une autre étude (Lepparanta *et al.*, 2012), les CEA des patients avec FPI n'exprimaient la LTBP1 que de manière occasionnelle alors qu'une régulation positive de son expression était mise en évidence dans le parenchyme, notamment au niveau des foyers de fibroblastes. Cette régulation positive était en accord avec les résultats obtenus précédemment par l'analyse des profils d'expression génique dans la FPI (Selman *et al.*, 2008). Aucune différence avec les contrôles sains n'était par contre notée pour l'expression de LTBP3 et LTBP4. Au sein des foyers fibroblastiques, l'immunoréactivité pour la Smad 2 phosphorylée était par contre faible, indiquant un signal TGF $\beta$ 1 actif réduit. Lors de culture de fibroblastes ou de cellules épithéliales pulmonaires, la régulation négative de la LTBP1 entraînait respectivement une augmentation et une diminution de l'activité du TGF $\beta$ 1. Ces données suggèrent que la LTBP1 pourrait avoir un rôle dans l'activation du TGF $\beta$ 1 dans la pathogénie de la FPI mais que cette activation est dépendante du contexte cellulaire. L'administration de bléomycine chez la souris entraîne une régulation positive de l'expression de LTBP4 et LTBP1 au niveau pulmonaire (Zhou *et al.*, 2009). En culture cellulaire, il a également été démontré que l'activation du TGF $\beta$ 1 faisant suite à l'ajout de bléomycine nécessitait la présence de LTBP4, les fibroblastes déficients en LTBP4 étant incapables de cette activation (Zhou *et al.*, 2009).



### 1.9.3.3.9.2 Activation par les intégrines

#### 1.9.3.3.9.2.1 Intégrine $\alpha\beta6$

L'activation du TGF $\beta$ 1 par l'intégrine  $\alpha\beta6$  est d'importance critique dans la pathogénie de la fibrose pulmonaire. Tout d'abord, les souris knock-out pour l' $\alpha\beta6$  sont résistantes à la fibrose induite par la bléomycine, comme celles avec des anomalies dans la signalisation du TGF $\beta$ 1 (Munger *et al.*, 1999; Bonniaud *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2011a). L'analyse du profil d'expression génique après exposition à la bléomycine chez ces souris knock-out pour l' $\alpha\beta6$  met en évidence une absence d'activation de nombreux gènes cibles du TGF $\beta$ 1 comparées à des souris de phénotype sauvage (Kaminski *et al.*, 2000). De plus, les souris knock-out pour l' $\alpha\beta6$  sont aussi résistantes à l'action profibrotique du lipopolysaccharide, d'une ventilation mécanique excessive ou des radiations (Pittet *et al.*, 2001; Jenkins *et al.*, 2006; Puthawala *et al.*, 2008). Par ailleurs, l'administration d'un anticorps monoclonal anti-  $\alpha\beta6$  prévient l'apparition in vivo d'une fibrose pulmonaire ou rénale ou de lésions pulmonaires aiguës (Hahm *et al.*, 2007; Puthawala *et al.*, 2008). Ainsi, le blocage par différentes techniques de l'activation du TGF $\beta$ 1 par l' $\alpha\beta6$  prévient l'apparition d'une fibrose tissulaire, et ce dans différents modèles (Tatler et Jenkins, 2012).

L'expression de cette intégrine est faible dans le poumon normal (Breuss *et al.*, 1993; Weinacker *et al.*, 1995; Lepparanta *et al.*, 2012) mais augmente de manière significative suite à une lésion de l'épithélium (Breuss *et al.*, 1995; Miller *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2009). Les taux d'ARNm et de protéines de la sous-unité  $\beta6$  sont également augmentés au niveau pulmonaire dans les modèles murins et chez les patients atteints de FPI (Horan *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2009). Bien que, lors de lésions pulmonaires, la surexpression de l'intégrine  $\alpha\beta6$  peut induire le développement d'une fibrose (Hakkinen *et al.*, 2004); cette surexpression dans des poumons sains n'est pas suffisante pour induire des lésions ou une fibrose tissulaires (Huang *et al.*, 1998b; Hakkinen *et al.*, 2004). Ces données suggèrent que la surexpression de l'intégrine  $\alpha\beta6$  est nécessaire, mais pas suffisante, pour le développement de la fibrose pulmonaire et que d'autres facteurs interviennent. L'expression de la sous unité  $\beta6$  est stimulée directement par le TGF $\beta$ 1 (Sheppard *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1996). Cette régulation positive peut être annulée en bloquant l'action du TGF $\beta$ 1 ou de l'intégrine  $\alpha\beta6$ , suggérant une boucle paracrine d'auto-amplification (Araya *et al.*, 2007). Ainsi, les lésions épithéliales pourraient stimuler l'activation du TGF $\beta$ 1 par l'intégrine  $\alpha\beta6$ ; le TGF $\beta$ 1 exerçant à son tour un rétrocontrôle positif en stimulant la synthèse de l' $\alpha\beta6$  (Annes *et al.*, 2003; Tatler et Jenkins, 2012). Les éléments qui permettent une régulation de ce phénomène dans la cicatrisation normale ou qui conduisent à son activation aberrante dans la FPI sont toutefois encore inconnus (Tatler et Jenkins, 2012).

Un élément spécifique de l'activation du TGF $\beta$ 1 par l' $\alpha\beta6$  est la nécessité d'un contact direct entre la cellule exprimant l'intégrine et la cellule portant les récepteurs du TGF $\beta$ 1 (Munger *et al.*, 1999). L'absence de restauration de la membrane basale observée lors de FPI est donc probablement un élément clé de l'activation du TGF $\beta$ 1 dans la pathogénie de la fibrose (Tatler et Jenkins, 2012). En effet, l'altération persistante de la membrane basale de l'épithélium alvéolaire pourrait permettre une interaction entre les cellules épithéliales endommagées et les cellules mésenchymateuses (Sheppard, 2006; Tatler et Jenkins, 2012). L'activation du TGF $\beta$ 1 par l' $\alpha\beta6$  peut également être mise en lien avec l'activation de la cascade de coagulation dans la FPI. En effet, il a été démontré que la thrombine et des agonistes synthétiques de PAR1 sont capables d'induire l'activation du TGF $\beta$ 1 par l' $\alpha\beta6$  par l'intermédiaire du récepteur de PAR1 (Jenkins *et al.*, 2006).

#### 1.9.3.3.9.2 Autres intégrines

Bien que la plupart des données aient impliqué l'intégrine  $\alpha\beta6$ , il semblerait que d'autres intégrines ( $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$ ), plutôt associées au mésenchyme, puissent avoir un rôle dans la pathogénie de la FPI (Wipff *et al.*, 2007; Tatler et Jenkins, 2012).

L'intégrine  $\alpha\beta8$  est exprimée en grande quantité par l'épithélium des voies respiratoires chez l'homme (Mu *et al.*, 2002). In vitro, il a été démontré que l'activation du TGF $\beta$ 1 par cette intégrine entraînait une cicatrisation ralentie au niveau de l'épithélium pulmonaire ainsi qu'une inhibition de la prolifération de l'épithélium bronchique (Cambier *et al.*, 2000; Mu *et al.*, 2002; Neurohr *et al.*, 2006). Toutefois l'intégrine  $\alpha\beta8$  a surtout été impliquée dans le remodelage des voies respiratoires lors de bronchopneumopathie obstructive chronique (Araya *et al.*, 2007) et il n'existe à l'heure actuelle aucune donnée indiquant un rôle de l' $\alpha\beta8$  dans la pathogénie de la FPI. Seule une expression pulmonaire faible a été mise en évidence chez les patients atteints (Lepparanta *et al.*, 2012).

#### 1.9.3.3.9.3 Activation par la THBS1

Différentes données suggèrent un rôle pour la THBS1 dans la pathogénie de la FPI. L'activation du TGF $\beta$ 1 par la THBS1 a précédemment été associée à des processus fibrotiques dans d'autres organes (Hugo *et al.*, 2002; Daniel *et al.*, 2003; Kondou *et al.*, 2003). L'expression de la THBS1 est par ailleurs régulée positivement par le TGF $\beta$ 1 et le PDGF (Hugo *et al.*, 1995; Murphy-Ullrich et Poczek, 2000) et lors de lésion tissulaire (Raugi *et al.*, 1987; Reed *et al.*, 1995). En culture, les CEA de type II sont capables de synthétiser et sécréter la THBS1 (Sage *et al.*, 1983). L'inhibition de l'activité de la plasmine par la THBS1 (Hogg *et al.*, 1992; Mosher *et al.*, 1992) pourrait contribuer à l'altération des voies de la coagulation retrouvée dans la FPI. Dans une étude (Kuhn et Mason, 1995), la THBS1 n'a pas été mise en évidence par immunohistologie dans le parenchyme pulmonaire de contrôles sains alors qu'elle était présente chez certains patients avec FPI, et ce dans la matrice extracellulaire, sous l'épithélium alvéolaire en régénération à proximité des foyers de fibroblastes. Dans une étude plus récente (Ide *et al.*, 2008) chez des patients avec FPI, la THBS1 était principalement exprimée au niveau de l'épithélium en régénération et des macrophages alvéolaires dans les régions du parenchyme avec fibrose. Chez les patients avec FPI et en comparaison de patients avec sarcoïdose ou de contrôles sains, les taux en THBS1 étaient plus élevés dans le sérum et plus faibles dans le LLBA.

#### 1.9.3.3.9.4 Récepteurs membranaires

Peu d'études ont été consacrées à l'étude des récepteurs du TGF $\beta$ 1 dans la FPI. Le TGF $\beta$ RII semble exprimé de manière ubiquitaire dans les poumons issus de contrôles et de patients avec FPI (Kang *et al.*, 2000; Khalil *et al.*, 2001a; Khalil *et al.*, 2001b). Dans les poumons sains, deux études ont rapporté un marquage pour le TGF $\beta$ R1 au niveau des alvéoles (Kang *et al.*, 2000; Khalil *et al.*, 2001a; Khalil *et al.*, 2001b) alors que dans une autre étude, une immunoréactivité n'a été détectée que dans moins de 1% des CEA de type II (Lomas *et al.*, 2012). Dans les poumons de patients atteints de FPI, la présence du TGF $\beta$ R1 semble dépendre du type cellulaire. Dans les rayons de miel et en comparaison de poumons sains, son expression est réduite dans la plupart des cellules, en particulier les CEA de type II, alors que les CEA de type I et les fibroblastes interstitiels expriment le TGF $\beta$ R1 (Khalil *et al.*, 2001a; Khalil *et al.*, 2001b). Cette régulation négative de l'expression du TGF $\beta$ R1 par les CEA de type II pourrait expliquer leur résistance aux effets antiprolifératifs du TGF $\beta$ 1 (Khalil *et al.*, 2001b) comme suggéré dans le modèle bléomycine (Khalil *et al.*, 1994). Les fibroblastes expriment les deux types de récepteurs du TGF $\beta$ 1 et sont ainsi une cible pour la signalisation du TGF $\beta$ 1 (Khalil *et al.*, 2001b).

Une caractéristique commune de nombreuses pathologies pulmonaires est l'existence d'un processus inflammatoire avec une phase de lésion tissulaire suivie par une phase de cicatrisation.

Ces lésions induisent la production de TGFB qui limite certaines réactions inflammatoires et joue un rôle clé dans la modulation du remodelage et de la réparation tissulaire (Kehrl *et al.*, 1986; Rook *et al.*, 1986; Ahuja *et al.*, 1993; Grande, 1997). Si ces processus de réparation sont exagérés et mal délimités, le TGFB devient une cytokine profibrotique majeure. Il retarde la cicatrisation de l'épithélium en inhibant la prolifération et la migration épithéliales et en stimulant l'apoptose. Il permet également l'expansion du compartiment mésenchymateux en induisant le recrutement, la prolifération et la contractilité des fibroblastes et en stimulant la déposition de la matrice extracellulaire par l'induction de l'expression de gènes codant pour ses composants et l'inhibition de l'expression de gènes des métalloprotéases (Sheppard, 2006; Fernandez et Eickelberg, 2012). Le TGFB stimule également l'expression de cytokines proinflammatoires et fibrotiques, telles que le TNF $\alpha$ , le PDGF, l'IL1 $\beta$  ou l'IL13, qui à leur tour stimulent et perpétuent la réponse fibrotique (Fernandez et Eickelberg, 2012). Par ailleurs, de nombreuses autres cytokines, telles que le TNF $\alpha$  (Ortiz *et al.*, 1998), le facteur de croissance des kératinocytes (Yi *et al.*, 1998), l'angiotensine II (Marshall *et al.*, 2000a; Uhal *et al.*, 2007) et l'IL-10 (Arai *et al.*, 2000) pourraient exercer leurs effets profibrotiques via les voies du TGFB.

## 2. La fibrose pulmonaire idiopathique canine (FPIc)

### 2.1 Définition

Alors que chez l'homme, il existe plus de 200 maladies pulmonaires interstitielles, très peu sont décrites chez le chien (Norris *et al.*, 2002; Reinero et Cohn, 2007) dont la bronchopneumopathie éosinophilique, affection la mieux décrite (Clercx *et al.*, 2000), mais également la bronchiolite respiratoire avec maladie pulmonaire interstitielle (Phillips *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2006), la pneumonie lipidique endogène (Raya *et al.*, 2006), la protéinose alvéolaire (Jefferies *et al.*, 1987; Silverstein *et al.*, 2000; Cummings *et al.*, 2013), la silicose (Canfield *et al.*, 1989) ou l'amiantose (Schuster, 1931). Parmi ces maladies pulmonaires interstitielles, une affection comparable à la FPI est décrite chez le chien et se traduit par un épaissement de l'interstitium alvéolaire par des dépôts de collagène qui conduisent à une altération des échanges gazeux (Corcoran *et al.*, 2011; Heikkila-Laurila et Rajamaki, 2014). Les premières séries de cas datent des années 90 et concernent des West Highland white terriers (Corcoran *et al.*, 1999a) (WHWT). A la même époque, une entité comparable a été décrite dans d'autres races (Staffordshire bull terrier, Schipperke et bull terrier) (Corcoran *et al.*, 1999b; Lobetti *et al.*, 2001). Plus récemment, différentes études se sont consacrées à décrire les données clinico-pathologiques de cette affection en comparant des WHWT atteints à des chiens sains de la même race et du même âge (Heikkila *et al.*, 2011), à évaluer la survie et identifier des facteurs pronostiques (Lilja-Maula *et al.*, 2014), à décrire son pattern histologique (Norris *et al.*, 2005; Syrja *et al.*, 2013) et tomodensitométrique (Webb et Armstrong, 2002; Johnson *et al.*, 2005), et évaluer la prévalence de l'hypertension pulmonaire chez les chiens atteints (Schober et Baade, 2006). En parallèle, différentes études ont cherché à identifier des biomarqueurs diagnostiques par mesure de molécule spécifique (Heikkila *et al.*, 2013) ou par protéomique (Lilja-Maula *et al.*, 2013b) ou évaluer le rôle des mutations de la SP-C (Eriksson *et al.*, 2009) dans l'apparition de cette maladie chez le chien.

Chez le chien le terme de fibrose pulmonaire idiopathique canine (FPIc) n'a été utilisé que récemment pour décrire cette maladie interstitielle affectant les terriers (Johnson *et al.*, 2005; Heikkila-Laurila et Rajamaki, 2014). D'autres termes ont été utilisés dans le passé, certains ne faisant référence qu'aux WHWT (maladie interstitielle pulmonaire du WHWT (Norris *et al.*, 2005), maladie pulmonaire chronique des WHWT (Corcoran *et al.*, 1999a; Corcoran *et al.*, 2011), WHWT avec FPI (Heikkila *et al.*, 2011; Heikkila-Laurila et Rajamaki, 2014)), d'autres toutes races (FPI chronique (Lobetti *et al.*, 2001), FPI (Corcoran *et al.*, 1999b)). Le terme de FPI seul semble actuellement inadapté, la maladie rencontrée chez le chien n'étant pas exactement identique à celle rencontrée chez l'homme et l'utilisation du même terme pourrait porter à confusion. Il n'est également pas encore déterminé à l'heure actuelle si cette affection est spécifique du WHWT. La présentation clinique est quasi identique dans les autres races (excepté une apparition plus précoce chez le Staffordshire bull terrier), ainsi que les images radiographiques (Corcoran *et al.*, 1999b; Lobetti *et al.*, 2001). Néanmoins les caractéristiques tomodensitométriques et surtout histologiques pourraient être différentes. Pour cette raison, la plupart des études les plus récentes se sont concentrées sur les WHWT. Dans le cadre de ce travail, le terme de FPIc sera utilisé ; il est néanmoins possible que la terminologie évolue dans le futur lorsque les maladies interstitielles pulmonaires en général et cette affection en particulier seront mieux connues en médecine vétérinaire.

Bien que la FPIc présente de nombreuses similitudes cliniques avec la FPI, leur ressemblance à l'échelle histologique a longtemps fait débat. D'après l'étude récente de Syrjä (Syrjä *et al.*, 2013), la FPI semble partager des caractéristiques histologiques des 2 entités les plus fréquentes de pneumopathies interstitielles diffuses : la PIC et la pneumopathie interstitielle non

spécifique. La FPIc est caractérisée histologiquement par deux patterns différents de fibrose interstitielle. Tous les chiens semblent présenter une fibrose de type « mature », diffuse, discrète à modérée des parois alvéolaires. Ce pattern ressemble à celui détecté lors de pneumonie interstitielle non spécifique plus qu'à la fibrose en patch de la PIC. En plus de cette fibrose mature, la plupart des chiens présentent également des zones multifocales d'accentuation de la fibrose, en région péribronchique et/ ou sous-pleurale. Dans ces zones, la fibrose apparait plus sévère, plus cellulaire et donc moins « mature ». Chez l'homme, cette apparence est plus caractéristique d'une PIC que d'une pneumonie interstitielle non spécifique. Des « rayons de miel », des altérations importantes de l'épithélium alvéolaire, tels qu'une métaplasie bronchique ou des modifications de l'espace alvéolaire, comme un dommage alvéolaire diffus, peuvent être également rencontrés dans les zones de fibrose plus sévère. Les foyers fibroblastiques, caractéristiques de la PIC, ne sont pas retrouvés chez le chien. Néanmoins, des amas multifocaux de fibroblastes ont été détectés dans l'interstitium fibrotique. De plus, une inflammation discrète à modérée, de type lymphoplasmocytaire, est également notée. Cette description histologique récente s'est focalisée sur les WHWT. La seule publication décrivant les données histologiques dans d'autres races est celle de Lobetti (Lobetti *et al.*, 2001) et il est difficile de comparer les résultats entre ces 2 études (colorations différentes, expertise en histopathologie dans l'espèce humaine ou canine des auteurs...). Il n'est donc pas déterminé à l'heure actuelle s'il existe des différences à l'échelle histologique entre les différences races atteintes de FPIc et s'il s'agit donc ou non de la même affection.

Table 3 : Comparaison entre les principaux critères histologiques d'une pneumopathie interstitielle commune ou d'une pneumopathie interstitielle non spécifique chez l'homme et les éléments retrouvés chez les West Highland white terriers (WHWT) avec fibrose pulmonaire idiopathique canine, d'après (Syrja *et al.*, 2013)

<i>Criteria</i>	<i>UIP</i>	<i>IPF in WHWT</i>	<i>NSIP (fibrosing)</i>
Pattern	Patchy, subpleural or paraseptal	Diffuse with subpleural/peribronchiolar accentuation	Relatively diffuse
Interstitial fibrosis	Marked, distorting, replacing alveolar tissue	Mild to marked, not obliterating alveolar architecture	Variable degree
Honeycombing	Yes	Yes	Not characteristic
Fibroblastic foci	Yes	No	Absent or inconspicuous
Interstitial inflammation	Minimal, mild	Mild to moderate	Mild to moderate
SM hyperplasia	Yes	Yes	Not characteristic
PCII	Hyperplasia	Hyperplasia, atypia	Hyperplasia in areas of inflammation
Bronchiolar epithelium	Bronchial metaplasia of alveolar epithelium	Bronchial metaplasia of alveolar epithelium	Not recorded

*NSIP : non specific interstitial pneumonia; SM: smooth muscle; PCII: type II pneumocytes; UIP: usual interstitial pneumonia*

## 2.2 Présentation clinique

Cette maladie affecte classiquement des terriers, principalement le WHWT (Corcoran *et al.*, 1999a; Webb et Armstrong, 2002; Norris *et al.*, 2005; Corcoran *et al.*, 2011; Heikkila *et al.*, 2011; Heikkila-Laurila et Rajamaki, 2014), mais également le Staffordshire bull terrier (Corcoran *et al.*, 1999b), le bull terrier (Lobetti *et al.*, 2001) et le cairn terrier (Johnson *et al.*, 2005). Néanmoins, elle a déjà été observée dans d'autres races telles que le Schipperke (Lobetti *et al.*, 2001), le Lhasa Apso ou le Shih Tzu (observations personnelles). L'âge habituel au moment du diagnostic varie entre 8 et 15 ans (Corcoran *et al.*, 2011; Heikkila *et al.*, 2011). Occasionnellement, la FPIc pourrait être diagnostiquée chez des chiens nettement plus jeunes, notamment chez le Staffordshire bull

terrier ou le bull terrier, les plus jeunes cas rapportés n'ayant que 3 ans (Lobetti *et al.*, 2001). Aucune prédisposition de sexe n'est rapportée.

La FPIc se caractérise par une aggravation progressive des signes cliniques. En phase débutante, aucune anomalie n'est très probablement observable (Heikkila-Laurila et Rajamaki, 2014). Le diagnostic est généralement retardé, les animaux étant présentés chez un vétérinaire en général entre 8 et 13 mois après l'apparition des premiers signes, toutefois ce chiffre est très variable d'un cas à l'autre (Corcoran *et al.*, 1999a; Corcoran *et al.*, 2011; Heikkila *et al.*, 2011).

Le signe clinique le plus classique est l'association d'une intolérance à l'effort d'apparition progressive et d'une toux plutôt forte et sèche (Corcoran *et al.*, 2011; Heikkila *et al.*, 2011). Certains animaux ne présentent qu'un de ces deux symptômes. Les propriétaires rapportent parfois de l'halètement, une tachypnée, ou des syncopes (Lobetti *et al.*, 2001). Une détresse respiratoire intermittente ou permanente, voire de la cyanose peuvent être observées dans les cas les plus sévères (Corcoran *et al.*, 1999a; Heikkila *et al.*, 2011). L'état général de l'animal n'est pas affecté, reflétant l'adaptation de l'organisme à une hypoxie d'apparition progressive (Heikkila-Laurila et Rajamaki, 2014). Dans certains cas, aucun signe clinique n'est mis en évidence et une FPIc est uniquement suspectée à l'auscultation de râles crépitants. Certains chiens peuvent également souffrir de complications associées à l'existence d'une FPIc. La plus fréquente est l'apparition d'une hypertension pulmonaire, qui se développe probablement en réponse à l'hypoxie chronique (Schober et Baade, 2006). La toux peut également être liée au développement subséquent d'une trachéo-bronchite chronique voir d'un collapsus trachéal (Heikkila *et al.*, 2011). Dans de très rares cas, une complication bactérienne peut être observée (Johnson *et al.*, 2005).

A l'examen clinique, l'animal présente, en général, une tachypnée discrète à très marquée, selon le degré d'avancement de la maladie. Une dyspnée restrictive est souvent observée et une cyanose est parfois visible en cas d'atteinte sévère. À l'auscultation, des râles crépitants grossiers sont classiquement notés à l'inspiration, notamment en périphérie (Heikkila *et al.*, 2011). Bien que relativement caractéristiques, ils ne sont pas pathognomoniques de la FPIc ni présents chez tous les chiens atteints (absents chez 3 individus sur 12 dans une étude récente (Heikkila *et al.*, 2011)). Des bruits surajoutés continus (râles ou sifflements) peuvent également être présents. Dans de rares cas, aucun bruit anormal n'est audible à l'auscultation (Heikkila *et al.*, 2011). Les animaux atteints d'une hypertension pulmonaire secondaire peuvent présenter un souffle systolique apexien droit (Ohad *et al.*, 2013) (régurgitation tricuspidiennne) et/ou un dédoublement du deuxième bruit cardiaque (audible davantage en base cardiaque gauche) (Heikkila-Laurila et Rajamaki, 2014).

La prévalence et l'incidence de la FPIc ne sont pas connues et sont difficiles à estimer. Elle semble toutefois peu fréquente même dans les races prédisposées, mais est vraisemblablement largement sous-diagnostiquée. En effet, d'une part, la maladie est encore mal connue des praticiens et d'autre part, la confirmation du diagnostic représente un réel challenge.

### 2.3 Diagnostic

Le diagnostic est fondé sur l'association de signes cliniques compatibles, les résultats d'imagerie et l'exclusion d'autres affections cardiorespiratoires. À l'heure actuelle, le diagnostic de certitude ne peut être établi que par l'analyse histologique du tissu pulmonaire. Une biopsie est toutefois rarement réalisée en pratique en raison du coût et des risques associés à cette procédure. Le diagnostic est alors souvent confirmé post mortem par autopsie (Heikkila-Laurila et Rajamaki, 2014).

La détection d'une FPIc est particulièrement difficile en phase précoce, l'apparition progressive des signes cliniques étant souvent imputée au vieillissement de l'animal (Heikkila-Laurila et Rajamaki, 2014).

Le bilan sanguin est généralement non remarquable mais peut permettre d'exclure d'autres affections à l'origine d'une intolérance à l'effort. L'hématologie permet parfois de mettre en évidence une polycythémie secondaire à l'hypoxie chronique (Lobetti *et al.*, 2001). Cette polycythémie n'est pas spécifique d'une FPIc, mais elle est plus fréquente que lors d'autres affections respiratoires chroniques, telles que la bronchopneumopathie éosinophilique ou la bronchite chronique. Elle peut également orienter le diagnostic vers une autre maladie, une éosinophilie suggérant, par exemple, plutôt un parasitisme ou une bronchopneumopathie éosinophilique. A l'examen biochimique, une augmentation des phosphatases alcalines est fréquemment observée chez les WHWT (Corcoran *et al.*, 2011; Heikkila *et al.*, 2011). Toutefois, il est difficile d'imputer cette variation à l'existence d'une FPIc, une augmentation comparable étant également retrouvée chez des WHWT sains âgés. Un examen de selles (technique de Baermann) peut être réalisé pour exclure des parasites pulmonaires (Heikkila-Laurila et Rajamaki, 2014).

### 2.3.1 Tests de fonction pulmonaire

La mesure des gaz sanguins artériels peut aider à évaluer de manière objective le degré d'atteinte de la fonction pulmonaire. Elle peut permettre d'estimer la sévérité de l'affection et éventuellement d'évaluer la progression voir la réponse au traitement lors de mesures sériées. Toutefois cette analyse ne peut être utilisée pour confirmer le diagnostic, toute affection entraînant une altération des échanges gazeux pouvant se traduire par une modification des gaz sanguins (Balakrishnan et King, 2014).

L'hypoxémie est très fréquente lors de FPIc, même au repos, alors qu'elle n'est que très rarement observée dans d'autres pathologies respiratoires chroniques chez le chien. En effet, une étude récente a montré que 90% des chiens atteints étaient hypoxémiques ( $\text{PaO}_2$  inférieure à 80mmHg, et 45% avaient une hypoxémie sévère avec une  $\text{PaO}_2$  inférieure à 60mmHg), la pression artérielle partielle en dioxyde de carbone ( $\text{PaCO}_2$ ) étant généralement non modifiée (Heikkila *et al.*, 2011). Le  $(\text{A-a})\text{O}_2$ , paramètre évaluant l'efficacité des échanges gazeux, est souvent très augmenté ( $(\text{A-a})\text{O}_2$  supérieur à 40 mmHg, pour une valeur usuelle inférieure à 10 à 20 mmHg) (Heikkila *et al.*, 2011). Une divergence existe fréquemment entre la sévérité de l'affection estimée par les gaz sanguins et les signes cliniques. Des valeurs très modifiées sont souvent observées chez des chiens présentant des signes cliniques peu marqués, ce qui traduit une probable adaptation de l'organisme à l'hypoxie chronique (Heikkila-Laurila et Rajamaki, 2014).

Le test de la marche des 6 minutes utilisé chez l'homme a récemment été décrit chez le chien (Boddy *et al.*, 2004; Swimmer et Rozanski, 2011). Dans l'étude de 2011, les 6 chiens atteints de pathologies respiratoires (dont 2 chiens avec probable FPIc) marchaient une distance plus courte que les chiens sains (69 chiens). Ce résultat a ensuite été confirmé spécifiquement chez des WHWT atteints de FPIc en comparaison de WHWT sains (Lilja-Maula *et al.*, 2014). Selon cette même étude, une tendance à une corrélation négative était notée entre la distance parcourue et la  $\text{PaO}_2$ . Ce test de la marche semble être bien toléré par tous les chiens. Il pourrait être utile pour quantifier de manière plus précise l'intolérance à l'effort, qui est un des premiers symptômes manifestés par les chiens atteints de FPIc. Toutefois même si sa répétabilité semble bonne au sein d'une même institution, il n'est pas encore déterminé s'il pourra être adapté à une utilisation en pratique courante.

### 2.3.2 Examen radiographique

Les clichés radiographiques thoraciques mettent en évidence, en général, une densification broncho-interstitielle modérée à sévère, avec parfois quelques zones d'opacité alvéolaire (Lobetti *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2005; Corcoran *et al.*, 2011; Heikkila *et al.*, 2011). Une cardiomégalie droite et/ou des artères pulmonaires dilatées suggèrent la présence d'une hypertension pulmonaire.

Cet examen n'est toutefois ni sensible ni spécifique d'une FPIc et permet surtout d'exclure d'autres maladies pulmonaires comme un néoplasme (Heikkila-Laurila et Rajamaki, 2014).

Les radiographies thoraciques, complétées si nécessaire par une bronchoscopie, permettent également de détecter une bronchiectasie ou un collapsus trachéal concomitants.

### 2.3.3 Examen échocardiographique

L'examen échocardiographique sert à exclure une origine cardiaque pour la toux et l'intolérance à l'effort, si le doute persiste après les clichés radiographiques. Il est également recommandé, lors de suspicion de FPIc, pour rechercher une hypertension pulmonaire et la quantifier (Heikkila-Laurila et Rajamaki, 2014) même si aucune cardiomégalie droite n'a été détectée aux radiographies. La vitesse du reflux tricuspide (même physiologique) permet d'estimer la pression artérielle pulmonaire systolique et celle du reflux pulmonaire, la pression artérielle pulmonaire diastolique. Un flux pulmonaire asymétrique dû à une diminution du temps d'accélération est également un signe d'hypertension. Les signes secondaires d'hypertension pulmonaire doivent être recherchés, comme une hypertrophie du ventricule droit, une dilatation de l'atrium droit, un aplatissement, voire un mouvement paradoxal du septum interventriculaire, une dilatation du tronc pulmonaire (Kellihan et Stepien, 2010). L'hypertension artérielle pulmonaire semble fréquente lors de FPIc, toutefois aucune étude n'a estimé sa prévalence de manière fiable. Ainsi dans l'étude de Heikkilä, des modifications du cœur droit suggérant son existence ont été retrouvées chez 6/10 cas (Heikkila *et al.*, 2011). Toutefois, sans réalisation d'un examen Doppler, sa présence n'a pas pu être confirmée et une hypertension pulmonaire moins sévère ou plus récente, sans remodelage du ventricule droit, n'a pas pu être détectée ; sa prévalence a donc été possiblement sous-estimée. Une étude échocardiographique s'est spécifiquement consacrée à la détection d'une hypertension pulmonaire chez 45 WHWT avec une pneumopathie chronique dont les signes cliniques et radiographiques étaient compatibles avec une FPIc (Schober et Baade, 2006). Une hypertension a ainsi été identifiée chez plus de 40% d'entre eux. Toutefois, pour confirmer la suspicion de FPIc, aucun examen TDM-HR n'avait été réalisé et un examen histologique n'avait été effectué que chez 4 chiens.

### 2.3.4 Examen tomodensitométrie en haute résolution

Comme chez l'homme, la TDM-HR est nettement supérieure aux radiographies pour l'évaluation du parenchyme pulmonaire. Toutefois, chez l'animal cette technique, outre son coût élevé, nécessite à minima une sédation voire une anesthésie pour l'acquisition des images, ce qui représente un risque potentiel chez les patients les plus sévèrement atteints (Heikkila-Laurila et Rajamaki, 2014).

Les anomalies mises en évidence lors de FPIc concernent surtout les régions dorso-caudales (Heikkila *et al.*, 2011), avec une distribution hétérogène (Johnson *et al.*, 2005). Elles se caractérisent principalement par une opacité en verre dépoli (augmentation diffuse de l'opacité du poumon sans masquage des vaisseaux pulmonaires) et des opacités réticulées, telles que des bandes parenchymateuses ou des lignes sous-pleurales, un épaississement interstitiel sous-pleural et péribronchique, des bronchiectasies par traction et des opacités en rayons de miel (Johnson *et al.*, 2005; Corcoran *et al.*, 2011; Heikkila *et al.*, 2011). Une consolidation peut également être observée (Johnson *et al.*, 2005; Heikkila *et al.*, 2011) et, chez certains chiens, les parois bronchiques semblent épaissies (Corcoran *et al.*, 2011). Pour un chien donné, les résultats de la TDM-HR correspondent le plus souvent à une combinaison de ces différentes lésions (Heikkila-Laurila et Rajamaki, 2014).

Le pattern tomodensitométrie de la FPIc ne semble pas complètement identique à celui de la FPI chez l'homme. En particulier, les opacités en verre dépoli, lorsqu'elles sont extensives



comme chez le chien, sont considérées comme atypiques et suggèrent plutôt un processus inflammatoire. Les bronchiectasies par traction et les opacités en rayons de miel, considérées comme typiques en médecine humaine, sont moins souvent observées lors de FPIc (Heikkila-Laurila et Rajamaki, 2014) et une étude suggère qu'elles pourraient être retrouvées dans les cas plus sévères (Johnson *et al.*, 2005). Toutefois Heikkilä rapporte qu'elles sont parfois présentes chez des chiens sans hypoxémie marquée (Heikkila-Laurila et Rajamaki, 2014).

### 2.3.5 Examen bronchoscopique et lavage bronchoalvéolaire

Bien qu'il s'agisse d'une pathologie de l'interstitium, beaucoup de chiens présentent des modifications des voies respiratoires supérieures à l'endoscopie (Corcoran *et al.*, 2011; Heikkila *et al.*, 2011). Lors de FPIc, les anomalies retrouvées à la bronchoscopie sont peu spécifiques. Ainsi, une muqueuse bronchique légèrement irrégulière et la présence d'un peu de mucus sont fréquemment observées. Dans les cas plus avancés, une bronchiectasie ou une bronchomalacie peuvent être mises en évidence. Ces irrégularités de la muqueuse bronchique peuvent être expliquées, au moins en partie, par des changements liés à l'âge : des modifications comparables étant retrouvées chez WHWT ou des Beagles sains et âgés (Mercier *et al.*; Heikkila *et al.*, 2011). Toutefois des modifications comparables sont observées lors de FPI chez l'homme et pourraient être la conséquence d'une rétraction du parenchyme pulmonaire et d'une modification de la stratégie respiratoire. Un collapsus trachéal discret à modéré est souvent présent (15/22 pour l'étude de Corcoran (Corcoran *et al.*, 2011) et 5/8 pour l'étude d'Heikkila (Heikkila *et al.*, 2011), dont 3 cas de collapsus sévère en combinant les 2 études). Il est probable qu'il s'agisse d'une conséquence de la fibrose plutôt qu'une affection isolée, le WHWT n'étant pas une race prédisposée au collapsus trachéal.

L'examen du LLBA met généralement en évidence une augmentation du comptage cellulaire total plus ou moins marquée selon les cas (280 à 3 000 cellules/mm<sup>3</sup>), composé majoritairement de macrophages et de neutrophiles (Heikkila *et al.*, 2011). Une complication bactérienne est exceptionnellement rapportée (Johnson *et al.*, 2005). Néanmoins, une culture bactérienne quantitative est réalisée pour exclure une pneumonie infectieuse, notamment lorsque des bactéries sont observées en intracellulaire.

La mise en évidence de changements compatibles avec une atteinte des voies respiratoires supérieures (muqueuse bronchique irrégulière à l'endoscopie, bronchomalacie, augmentation de la cellularité du liquide de lavage bronchoalvéolaire) n'exclut donc pas un diagnostic de FPIc, mais ne permet pas non plus de le confirmer (Heikkila-Laurila et Rajamaki, 2014). En fait, l'examen bronchoscopique est avant tout réalisé afin d'exclure d'autres affections respiratoires chroniques, en particulier une bronchopneumopathie éosinophilique ou un processus tumoral diffus. Comme pour l'examen TDM-HR, la nécessité d'une anesthésie peut contre-indiquer sa réalisation lors d'insuffisance respiratoire sévère.

### 2.3.6 Examen histologique

Pour confirmation du diagnostic, des prélèvements de tissu pulmonaire peuvent être obtenus du vivant de l'animal par thoracoscopie, voire par thoracotomie en privilégiant les régions sous-pleurales. En raison du caractère hétérogène des lésions de fibrose, l'examen tomodensitométrique préalable permet d'identifier les zones atteintes à prélever. En pratique, une biopsie pulmonaire est rarement réalisée du vivant de l'animal en raison de son caractère invasif. Néanmoins, elle doit être proposée lorsque les différents examens, en particulier l'examen tomodensitométrique, ne permettent pas de conclure. Cet examen permet de confirmer la présence d'une fibrose pulmonaire lors que le pattern histologique est comparable à celui évoqué précédemment. Toutefois, comme en médecine humaine, toutes les causes de fibrose secondaire

doivent être exclues avant de conclure à une FPI canine (en fonction du contexte : recherche d'une dirofilariose, dosage des anticorps antinucléaires, facteurs environnementaux etc.).

## 2.4 Pronostic

La FPIc est de mauvais pronostic en raison d'une détérioration progressive de la fonction respiratoire et de l'absence d'une thérapeutique ciblée et efficace. Une survie moyenne de 18 mois après l'apparition des premiers signes cliniques était rapportée dans une étude (Corcoran *et al.*, 1999a). Très récemment, une étude sur 5 ans et portant sur 15 WHWT avec FPIc a confirmé que la présence d'une FPIc influençait la survie avec un rapport de risque de décès de 4,5 comparé à des WHWT sains (Lilja-Maula *et al.*, 2014). Une survie plus prolongée a toutefois été identifiée avec une médiane de 32 mois après l'apparition des signes cliniques et 11 mois à partir du diagnostic; la survie semble par contre très variable d'un individu à l'autre avec un intervalle de 2 à 51 mois après apparition des signes cliniques. La corrélation avec la survie a également été évaluée dans cette étude pour différents paramètres. Ont été incluses des valeurs obtenues au moment du diagnostic: PaO<sub>2</sub> et PaCO<sub>2</sub>, (A-a)O<sub>2</sub>, sévérité des images radiographiques, unités Hounsfield à la TDM-HR ; mais également leur évolution entre la première et la dernière mesure pour les résultats des gaz sanguins et de l'hématologie. Un test de la marche des 6 minutes n'ayant été réalisé que chez 5 chiens, aucune corrélation avec la survie n'a été étudiée pour ce paramètre. En conclusion de cette étude, aucun des paramètres analysés n'a pu être lié à la survie. Aucun facteur pronostique n'est donc, pour l'instant, identifié pour la FPIc. Cette étude était toutefois relativement limitée par le nombre de cas disponibles (entre 10 et 15 selon les paramètres). De plus, d'autres facteurs pronostiques évoqués chez l'homme, comme l'existence d'une hypertension pulmonaire ou l'indice de distribution des globules rouges, doivent encore être évalués chez le chien.

## 2.5 Evolution

Il n'est pas encore déterminé si les différents types d'évolution reconnus chez l'homme (exacerbation aigue, évolution lente...) existent dans la FPIc (Heikkila-Laurila et Rajamaki, 2014). Certains chiens peuvent connaître des phases de détérioration de la fonction respiratoire mais l'évolution semble variable. Dans l'étude de Lilja-Maula (Lilja-Maula *et al.*, 2014), l'évolution de la maladie estimée d'après le suivi des gaz sanguins ou des images radiographiques était très variable avec une détérioration des résultats de gaz sanguins chez 5 chiens tandis qu'une amélioration temporaire était notée au cours du suivi chez 7 chiens. Toutefois, parmi les 7 chiens décédés de leur FPIc, 5 ont été euthanasiés en raison d'une dyspnée aigue et des lésions de dommages alvéolaires diffus, classiquement retrouvées lors d'exacerbation aigue chez l'homme, ont été retrouvées à l'histologie chez 7 d'entre eux. On peut donc supposer que des épisodes d'exacerbation aigue existent chez le chien et qu'ils pourraient être associés à une mortalité accrue.

## 2.6 Traitement

A notre connaissance, aucun essai clinique n'a été entrepris pour le traitement de la FPIc. Le traitement se limite donc à réduire les signes cliniques (en particulier la toux) et les complications associées (en particulier l'hypertension pulmonaire). Différents traitements ont été rapportés: prednisolone, azathioprine, théophylline etc. sans réelle évaluation de leur efficacité (Corcoran *et al.*, 1999a; Heikkila *et al.*, 2011). Aucune des thérapies immunomodulatrices, antifibrotiques, ou celles faisant usage d'anticoagulants, d'antagonistes de récepteurs de l'ET1, de vasodilatateurs ou d'inhibiteurs de cytokines testés en médecine humaine n'ont démontré leur efficacité en termes de prolongation de la survie (Rafii *et al.*, 2013). Il n'existe donc à l'heure actuelle aucune justification scientifique à l'emploi de ces spécialités chez les chiens atteints de

FPIc. La pharmacocinétique de la pirféridone, molécule ayant une AMM au Japon et en Europe pour le traitement de la FPI chez l'homme, a été étudiée chez le chien (Bruss *et al.*, 2004). Toutefois, en l'absence d'étude de tolérabilité chez le chien et au vu de son coût prohibitif, son utilisation n'est pour l'instant pas envisagée chez le chien. En raison de l'existence d'une inflammation bronchique chez le chien, une corticothérapie à dose anti-inflammatoire (et non immunosuppressive) peut avoir un intérêt dans le traitement de la FPIc. Plusieurs auteurs (Corcoran *et al.*, 1999a; Heikkila-Laurila et Rajamaki, 2014) rapportent en effet que certains chiens semblent bénéficier d'un tel traitement, notamment par une réduction de la toux. Lorsque la toux est marquée et altère la qualité de vie de l'animal, un traitement antitussif peut également être envisagé. L'utilisation de la théophylline en combinaison d'une corticothérapie a également été conseillée initialement lors de FPIc (Corcoran *et al.*, 1999a), toutefois les bénéfices réels de cette thérapie sont inconnus.

Peu d'essais cliniques ont été consacrés à l'utilisation du sildénafil lors d'hypertension pulmonaire chez le chien avec 2 essais rétrospectifs (Bach *et al.*, 2006; Kellum et Stepien, 2007) et une étude prospective avec placebo et en double aveugle mais sur une courte période (Brown *et al.*, 2010); les doses variant de 0,5 à 2 mg/kg toutes les 8 à 24 heures. Chez ces animaux atteints d'hypertension pulmonaire de différentes origines (idiopathique, secondaire à une cardiopathie gauche, à une pneumopathie chronique, etc.), l'utilisation de sildénafil améliorerait le confort de vie, notamment en augmentant la tolérance à l'effort. Aucune étude n'a par contre pu évaluer son effet sur la survie et seule une de ces études incluait des terriers avec probable FPIc (Kellum et Stepien, 2007). Ainsi, lorsque l'hypertension pulmonaire est estimée modérée ou sévère, un traitement à base de sildénafil peut être instauré lors de FPIc (Heikkila-Laurila et Rajamaki, 2014). La décision de la poursuite du traitement est avant tout clinique, une amélioration pouvant être observée sans que l'examen échocardiographique ne mette en évidence une diminution de la pression artérielle pulmonaire (Bach *et al.*, 2006; Kellum et Stepien, 2007; Brown *et al.*, 2010).

Comme dans toute affection cardiorespiratoire chronique, un traitement hygiénique doit être instauré. Les chiens atteints de FPIc sont très fréquemment en surpoids (défaut d'exercice, corticothérapie, etc.). L'obtention et le maintien d'un poids idéal est nécessaire, et permet souvent à lui seul d'améliorer les symptômes. L'inhalation de substances irritantes (fumée de cigarette, encens, etc.), ainsi que le port du collier ou les situations à l'origine d'aboiements intempestifs doivent également être évités.

## 2.7 Challenges actuels

### 2.7.1 Diagnostic

La FPIc est facilement suspectée cliniquement dans les races prédisposées. Toutefois, en raison de son pronostic défavorable, il est nécessaire de confirmer cette suspicion clinique. La démarche diagnostique requiert de nombreuses investigations complémentaires et inclut notamment un examen tomodensitométrique (Heikkila-Laurila et Rajamaki, 2014). La bronchite chronique reste le principal diagnostic différentiel de la FPIc; elle est de meilleur pronostic et répond au traitement. La FPIc et la bronchite chronique entraînent de la toux et de l'intolérance à l'effort et affectent toutes deux des chiens d'âge moyen à âgé et de petites races. Les signes radiographiques sont dans les deux cas non spécifiques et la distinction entre ces deux affections est d'autant plus délicate que deux études ont souligné la présence concomitante d'une inflammation bronchique discrète à modérée lors de FPIc (Corcoran *et al.*, 2011; Heikkila *et al.*, 2011). Toutefois, l'accumulation de mucus, la bronchomalacie et l'hyperhémie de la muqueuse sont souvent plus marquées lors de bronchite chronique que de FPIc (Heikkila-Laurila et Rajamaki, 2014). La TDM-HR est maintenant considérée comme indispensable dans la démarche

diagnostique, et pourrait permettre de différencier FPIc et bronchite chronique (Heikkila-Laurila et Rajamaki, 2014). Toutefois, aucune étude n'a spécifiquement évalué ses performances diagnostiques dans cette indication précise. Par ailleurs, il est probable que d'autres pneumopathies interstitielles diffuses existent chez le chien et que la spécificité de la TDM-HR soit inférieure à celle espérée. L'examen histopathologique reste donc indispensable à l'heure actuelle afin de confirmer la présence d'une FPIc, en particulier dans les races autre que le WHWT, pour lesquelles peu de données tomодensitométriques ont été publiées (2 cairn terriers (Johnson *et al.*, 2005)).

La mise en évidence de biomarqueurs spécifiques de cette affection et mesurables dans le sang ou le LLBA permettrait de simplifier la démarche diagnostique, et la recherche de biomarqueurs diagnostiques de la FPIc est l'objet de différents travaux en médecine vétérinaire (Heikkila *et al.*, 2013; Lilja-Maula *et al.*, 2013b). Les études concernent soit des biomarqueurs déjà connus en médecine humaine et dont les performances diagnostiques sont évaluées dans la FPIc, soit des études à large échelle sans à priori par l'utilisation de techniques modernes de screening comme la protéomique. Le pro-collagène aminoterminal de type III (PIIINP) a été évalué comme biomarqueur diagnostique potentiel dans la FPIc (Heikkila *et al.*, 2013). Le PIIINP est un marqueur du turnover du collagène de type III. Cette molécule est présente dans le propeptide et clivée durant la synthèse du collagène de type III. Elle est ensuite libérée dans le fluide extracellulaire puis dans le LLBA et le sang en proportion de la quantité de collagène produite (Prockop *et al.*, 1979). Une accumulation anormale de collagène de type I et III apparaît dans l'interstitium pulmonaire lors de FPI chez l'homme (Raghu *et al.*, 1985) et chez le chien (Norris *et al.*, 2005) et une concentration sérique élevée est observée chez les hommes atteints (Lammi *et al.*, 1999). Le PIIINP a donc été mesuré dans le sérum et le LLBA chez des chiens atteints de FPIc, de bronchite chronique, de bronchopneumopathie éosinophilique et des chiens sains (WHWT et Beagles) (Heikkila *et al.*, 2013). La concentration en PIIINP dans le LLBA était plus élevée chez les chiens avec FPIc en comparaison de chiens sains et de chiens avec une bronchite chronique. L'analyse de la courbe ROC montrait que les performances de ce biomarqueur étaient moyennes avec une aire sous la courbe de 0,81, une spécificité de 95% et une sensibilité de seulement 69% pour une valeur seuil de 0,1µg/L. Aucune différence n'était mise en évidence pour la concentration en PIIINP dans le LLBA entre chiens avec FPIc et chiens avec bronchopneumopathie éosinophilique et pour la concentration sérique entre tous les groupes. Aucune corrélation n'était notée entre la concentration dans le LLBA et la concentration sérique ou entre la concentration dans le LLBA et la PaO<sub>2</sub>, le (A-a)O<sub>2</sub> ou la durée d'évolution des signes cliniques. La principale limite de cette étude est toutefois la faible sensibilité du radioimmunoessai utilisé pour le dosage du PIIINP. Une concentration de 0,02µg/L a donc été arbitrairement attribuée pour les valeurs inférieures au seuil de détection de 0,03µg/L. En conclusion de cette étude, il semble que le PIIINP dans le LLBA puisse avoir un intérêt en tant que biomarqueur diagnostique. Toutefois, bien qu'un biomarqueur mesuré dans le LLBA soit probablement un meilleur marqueur de la production locale de collagène et moins influencé par d'autres facteurs, son utilisation est limitée d'un point de vue pratique. D'un point de vue du pronostic, aucune corrélation n'était mise en évidence avec les résultats des gaz sanguins. Une étude longitudinale avec mesures répétées au cours de suivi serait nécessaire pour réellement évaluer sa capacité à établir un pronostic, mais serait également peu applicable en pratique courante.

Une autre étude récente a utilisé une technique de protéomique pour analyser à large échelle les protéines dans le LLBA et ainsi identifier celles spécifiques de la FPIc (Lilja-Maula *et al.*, 2013b). Le LLBA a ainsi été soumis à une électrophorèse bidimensionnelle quantitative sur gel (2D-DIGE) pour séparer ses différents constituants suivie d'une spectrométrie de masse pour les identifier et confirmation par Western-blot pour la β-actine. La comparaison du protéome obtenu chez des chiens sains, des WHWT avec FPIc et des chiens avec bronchite chronique n'a toutefois

pas permis d'identifier une signature protéique spécifique de la FPIc. Cette étude est limitée par le faible nombre d'échantillons évalués (6 chiens avec FPIc, 5 avec bronchite chronique et 4 Beagles sains). Des changements similaires ont été retrouvés dans les 2 groupes malades avec une surexpression des protéines  $\beta$ -actine, C3 du complément,  $\alpha$ 1-antitrypsine, apolipoprotéine A1, haptoglobine et transcétolase et une sous-expression du lysozyme C. Il s'agit de plus de protéines peu spécifiques, intervenant notamment dans les processus inflammatoires ou l'immunité innée. La  $\beta$ -actine, composant du cytosquelette, pourrait être libérée lors d'une augmentation du turn-over cellulaire et de mortalité cellulaire et donc lors de dommage de l'épithélium alvéolaire. Toutefois, elle est l'une des protéines les plus souvent retrouvées lors d'analyse protéomique du LLBA, ce qui reflète probablement plus une réponse non spécifique au stress. Son intérêt en tant que biomarqueur diagnostique semble donc limité.

Cette recherche de biomarqueurs soulève des perspectives intéressantes pour aider au diagnostic de la FPIc. Toutefois des marqueurs plus fiables doivent encore être identifiés et il est également fort probable qu'une combinaison de biomarqueurs soit plus performante qu'un seul et que leur mesure ne soit qu'une aide complémentaire et non pas un substitut aux autres examens, en particulier la TDM-HR.

### 2.7.2 Traitement

Aucun traitement n'existe ou ne fait même l'objet d'essai clinique à l'heure actuelle dans la FPIc. Les principales limites à son développement sont la faible prévalence, qui rend le recrutement de cas difficile, mais avant tout le peu de connaissances actuelles à propos de cette affection. Le développement d'une thérapeutique ciblée nécessite en effet la détermination préalable de l'étiologie et/ou des mécanismes moléculaires conduisant au développement de la maladie.

### 2.7.3 Etio-pathogénie

L'étiologie de la FPIc est actuellement inconnue, bien qu'une base génétique soit suspectée en raison de la nette prédisposition raciale pour les terriers et en particulier pour le WHWT (Heikkila-Laurila et Rajamaki, 2014). A l'heure actuelle, seule une étude génétique a été publiée (Eriksson *et al.*, 2009). Cette étude incluait 5 chiens avec FPIc (dont 4 WHWT et 1 terrier tibétain) et 5 chiens contrôles (dont 3 chiens sains) de différentes races (dont 1 WHWT). Les SP-B et SP-C ont été mesurées dans le LLBA de 3 chiens avec FPI et des 5 contrôles, et le gène de la SP-C a été séquencé chez 2 chiens avec FPI et 1 contrôle. La SP-B était détectable dans le LLBA de tous les chiens et la SP-C chez tous sauf le terrier tibétain avec FPIc, pour lequel une mutation a été détectée dans l'exon 5 du gène de la SP-C. Il est toutefois difficile de tirer la moindre conclusion étant donné le très faible nombre de cas inclus, en particulier pour la recherche de mutation pour laquelle un chien contrôle de même race aurait été nécessaire.

Il est probable que, comme chez l'homme, le développement d'une FPIc résulte de l'association d'un terrain génétique favorable et de facteurs environnementaux. Toutefois à l'heure actuelle, aucune étude épidémiologique n'a été entreprise chez le chien pour identifier des facteurs de risque environnementaux ou autre, comme les reflux gastroœsophagiens. L'identification de tels facteurs est difficile ; les dommages pulmonaires peuvent apparaître longtemps avant les signes cliniques et il est possible que l'agent initial ne soit plus présent au moment du diagnostic.

Au-delà de l'identification du ou des agents causaux initiaux, il est également important d'identifier les mécanismes conduisant au développement de la fibrose, afin de définir des cibles thérapeutiques spécifiques. Or aucune publication ne s'était spécifiquement consacrée à l'étude de la pathogénie de la FPIc. Toutefois certaines informations peuvent être retirées de celles consacrées à l'identification de biomarqueurs. Ainsi les protéines surexprimées dans le LLBA laissent supposer l'existence d'une activation des facteurs anti- et pro-inflammatoires et des voies du

complément et de la glycolyse au niveau pulmonaire dans la FPIc (Lilja-Maula *et al.*, 2013b). La mise en évidence d'une augmentation de la concentration en PIIINP dans le LLBA suggère une activation de la synthèse du collagène de type III, bien que cette activation ne soit pas spécifique de la FPIc mais soit également retrouvée lors de bronchopneumopathie éosinophilique (Heikkila *et al.*, 2013).

## OBJECTIFS

---

La FPIc attire des plus en plus l'intérêt des cliniciens vétérinaires, au regard des nombreuses publications dont elle a fait l'objet dernièrement, et de la communauté scientifique en général, en particulier en tant que possible modèle spontané d'étude pour la FPI humaine. Cette maladie reste toutefois très peu connue et le clinicien doit faire face à plusieurs challenges, notamment l'établissement du diagnostic de la FPIc, qui requière de nombreux examens complémentaires, et l'absence d'un traitement efficace. Du côté de la recherche, l'identification d'une thérapie ciblée est très difficile en l'absence d'une bonne compréhension des mécanismes conduisant à la fibrose du parenchyme pulmonaire. Le recrutement d'un nombre de cas suffisants pour ces études est long en raison de la rareté de la maladie, mais la difficulté à confirmer le diagnostic complique également ce recrutement. Par ailleurs, avant de pouvoir envisager la FPIc comme modèle de la FPI humaine, il est nécessaire d'en compléter la description clinique et histologique mais surtout de vérifier qu'elles partagent certains mécanismes moléculaires.

Ce projet a donc été entrepris afin de répondre au moins partiellement à ces différents challenges. Ces objectifs étaient ainsi :

- d'élucider certains mécanismes intervenant dans la pathogénie de la FPIc
- d'identifier des biomarqueurs pouvant aider à son diagnostic.

Quasiment aucune donnée de départ n'étant disponible au moment de l'élaboration de ce projet, notre approche a été double. Nous avons ainsi choisi d'utiliser une technique de screening à large échelle, qui permet de travailler sans à priori, mais également d'utiliser les connaissances existantes dans la FPI humaine pour identifier certaines molécules d'intérêt, que ce soit dans la pathogénie ou en tant que biomarqueur.

- Pour l'étude de la pathogénie de la FPIc :
  - o La technique des microdamiers a été appliquée sur des tissus pulmonaires afin d'analyser dans son ensemble le transcriptome, et ce dans le but d'identifier de grandes voies altérées lors de FPIc. Cette technique permet également de mettre en avant plus spécifiquement certaines molécules dont l'expression est fortement altérée.
  - o Le TGFB1 a été analysé ainsi que ses voies de stockage, d'activation et de signalisation.
  - o Certaines voies de la sérotonine, molécule évoquée dans la pathogénie de la FPI chez l'homme et dont l'intérêt a été également suggéré lors de l'analyse microdamier précédente, ont également été étudiées.
- Pour l'identification de biomarqueurs de la FPIc
  - o Le transcriptome obtenu par microdamier a été analysé afin d'en extraire certains gènes codant pour des biomarqueurs potentiels.
  - o L'endothéline, biomarqueur connu dans la FPI humaine, a été évalué en tant que biomarqueur chez le chien.
  - o Bien qu'il ne s'agisse pour ces molécules que d'un objectif secondaire, l'analyse du TGFB1 et de la sérotonine a comporté également des dosages sériques, permettant ainsi d'évaluer également leur potentiel en tant que biomarqueurs.

## ETUDES

---

### 1. Recrutement des cas

Comme évoqué précédemment, la FPIc est une maladie rare et dont le diagnostic est difficile, deux éléments compliquant le recrutement de cas. Pour la réalisation des études prévues, plusieurs populations étaient nécessaires. En effet, en raison de la très forte prédisposition raciale de la FPIc, nous avons besoin de chiens sains de différentes races (prédisposées et non prédisposées) afin d'étudier ce facteur confondant « race ». Par ailleurs, dans le cadre de la recherche de biomarqueurs, nous devons disposer de chiens atteints d'autres affections respiratoires chroniques, afin d'évaluer les performances (sensibilité, spécificité) des marqueurs candidats. Le type d'échantillon nécessaire était également varié (sérum, LLBA, tissu pulmonaire), leur mode de prélèvement et de conservation devant être adaptés à leur usage respectif.

Afin de faciliter le recrutement de cas atteints de FPIc et de chiens contrôles sains, une collaboration à l'échelle européenne a été organisée. Tout d'abord, nous travaillons en étroite collaboration avec l'équipe de l'Université d'Helsinki pour la réalisation de différentes études (Heikkila *et al.*, 2013; Syrja *et al.*, 2013; Lilja-Maula *et al.*, 2014) et nous avons pu également utiliser des échantillons issus de chiens préalablement recrutés (Heikkila *et al.*, 2011). Nous avons ainsi pu bénéficier de deux populations: une série de WHWT atteints de FPIc et un groupe contrôle sain de la même race et d'âge comparable. Ces deux groupes ont été parfaitement phénotypés : confirmation du diagnostic de FPIc par TDM-HR ou histologie (les chiens pour lesquels le diagnostic n'était que tomodensitométrique au début du projet ont été à nouveau confirmés par la suite par histologie après leur décès) et réalisation d'une analyse des gaz sanguins et d'une TDM-HR pour chercher à exclure une FPIc sub-clinique chez les chiens contrôles. Par ailleurs, des confrères spécialisés en médecine interne et en cardiologie ont été contactés par différentes méthodes : courriel, encart dans les journaux spécialisés, pages d'information sur le site internet du projet LUPA et réunions d'information à l'occasion des congrès du collège européen de médecine. Ceci nous a permis d'établir un réseau de partenaires et des fiches explicatives (dossier clinique, obtention, conservation et transport des prélèvements) ont été mises à leur disposition. Une dizaine de cas supplémentaires ont pu être recrutés par ce biais. Enfin, concernant les chiens contrôles de différentes races, le recrutement s'est organisé auprès des membres du personnel et des étudiants de la faculté ainsi qu'auprès des éleveurs. Les éleveurs belges et français des races d'intérêt ont été contactés par l'intermédiaire des clubs de race, d'encarts dans les magazines et des salons. Deux réunions de vulgarisation sur la FPIc ont notamment été organisées en France à destination des éleveurs et propriétaires de WHWT et ont été l'occasion d'effectuer un dépistage et d'obtenir des prélèvements. Ce mode de recrutement nous a ainsi permis de récolter du sérum de chiens sains issus de différentes races.

Concernant les chiens atteints d'autres pathologies respiratoires, le service de médecine interne disposait déjà d'un nombre suffisant d'échantillons.

La seule donnée qui est restée problématique est l'obtention de tissu pulmonaire de WHWT sains, cette race étant peu représentée.



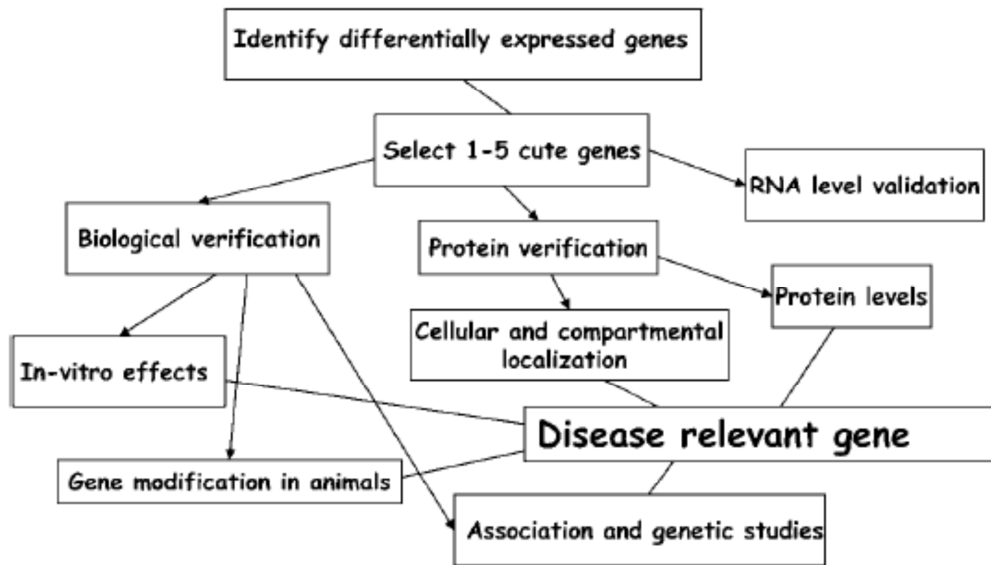
## 2. Etude 1 : Analyse du profil d'expression génique dans la FPIc

L'analyse des profils d'expression génique à l'échelle d'un tissu, notamment par la technique des microdamiers, est un outil particulièrement puissant pour l'étude des différentes voies impliquées dans la pathogénie d'une maladie. Le microdamier permet ainsi d'étudier simultanément l'expression de dizaines de milliers de gènes, reflétant la transcription de la quasi-totalité du génome à un instant donné (Kaminski et Friedman, 2002). On peut ainsi obtenir une signature transcriptomique de l'affection d'intérêt, une vue d'ensemble et la comparer à celle obtenue chez des individus sains ou atteints d'une autre pathologie. En effet, cette analyse des profils d'expression est toujours une analyse comparée, le niveau d'expression de chaque gène étant comparé à celui du même gène dans une autre condition (patient sain ou atteint d'une pathologie). On peut ainsi identifier toutes les anomalies liées à la présence de la maladie, celles qui sont communes à d'autres affections proches ou au contraire celles qui lui sont spécifiques. L'analyse de ces profils d'expression peut également permettre l'identification de molécules clés. L'autre avantage de cette technique est de travailler sans a priori, les gènes d'intérêt n'étant pas choisis à l'avance, ce qui favorise la découverte de voies ou de molécules impliquées dans une maladie et dont on n'anticipait pas l'existence. A l'inverse, les techniques de biologie moléculaire classiques (PCR, dosage protéique...) s'intéressent généralement à une molécule voir au maximum une voie dont on suspecte l'implication. Le processus de screening réalisé à l'aide d'un microdamier présente néanmoins certains désavantages directement liés au principe de travailler à grande échelle. On obtient en effet un volume extrêmement important de données, qu'il peut être difficile d'interpréter et de relier entre elles. Pour pallier à ce désavantage, de nombreux outils informatiques ont été développés afin de manipuler l'ensemble de ces données et d'en tirer le maximum d'informations pertinentes (Kaminski et Friedman, 2002). Par ailleurs, avec cette technique, on analyse simultanément l'expression d'un grand nombre de gènes à partir d'un nombre restreint d'échantillons. L'analyse statistique de ces données en est ainsi compliquée et des faux positifs et faux négatifs sont souvent observés.

L'analyse des profils d'expression génique dans les poumons atteints de FPI a permis de grandes avancées dans la compréhension de la pathogénie, et ce par deux approches.

Initialement, et même si l'analyse microdamier apporte des informations sur des milliers de gènes, la plupart des chercheurs ont préféré se focaliser sur un gène en particulier et en valider l'implication (Kaminski et Rosas, 2006). Dans cette approche, surnommée « cueillette de cerises », un ou quelques gènes sont sélectionnés parmi l'ensemble du profil sur la base de leur niveau d'expression (avec ou sans support statistique) et/ou de leur rôle biologique connu. La variation d'expression du gène identifiée par microdamier peut être validée tout d'abord par RT-PCR quantitative (qRT-PCR) (validation technique). La validation à l'échelle protéique permet de confirmer que le changement à l'échelle de l'ARNm a une répercussion sur la quantité de protéines présentes dans le tissu et peut permettre d'identifier les régions du poumon et les cellules exprimant la protéine. La validation biologique est ensuite très importante et permet de déterminer quelle est la fonction de la protéine, si elle est encore inconnue, et si cette fonction a un lien avec la fibrose in vivo et/ou in vitro. Enfin, on peut également rechercher une perturbation dans le gène associé à la présence de maladie (Kaminski et Rosas, 2006).

Figure 15 : Validation des modifications d'expression mises en évidence par microdamier pour les gènes d'intérêt, d'après (Kaminski et Rosas, 2006)



Dans la FPI chez l'homme, cette approche a notamment permis de mettre en évidence le rôle clé de certaines molécules comme la matrilysine (MMP7) (Cosgrove *et al.*, 2002; Zuo *et al.*, 2002), l'ostéopontine (Pardo *et al.*, 2005), FIZZ1 (Liu *et al.*, 2004), CCL7 (Choi *et al.*, 2004) ou WNT5A (Vuga *et al.*, 2009).

Une approche différente, qui exploite beaucoup plus largement le volume de données obtenues par l'analyse microdamier, est l'approche par système. Dans cette approche, la variation d'expression des différents gènes est combinée, par l'intermédiaire des différents logiciels, à l'ensemble des données connues pour ces gènes : processus cellulaire dans lesquels ils sont impliqués, facteurs de transcription, fonctions et localisations cellulaires des protéines correspondantes... Ces gènes sont ensuite associés pour former des groupes et ainsi identifier de grandes fonctions cellulaires altérées. Cette approche a notamment permis de changer la vision que les chercheurs avaient de la FPI. Il a d'abord été mis en évidence que des programmes différents régulaient la réaction inflammatoire et le processus de fibrose au sein des poumons (Kaminski *et al.*, 2000). A l'opposé de l'image des poumons atteints vu comme un organe en stade terminal et inerte, il a également été démontré que le poumon était biologiquement actif lors de FPI, avec une activation du catabolisme, une augmentation du métabolisme du glucose, de la synthèse protéique et de la matrice extracellulaire, une augmentation de l'expression des MMP et une activation de gènes impliqués dans la différenciation des muscles lisses et la contractilité musculaire (Zuo *et al.*, 2002; Kaminski et Rosas, 2006). Par la suite, l'analyse du profil d'expression a mis en avant le rôle de l'angiogenèse (Cosgrove *et al.*, 2004) ou de la réactivation des voies du développement (Selman *et al.*, 2008), a permis d'identifier les cibles du TGF $\beta$ 1 dans les fibroblastes pulmonaires (Renzoni *et al.*, 2004). L'utilisation d'un microdamier a également permis de mettre en évidence des différences dans les profils d'expression entre les formes familiales et sporadiques de pneumopathies interstitielles (Yang *et al.*, 2007a) et au sein de la FPI en fonction de la forme évolutive (Konishi *et al.*, 2009) ou du type cellulaire étudié (Kelly *et al.*, 2006).

Par ailleurs, comme discuté précédemment, la technologie du microdamier a permis l'identification de nouveaux biomarqueurs potentiels chez les patients atteints de FPI (Selman *et al.*, 2007; Konishi *et al.*, 2009).

En médecine vétérinaire, l'analyse des profils d'expression génique a été appliquée plus récemment à l'étude de la pathogénie de différentes affections, dont la cardiomyopathie dilatée (Oyama et Chittur, 2005; Oyama *et al.*, 2009), l'endocardiose mitrale (Oyama et Chittur, 2006; Zheng *et al.*, 2009), les rhinites chroniques (Vanherberghen *et al.*, 2012), l'hémangiosarcome (Tamburini *et al.*, 2010) ou l'ostéosarcome (O'donoghue *et al.*, 2010).

Nous avons donc appliqué cette technique du microdamier à du tissu pulmonaire provenant de chiens atteints de FPIc et de chiens sains afin d'obtenir le profil d'expression génique de la FPIc. L'ARN a ainsi été extrait du tissu pulmonaire obtenu chez 5 WHWT avec FPIc et 5 chiens contrôles. Les échantillons obtenus ont été poolés pour obtenir deux groupes, FPIc et contrôle, et analysés à l'aide d'un microdamier canin. Le niveau d'expression de chaque transcrite présent sur la puce (plus de 40 000 sondes/ puce) a ainsi été mesuré dans chaque groupe, l'ensemble des données obtenues constituant un profil d'expression. Les résultats ont ensuite été comparés entre les deux groupes pour identifier les transcrits avec un « fold change » de plus de 2, considérés comme exprimés différemment entre ces deux conditions. Ces données ont été interprétées par une approche globale incluant une approche par système et également une analyse plus ciblée de certains gènes d'intérêt. Cette « base de données » a été également exploitée pour sélectionner, parmi l'ensemble des gènes dont l'expression était modifiée dans la FPIc, ceux codant pour des protéines avec un potentiel de biomarqueur. Cette interprétation des données a été facilitée par l'utilisation du logiciel IPA.

Différentes fonctions biologiques altérées ont d'abord été identifiées par cette analyse dont la croissance et la prolifération cellulaires, le développement et le fonctionnement du système musculo-squelettique, le mouvement cellulaire, le développement cellulaire, le développement embryonnaire, la signalisation et les interactions intercellulaires et la présentation antigénique.

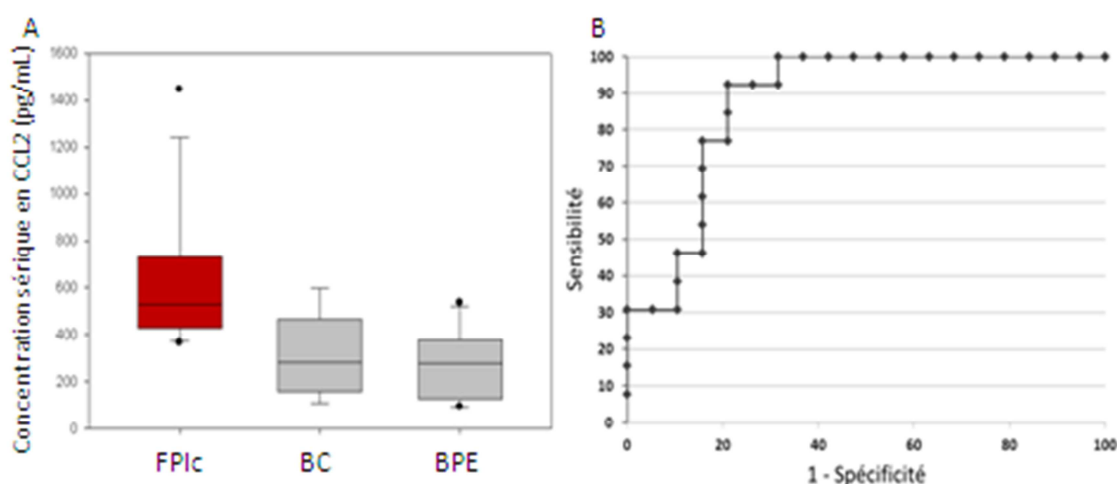
Nous avons ensuite décidé d'étudier plus spécifiquement certains gènes dont l'expression semblait altérée dans la FPIc avec 5 gènes surexprimés : CCL2, CCL7, CXCL14, IL8 et la « fibroblast activation protein » (FAP) et 5 gènes sous-exprimés : la protéine « palate, lung and nasal epithelium associated » (PLUNC), MMP1, MMP7, MMP8 et MMP9. Ces gènes ont été choisis sur base de leur « fold-change » d'expression, sur leur implication dans les différentes fonctions biologiques mises en avant précédemment et sur leurs rôles connus. Les MMP ont notamment été sélectionnées car l'analyse microdamier suggérait une régulation négative de leur expression, résultat en contradiction avec les données obtenues précédemment chez l'homme dans le sang ou le LLBA. L'analyse par qRT-PCR a confirmé les résultats de l'analyse par microdamier pour tous les gènes pour lesquels une régulation positive de l'expression était notée (CCL2, CCL7, CXCL14, IL8 et FAP) ainsi que pour la PLUNC. A l'inverse, la régulation négative des différentes MMP a été infirmée par l'analyse par qRT-PCR. Il est à noter que bien que les transcrits des MMP étaient considérés comme « présents » dans les deux groupes lors de l'analyse du microdamier, l'intensité pour ces sondes était très faible, ce qui rendait la comparaison nettement moins fiable. Ces résultats reflètent la limitation des microdamiers et la nécessité de confirmer individuellement les résultats obtenus, en particulier pour les transcrits avec un signal faible.

Nous avons ensuite complété l'analyse des profils d'expression par une recherche de biomarqueurs potentiels. La liste des gènes et leur « fold change » a ainsi été filtrée par l'intermédiaire du logiciel IPA Biomarker Analysis pour isoler les gènes avec un potentiel de biomarqueurs. Des critères arbitraires ont été utilisés: fold change minimum de 2, gène connu pour

être exprimé au niveau pulmonaire et détection probable de la protéine correspondante dans le sang et/ ou le LLBA. Trente-quatre biomarqueurs potentiels ont ainsi pu être identifiés dont 32 pourraient être mesurables dans le sang (dont CCL2, l'amyloïde sérique 1, l'IL8) et 2 uniquement dans le LLBA (PLUNC et mésothéline). La validité de cette approche a été confirmée par la mesure dans le sérum de l'un de ces biomarqueurs : le CCL2. Nous avons choisi le CCL2 pour plusieurs raisons. Son gène était nettement surexprimé chez les chiens atteints de FPIc, résultat suggéré par l'analyse microdamier et confirmé par qRT-PCR. Le CCL2 était potentiellement mesurable dans le sérum et le LLBA et un kit de dosage était disponible pour l'espèce canine. Par ailleurs, l'intérêt du CCL2 en tant que biomarqueur avait déjà été confirmé chez le chien dans différentes pathologies (Perry *et al.*, 2011; O'Neill *et al.*, 2012; Ishioka *et al.*, 2013). Une concentration sérique plus élevée a ainsi été retrouvée chez les chiens atteints de FPIc en comparaison de chiens sains. Depuis la publication de cet article, ces résultats ont été complétés en incluant des chiens atteints d'autres affections respiratoires chroniques. Nous avons ainsi mis en évidence que la concentration sérique en CCL2 chez les chiens atteints de FPIc était plus élevée que chez ceux atteints de bronchite chronique (277.7pg/mL; 137.3-364.7) ( $p=0.003$ ) ou de bronchopneumopathie éosinophilique (281.6; 163.9-416.5) ( $p=0.009$ ). Les performances de CCL2 en tant que biomarqueur diagnostique ont ensuite été évaluées par l'analyse de la courbe ROC. Ainsi, au-delà de la valeur seuil de 385 pg/mL, une FPIc était diagnostiquée avec une sensibilité de 92% et une spécificité de 80 % ; indiquant que le CCL2 pourrait avoir un intérêt comme biomarqueur diagnostique de FPIc. Son intérêt en tant que biomarqueur pronostique reste par contre encore à évaluer.

Figure 16A : Concentration sérique en CCL2 chez des chiens atteints de fibrose pulmonaire idiopathique canine (FPIc, n=13), des chiens atteints de bronchite chronique (BC, n=10) et des chiens atteints de bronchopneumopathie éosinophilique (BPE, n=9). Les résultats sont présentés sous la forme de box plot.

Figure 16B : Courbe ROC : performance du test à différencier une FPIc d'une BC ou d'une BPE en fonction du seuil choisi pour la concentration sérique en CCL2



L'une des principales limites de cette étude était l'utilisation d'échantillons « poolés » pour l'analyse microdamier. Le « pooling » a certains avantages car il renforce le signal pour les transcrits faiblement exprimés, il diminue la variabilité biologique et réduit les frais, une seule puce étant utilisée pour chaque groupe. Toutefois, en cas de « pooling », les résultats de l'expression

d'un gène spécifique peuvent être fortement influencés par des « outliers », ce qui majore le risque de faux positifs mais également de faux négatifs. De plus, étant donné que l'on compare un résultat à un autre et non pas deux groupes, seule la valeur du fold-change peut être utilisée pour identifier les gènes sur ou sous exprimés. Or une différence importante peut être observée entre les deux résultats sans que cette différence soit significative, notamment si la variation au sein des groupes est importante. A l'inverse, pour certains gènes, on peut avoir une faible différence (inférieure au seuil choisi) mais qui soit malgré tout significative. L'interprétation des résultats est donc moins fiable en l'absence de test statistique, ce qui renforce la nécessité d'une validation par qRT-PCR.



## Analysis of gene expression in canine idiopathic pulmonary fibrosis <sup>☆</sup>



E. Krafft <sup>a,\*</sup>, H.P. Laurila <sup>b</sup>, I.R. Peters <sup>c</sup>, F. Bureau <sup>d</sup>, D. Peeters <sup>a</sup>, M.J. Day <sup>e</sup>, M.M. Rajamäki <sup>b</sup>, C. Clercx <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Boulevard de Colonster 20, 4000 Liège, Belgium

<sup>b</sup> Department of Equine and Small Animal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Finland Veterinary Teaching Hospital, Viikintie 49, 00014 University of Helsinki, Finland

<sup>c</sup> TDDS, The Innovation Centre, University of Exeter, Rennes Drive, Exeter EX4 4RN, UK

<sup>d</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Boulevard de Colonster 20, 4000 Liège, Belgium

<sup>e</sup> School of Veterinary Sciences, University of Bristol, Langford House, Langford, Bristol BS40 5DU, UK

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Accepted 17 August 2013

#### Keywords:

Canine  
Idiopathic pulmonary fibrosis  
Microarray analysis  
Gene expression  
Chemokine ligand 2

### ABSTRACT

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) in dogs is a rare disease of unknown aetiology, seen in terrier breeds, particularly the West Highland white terrier (WHWT). The aim of this study was to determine pulmonary gene expression in canine IPF in order to gain insights into the pathogenesis of the disease and to identify possible biomarkers. Microarray analyses were conducted to determine gene expression profiles in the lungs of dogs with IPF and control dogs of various breeds. More than 700 genes were identified as having greater than two-fold difference in expression between the two groups. The significant biological functions associated with these genes were related to cellular growth and proliferation, developmental processes, cellular movement, cell to cell signalling and interaction, and antigen presentation. Altered levels of expression were confirmed by quantitative reverse transcriptase PCR for genes encoding chemokine (C–C) ligand (CCL) 2 (+4.9 times), CCL7 (+6.8 times), interleukin 8 (+4.32 times), chemokine (C–X–C) ligand 14 (+3.4 times), fibroblast activation protein (+4.7 times) and the palate, lung and nasal associated protein (PLUNC, –25 times). Serum CCL2 concentrations were significantly higher in WHWTs with IPF (mean 628.1 pg/mL, interquartile range 460.3–652.7 pg/mL) than unaffected WHWTs (mean 344.0 pg/mL, interquartile range 254.5–415.5 pg/mL;  $P = 0.001$ ). The results support CCL2 as a candidate biomarker for IPF in dogs.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### Introduction

Canine idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is an interstitial pulmonary disease characterised by progressive fibrosis, leading to end-stage lung disease. The condition is mainly recognised in middle-aged to older terriers, especially the West Highland white terrier (WHWT). Affected dogs generally have a history of progressive dyspnoea and exercise intolerance, with or without coughing (Corcoran et al., 1999; Heikkilä et al., 2011). Differentiating IPF from other chronic respiratory diseases is challenging and the definitive diagnosis ultimately relies on histopathology, although thoracic high resolution computed tomography (HRCT) has high specificity (Johnson et al., 2005). Endothelin-1 has good sensitivity and moderate specificity as a serum biomarker (Krafft et al., 2011),

but a combination of biomarkers is likely to be more reliable for diagnosing IPF in dogs.

The mechanisms underlying the development of human IPF remain unknown (Coward et al., 2010; Maher, 2012). However, insights into the pathogenesis of IPF have been gained from gene expression analysis of affected pulmonary tissue (Kaminski et al., 2000; Zuo et al., 2002; Kaminski, 2003; Kaminski and Rosas, 2006; Kelly et al., 2006; Studer and Kaminski, 2007). Tissue-wide gene expression analysis using microarrays is a powerful tool to study disease pathways. Bioinformatic tools, such as Ingenuity pathway analysis (IPA), help to analyse these gene expression changes by grouping relevant genes into biological functions or by filtering genes encoding potential biomarkers (Kaminski and Friedman, 2002; Sterling and Danail, 2010).

The aim of the present study was to examine pulmonary gene expression in canine IPF by microarray analysis in an attempt to gain new insights into the pathogenesis of the disease. We hypothesised that there would be differences in gene expression profiles between dogs with IPF and unaffected canine lungs, that genes previously reported as being differentially expressed in the lungs of human beings with IPF would have similar patterns of expression

<sup>☆</sup> Preliminary results were presented at the 22nd Congress of the European College of Veterinary Internal Medicine – Companion Animals (ECVIM-CA), Maastricht, The Netherlands, 6–8 September 2012, and the 29th American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM) Forum, Denver, Colorado, USA, 15–18 June 2011.

\* Corresponding author. Tel.: +32 4 2427515.

E-mail address: [e.krafft@ulg.ac.be](mailto:e.krafft@ulg.ac.be) (E. Krafft).

in canine IPF and that the gene expression profile would include genes encoding proteins with biomarker potential. To validate this approach for identifying candidate biomarkers, the serum concentration of one protein was measured in dogs with IPF and unaffected dogs.

## Materials and methods

### Sources of samples

Lung samples from 12 dogs with IPF and 14 control dogs of various breeds were included in this study. Dogs with IPF included WHWTs ( $n = 10$ ; 4 females, 6 males), and two dogs from other terrier breeds (1 male Scottish terrier and 1 male Lhasa Apso), with a median age of 12 years (range 11–15 years). IPF was diagnosed according to Norris et al. (2005), Heikkilä et al. (2011) and Syrjä et al. (2013). Control dogs (6 females, 8 males) included Beagles ( $n = 3$ ), Dachshunds ( $n = 2$ ), mixed breed dogs ( $n = 3$ ) and one each of Jack Russell, Yorkshire, Border collie, Belgian shepherd, Newfoundland and Leonberg breeds, with a median age of 6.5 years (range 0.2–14 years). None of these animals had a clinical history or signs of lower respiratory disease and there were no abnormalities of the respiratory system on thoracic radiographs, postmortem examination and histopathology. The reasons for euthanasia in this group of dogs were aggressiveness (3 dogs), nasal tumour (2 dogs), hepatic carcinoma, mammary tumour, intervertebral disc disease, vertebral fracture, degenerative myelopathy, perianal fistula, urinary incontinence and urinary bladder stones (1 dog each); samples were also obtained from one experimental healthy Beagle dog euthanased in a separate study (study protocol approved by the Committee of Experimental Animals of the University of Liège, Belgium, permit number 763, date of approval 13 March 2008).

Serum samples from 10 WHWTs with IPF (3 females, 7 males; median age 11.2 years, range 8–14 years) and 10 healthy age- and breed-matched unaffected (control) dogs (7 females, 3 males; median age 9.6 years, range 3–14 years) were used for chemokine (C–C) ligand 2 (CCL2) serum determination. Diagnosis of IPF was confirmed by HRCT (4 dogs), histopathology (2 dogs) or both (4 dogs). Health status was confirmed on the basis of absence of clinical signs and on the results of clinical examinations, as well as blood gas analysis (10 dogs) and bronchoscopy, bronchoalveolar fluid (BALF) analysis and HRCT (8 dogs). The protocol was approved by the Committee of Experimental Animals of the University of Helsinki, Finland (permit number ESLH-2008-05403, date of approval 27 June 2008).

### Collection and processing of lung tissue

Lung samples were obtained within 30 min of euthanasia. In all dogs with IPF, multiple samples were collected from macroscopically abnormal tissue from at least two separate lung lobes. In control dogs, at least two lung samples adjacent to each other were collected. Samples for RNA extraction were either placed in a 1.5 mL cryotube (CM Labs), frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  ( $n = 3$ ) or transferred into in a cryotube containing RNAlater (Ambio), held at  $4^{\circ}\text{C}$  for up to 24 h and then frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further processing ( $n = 23$ ). Samples for histopathological examination were fixed in 10% neutral buffered formalin. Since the lesion distribution is heterogeneous in IPF, samples for RNA extraction and for histopathology were collected from adjacent areas to ensure that microarray analysis would be performed on lesional tissue.

### Detection of levels of gene expression by microarray analysis

#### RNA extraction and quality assessment

Total RNA was isolated from lung samples using the Micro to Mini Total RNA Extraction Kit (Invitrogen). Tissue (~20 mg) was added to a 2 mL Safe-Lock micro-centrifuge tube (Eppendorf) containing 350  $\mu\text{L}$  lysis buffer (Invitrogen), 3.5  $\mu\text{L}$   $\beta$ -mercaptoethanol and a 5 mm stainless steel bead (Qiagen). Samples were disrupted using a Tissue Lyser (Qiagen) by shaking the tube at 30 cycles/s for 1 min. The resulting lysate was centrifuged at 14,000  $g$  for 3 min and the supernatant was processed according to the manufacturer's protocol. The RNA was eluted with 40  $\mu\text{L}$  nuclease-free water. DNase digestion of the RNA solution was carried out using RQ1 RNase-free DNase (Promega). RNA was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

RNA concentration and quality were measured for each sample by spectrophotometry (NanoDrop 1000, Thermo Scientific). RNA samples with a 260 nm:280 nm ratio of 1.8–2.2 and a 260 nm:230 nm ratio of 1.8–2.0 were considered to be suitable for quantitative reverse transcriptase-PCR (qRT-PCR). RNA quality and integrity were further assessed by automated gel electrophoresis (Experion, Bio-Rad). Samples with no or minimal loss of integrity (RNA integrity number  $\geq 7$ ) were deemed to be suitable and were used in microarray experiments.

#### Microarray analysis

Aliquots of RNA (4 ng) from five dogs in each group (5 WHWTs with IPF; 2 females, 3 males, median age 12 years; 5 healthy controls; 2 Beagles, 1 Jack Russell terrier, 1 Yorkshire terrier and 1 Dachshund, all males, median age 4 years) were pooled in equal proportion to form two experimental sets. Gene expression was

analysed via hybridisation to the Affymetrix GeneChip Canine Genome 2.0 Array using the one cycle amplification protocol according to the manufacturer's instructions.<sup>1</sup> This canine specific microarray is a second generation oligonucleotide-based single colour array that assesses the expression of 42,869 probe sets, representing >38,000 canine genes (Oyama and Chittur, 2005). The remainder of the RNA from each dog was used for qRT-PCR.

#### Data analysis

Data were obtained with the high-density Affymetrix GeneChip Scanner 3000. The Affymetrix call detection algorithm was used to assess which probe sets were reliably detected above background on each array. To qualify for further analysis, a transcript had to be evident in IPF or in control tissues, with a probe signal intensity greater than two times the background intensity. Differential expression of transcripts between IPF and control tissues was determined by comparing probe signal intensities using a cut-off of a two-fold change in expression for transcripts that were present in both conditions. Transcripts meeting these criteria were defined as being differentially expressed between the two groups. Transcripts with a negative fold change were down-regulated, whereas transcripts with a positive fold change were up-regulated in IPF tissues compared with control tissues. Transcript identity was achieved with the annotations provided by the chip manufacturer. Unnamed genes and redundant probe sets were excluded from the list.

#### Ingenuity pathway analysis

Data obtained with the microarray experiment were evaluated by Ingenuity pathway analysis<sup>2</sup> (Kaminski and Friedman, 2002; Sterling and Danail, 2010). Genes from the data set that met the expression value cut-off value of 2 and that were associated with biological functions in Ingenuity's knowledge base were considered for the analysis. A right-tailed Fisher's exact test, was used to calculate a  $P$  value determining the probability that each biological function assigned to the data set was due to chance alone; significance was designated at  $P < 0.05$  with Benjamini–Hochberg multiple testing correction.

IPA Biomarker<sup>3</sup> was used to extract candidate genes on the basis of biological characteristics most relevant to this study. Filters chosen for this study were: (1) there must be at least a two-fold difference in expression of the gene between IPF and control lung tissues; (2) the gene should be known to be expressed in the lungs; and (3) the corresponding protein should be detectable in the blood and/or in BALF.

#### Detection of levels of gene expression by quantitative reverse transcriptase PCR

Ten genes were selected for qRT-PCR analysis on the basis of their fold changes in gene expression and their potential role in immunological processes and/or fibrosis and/or potential interest as biomarkers: interleukin 8 (IL8), CCL2, CCL7, chemokine (C–X–C) ligand 14 (CXCL14), fibroblast activation protein  $\alpha$  (FAP), palate, lung and nasal associated (PLUNC) protein, matrix metalloproteinase (MMP) 1, MMP7, MMP8 and MMP9. mRNA samples from all dogs with IPF ( $n = 12$ ) and all control dogs ( $n = 14$ ) were used for the qRT-PCR experiments. Negative qRT-PCR with the use of RLP13a primers ensured no genomic contamination of the isolated RNA. TBP and RPS18 were used as non-regulated reference genes for normalisation of gene expression (Peters et al., 2007).

The primer and probe sequences were the same as described previously for IL8, CCL2, CCL7, ribosomal protein L13a (RPL13a), ribosomal protein S18 (RPS18) and TATA box binding protein (TBP) (Peeters et al., 2006, 2007) and were designed using GenBank sequences for CXCL14 (XM\_847477), FAP (XM\_845112.1), PLUNC (XM\_847348), MMP1 (XM\_546546), MMP7 (NM\_001242726), MMP8 (XM\_546547) and MMP9 (NM\_001003219) (Peeters et al., 2005) (Table 1).

Quantitative RT-PCR was carried out in a two tubes-two enzymes format using a combination of a reverse transcriptase (ImProm-II Reverse Transcription System, Promega) and Hot-Start Taq Master Mix (Qiagen) (Peters et al., 2004). Relative quantification was performed using the  $\Delta\text{C}_t$  method (Livak and Schmittgen, 2001). Mean relative qRT-PCR expression was compared with the Mann–Whitney  $U$  test using SigmaStat (Systat Software). The level of significance was set at  $P < 0.05$ .

#### Measurement of serum CCL2

Blood samples collected in plain tubes were allowed to clot at room for 30 min and then centrifuged at  $4^{\circ}\text{C}$  for 15 min at 3000  $g$  and the serum was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . CCL2 analysis was performed with a canine sandwich ELISA kit (Canine CCL2/MCP-1 Quantikine, R&D Systems). Data in the two groups were compared

<sup>1</sup> See: [http://media.affymetrix.com/support/downloads/manuals/expression\\_analysis\\_technical\\_manual.pdf](http://media.affymetrix.com/support/downloads/manuals/expression_analysis_technical_manual.pdf) (accessed 13 August 2013).

<sup>2</sup> See: [http://www.ingenuity.com/products/pathways\\_analysis.html](http://www.ingenuity.com/products/pathways_analysis.html) (accessed 13 August 2013).

<sup>3</sup> See: <http://www.ingenuity.com/products/ipa/biomarker-filter> (accessed 13 August 2013).

**Table 1**

Primers and probe sequences used for quantitative reverse transcriptase-PCR.

Primer set	Product size (base pairs)	Forward primer (5'–3')	Reverse primer (5'–3')	Probe sequence (5'–3')
CXCL14	88	CGACGTGAAGAAGCTGGAA	GTACCTGGACACGCTCTTGG	TCGCAGTGCCGGTACTTTGGC
FAP	129	TGGGTGTTTATGAAGTTGAGGA	CAAGGGCCAGTGATGAAAC	TGGGGCTGGTCTATGGAGGC
PLUNC	138	TGGTAAAGCTGGCTGTGAAG	CAAATCCATTAAGCAGGGAGA	CACTCCCTGGGAGCCTGCA
MMP1	131	ACCTTCCAAAATCTGTCC	CGGCGATGTAGAACCTGTC	AGCCAACAGGCCCAAAACC
MMP7	140	GGGAGAACACACTTCCATTCA	CTCTTTGGGACAGCAAGACA	CATTCTCCCCATGCCGTGG
MMP8	94	TTACCCAAAAGCATAGCAAG	TCCGCTGAAGAAAAGGAAGA	TGCTGGAAAAGTGCATCAACTGTGC
MMP9	150	GCCGACATCATTCAGTTT	GCCAGAGTCCATAACTCCTC	TGGGGCTCTCCCTGAATGCC

5' Fluorophore: 6-carboxy-fluorescein (FAM); 3' Quencher: Black hole quencher 1 (BHQ1).  
Oligonucleotides were synthesised by Eurogentech.

**Table 2**

Selected over- and under-expressed genes in canine idiopathic pulmonary fibrosis vs. controls.

Probe identification	Gene symbol	Fold-change	Gene name
Cfa.16337.1.S1_s_at	CCL7	6.8	Chemokine (C–C motif) ligand 7
Cfa.16041.1.S1_at	ANKRD1	6.1	Ankyrin repeat domain 1
Cfa.3745.1.S1_s_at	HTR2B	5.2	5-Hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B
CfaAffx.16581.1.S1_at	ELF3	5.1	E74-like factor 3 (ets domain transcription factor, epithelial-specific)
CfaAffx.11223.1.S1_s_at	SLC1A2	5.0	Solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2
Cfa.3851.1.S1_s_at	CCL2	4.9	Chemokine (C–C motif) ligand 2
CfaAffx.16274.1.S1_at	FAP	4.7	Fibroblast activation protein, $\alpha$
CfaAffx.29216.1.S1_at	HMGCB3	4.5	High-mobility group box 3
Cfa.3173.2.A1_at	SAA1	4.4	Serum amyloid A1
Cfa.3510.1.S1_s_at	IL8	4.3	Interleukin 8
CfaAffx.19822.1.S1_at	MUC20	4.3	Mucin 20, cell surface associated
Cfa.15713.1.A1_s_at	MARCO	4.0	Macrophage receptor with collagenous structure
CfaAffx.23602.1.S1_s_at	GLDN	3.9	Gliomedin
CfaAffx.2003.1.S1_at	TRHR	3.9	Thyrotropin-releasing hormone receptor
CfaAffx.15427.1.S1_at	PRMT3	3.8	Protein arginine methyltransferase 3
CfaAffx.1882.1.S1_s_at	HSP70	3.8	Heat shock protein 70
CfaAffx.6312.1.S1_at	LOC612714	3.7	Similar to Complement C5 precursor
CfaAffx.19116.1.S1_at	ANXA9	3.7	Annexin A9
Cfa.12375.1.A1_at	FKBP5	3.6	FK506 binding protein 5
Cfa.7839.1.S1_at	KRT8	3.6	Keratin 8
Cfa.21149.1.S1_at	CXCL14	3.4	Chemokine (C–X–C motif) ligand 14
CfaAffx.360.1.S1_s_at	ADAMDEC1	3.3	ADAM-like, decysin 1
CfaAffx.28187.1.S1_at	ITGA2	3.2	Integrin, $\alpha$ 2 (CD49B, $\alpha$ 2 subunit of VLA-2 receptor)
CfaAffx.23498.1.S1_at	FGFBP1	3.0	Fibroblast growth factor binding protein 1
Cfa.182.1.S2_at	DLA-DQA1	2.7	Major histocompatibility complex, class II, DQ $\alpha$ 1
CfaAffx.6329.1.S1_s_at	C5	2.6	Complement component 5
Cfa.280.1.S1_at	dIa88	–462.4	MHC class I DLA-88
CfaAffx.11921.1.S1_s_at	PLUNC	–25.0	Palate, lung and nasal epithelium associated
CfaAffx.23201.1.S1_at	MMP7	–17.6	Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)
Cfa.6128.1.A1_at	SLPI	–13.7	Secretory leukocyte peptidase inhibitor
Cfa.19619.1.A1_at	FBN2	–11.3	Fibrillin 2
Cfa.21324.1.S1_at	PIP	–8.1	Prolactin-induced protein
CfaAffx.26848.1.S1_at	MYH2	–5.2	Myosin, heavy chain 2, skeletal muscle, adult
Cfa.1262.1.S2_at	COL1A2	–3.3	Collagen, type 1, $\alpha$ 2
Cfa.100.1.S1_at	COL1A1	–2.2	Collagen, type 1, $\alpha$ 1
Cfa.6009.2.A1_at	FBLN1	–2.0	Fibulin 1

with a Student's *t* test when the data were normally distributed (age) or with a Mann–Whitney *U* test (serum CCL2 concentration) using SigmaStat. The level of significance was set at  $P < 0.05$ .

## Results

### Microarray analysis

The data set supporting the results of this article is available in MIAME-compliant format in the ArrayExpress repository.<sup>4</sup> A total of 798 probe sets fulfilled the criteria for differential expression between lung tissues from the IPF and control groups. Of these transcripts, 249 were up-regulated, whilst 549 were down-regulated;

246 transcripts were gene sequences that have not been annotated in dogs or pseudogenes and therefore were not investigated further. The remaining 553 sequences represented genes encoding identified proteins and were summarised on the basis of their known functions. Selected up-regulated and down-regulated genes are listed in Table 2.

### Functional analysis and selection of potential biomarkers

The enriched functional gene groups for affected lungs compared to control lungs are presented in Table 3. Thirty-four genes met the criteria for biomarker selection (Table 4); 32 gene products should be measurable in blood, while two proteins (mesothelin and PLUNC) have only been described in BALF (Bartlett et al., 2011).

<sup>4</sup> See: <http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-MEXP-3671/> (accessed 9 October 2013).



**Table 3**

Enriched functional gene classes in the differential expression profile of canine idiopathic pulmonary fibrosis.

Function annotation	Number of genes	Benjamini–Hochberg <i>P</i> value
Cellular growth and proliferation	216	0.000719
Skeletal and muscular system development and function	48	0.000719
Cellular movement	147	0.000784
Cellular development	79	0.027
Embryonic development	28	0.027
Cell-to-cell signalling and interaction	136	0.027
Antigen presentation	45	0.0271

#### Quantitative reverse transcriptase PCR

qRT-PCR confirmed the direction of change in expression for most of the selected genes; dogs with IPF had a significant increase in expression of genes encoding CCL2, CCL7, CXCL14, IL8 and FAP relative to control dogs, and a significant decrease in expression of PLUNC (Fig. 1). There was no significant difference in expression of genes encoding for MMP1, MMP7, MMP8 or MMP9 (Fig. 2).

#### Serum CCL2

There was no significant difference in age between IPF affected and control WHWTs ( $P = 0.134$ ). Serum levels of CCL2 were significantly higher in WHWTs with IPF (mean 628.1 pg/mL, interquartile range, IQR, 460.3–652.7 pg/mL) compared to unaffected WHWTs (mean 344.0 pg/mL, IQR 254.5–415.5;  $P = 0.001$ ; Fig. 3).

## Discussion

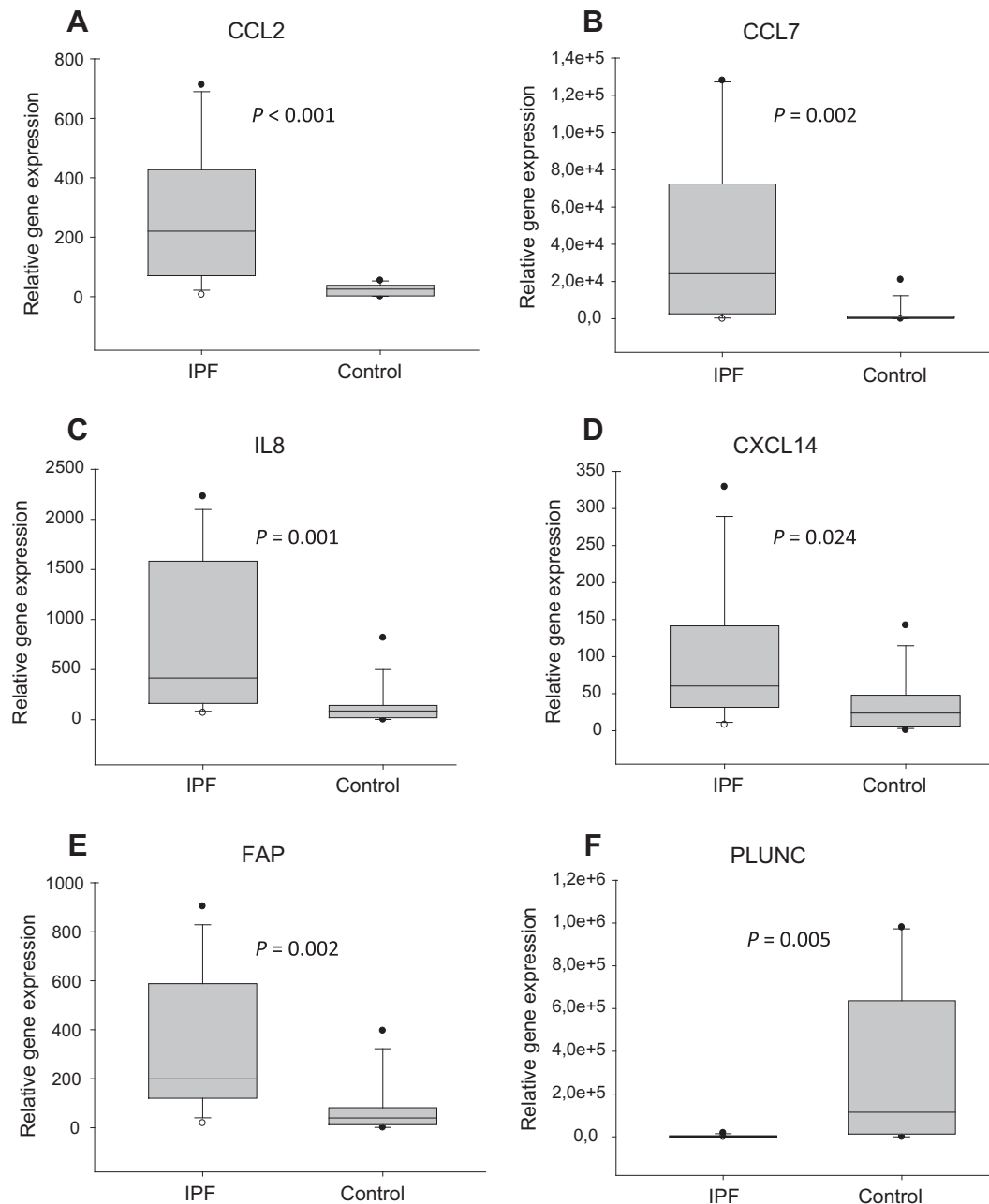
Repetitive alveolar epithelial cell injury and dysregulated repair, with sustained proliferation of fibroblasts and deposition of collagen, are suspected to be the main pathological processes in human IPF (Wilson and Wynn, 2009; Coward et al., 2010). Removal of fibroblasts might be delayed because fibroblasts proliferate excessively and are resistant to apoptosis (Maeyama et al., 2001; Moodley et al., 2003a,b, 2004; Buhling et al., 2005). Conversely, alveolar epithelial cells seem to undergo excessive apoptosis, leading to defective repair of damaged alveolar epithelium. Analysis of our data set supports the hypothesis that dysregulation of cell growth, proliferation and apoptosis are features of canine IPF. Human IPF is associated with an aberrant immune response and chronic inflammation (Strieter, 2008).

In the present study, microarray analysis highlighted functional categories related to inflammation and immune responses, and demonstrated up-regulation of numerous inflammatory cytokines, including CCL2, CCL7, CCL17, IL8 and CXCL14, along with  $\alpha 3$  actinin and serum amyloid A1, in dogs with IPF, similar to findings in human IPF (Carre et al., 1991; Antoniadis et al., 1992; Sekiya et al., 2000; Kurth et al., 2001; Starnes et al., 2006). Increased expression of CCL2, CCL7, IL8 and CXCL14 was confirmed by qRT-PCR and increased circulating levels of CCL2 were found in affected dogs in comparison with healthy dogs of the same breed. In addition to their inflammatory properties, some of these cytokines, such as CXCL14 (Augsten et al., 2009) and CCL2 (Gharaee-Kermani et al., 1996), also have profibrotic properties. CCL2 is a major monocyte chemoattractant, but also a potent chemoattractant for T cells, immature dendritic cells and fibrocytes (Datta et al., 2011). It promotes fibrosis, by inducing expression of transforming

**Table 4**

Biomarker candidates in canine idiopathic pulmonary fibrosis.

Symbol	Entrez gene name	Fold change
CCL2	Chemokine (C–C motif) ligand 2	4.9
SAA1	Serum amyloid A1	4.4
IL8	Interleukin 8	3.1
KRT8	Keratin 8	3.5
CD163	CD163 molecule	3.1
LAMP3	Lysosomal-associated membrane protein 3	2.7
SFTPD	Surfactant protein D	2.6
MSLN	Mesothelin	2.5
KRT18	Keratin 18	2.5
CYP1B1	Cytochrome P450, family 1, sub-family B, polypeptide 1	2.4
GALNT3	UDP-N-acetyl- $\alpha$ -D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3 (GalNAc-T3)	2.4
FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	2.4
UCHL1	Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (ubiquitin thiolesterase)	2.2
VWF	von Willebrand's factor	2.2
ECM1	Extracellular matrix protein 1	2.1
FGF9	Fibroblast growth factor 9 (glia-activating factor)	2.0
PLUNC	Palate, lung and nasal epithelium associated	–25.0
MMP7	Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)	–17.6
HP	Haptoglobin	–4.1
MBP	Myelin basic protein	–4.1
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor	–4.0
PDGFB	Platelet-derived growth factor $\beta$ polypeptide (simian sarcoma viral (v-sis) oncogene homolog)	–3.8
PGLYRP1	Peptidoglycan recognition protein 1	–3.5
MMP9	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92 kDa gelatinase, 92 kDa type IV collagenase)	–3.4
LCN2	Lipocalin 2	–3.2
RBP1	Retinol binding protein 1, cellular	–3.1
CA2	Carbonic anhydrase II	–2.7
ACE	Angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 1	–2.7
CDH5	Cadherin 5, type 2 (vascular endothelium)	–2.6
ABCC1	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1	–2.4
PTGES	Prostaglandin E synthase	–2.4
FGF1	Fibroblast growth factor 1 (acidic)	–2.3
CAMP	Cathelicidin antimicrobial peptide	–2.2
HPGD	Hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD)	–2.0



**Fig. 1.** Box plots of relative gene expression levels of cytokines in West Highland white terriers (WHWT) with canine idiopathic pulmonary fibrosis vs. controls. Gene expression levels of (A) CCL2, (B) CCL7, (C) interleukin 8, (D) CXCL14, (E) fibroblast activation protein  $\alpha$  (FAP) and (F) PLUNC were measured by real-time quantitative reverse transcriptase-PCR. The lower, middle and upper lines of each box represent the 1st, 2nd and 3rd quartiles, respectively. The whiskers, where present, delineate the 10th and 90th percentiles. Dots, where present, show the maximum and minimum values.

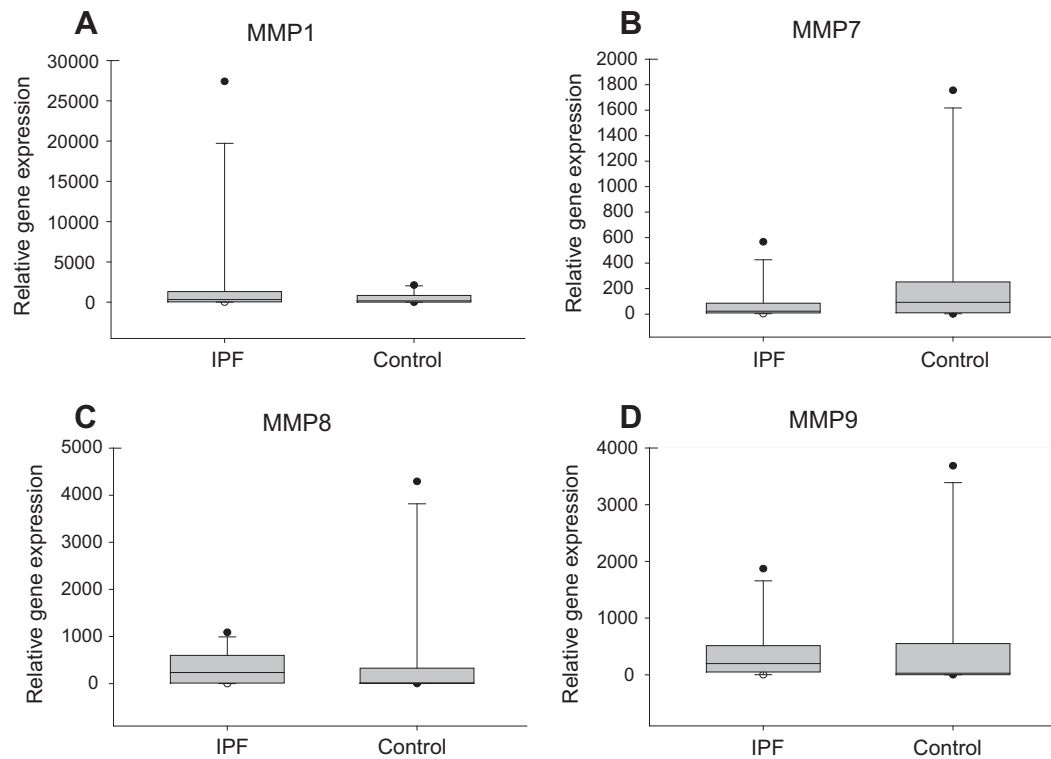
growth factor  $\beta$ 1 and collagen by fibroblasts (Gharaee-Kermani et al., 1996).

Microarray analysis highlighted PLUNC as one of the most down-regulated genes and this result was confirmed by qRT-PCR. Its exact role is unknown, but PLUNC might be involved in the inflammatory response to irritants and in innate immunity (Gakhar et al., 2010; Bartlett et al., 2011).

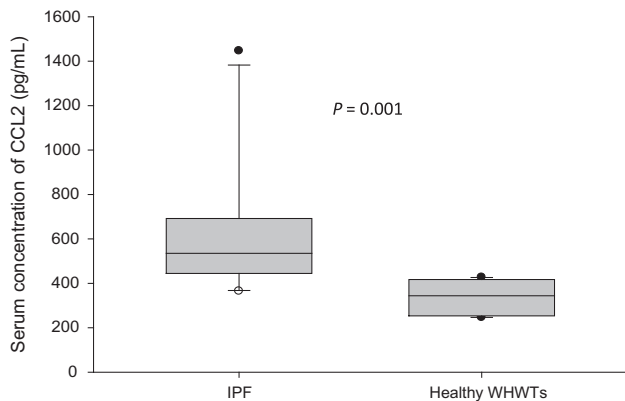
The role of MMPs in tissue remodelling and repair is not limited to degradation of extracellular matrix components, but also includes activation of cytokines and growth factors. MMP1, 7 and 3 have been implicated in the pathogenesis of human IPF (Pardo and Selman, 2006; Yamashita et al., 2011). In contrast with findings in humans, where MMP1 and 7 were up-regulated in affected lungs compared to control lungs (Zuo et al., 2002; Rosas et al.,

2008), our microarray analysis suggested that down-regulation of MMPs occurred in the lungs of dogs with IPF in comparison with control dogs. However, the probe signal intensities were low, making the comparison less reliable, and the results for MMP1, MMP7, MMP8 and MMP9 were not confirmed by qRT-PCR.

Some of the most significantly altered biological functions in our data set were associated with developmental pathways. In human IPF, aberrant activation of developmental programmes has been proposed (Selman et al., 2008). Our results also suggest that genes involved in morphogenesis and differentiation are important in canine IPF. Among these genes, qRT-PCR confirmed increased expression of FAP, which is expressed at sites of tissue remodelling during embryonic development (Niedermeyer et al., 2001; Acharya et al., 2006). FAP is selectively expressed by a subset of fibroblasts



**Fig. 2.** Box plots of relative gene expression levels of matrix metalloproteinases (MMPs) in West Highland white terriers (WHWT) with canine idiopathic pulmonary fibrosis vs. controls (no significant difference). Gene expression levels of (A) MMP1, (B) MMP7, (C) MMP8 and (D) MMP9 were measured by real-time quantitative reverse transcriptase-PCR.



**Fig. 3.** Box plots of serum CCL2 concentrations in West Highland white terriers (WHWT) with canine idiopathic pulmonary fibrosis (IPF,  $n = 10$ ) and in healthy WHWTs ( $n = 10$ ).

in areas of ongoing tissue injury in the lungs in human IPF and may be useful as a marker of disease activity (Acharya et al., 2006).

Several studies have attempted to identify diagnostic and predictive biomarkers in human IPF (Prasse and Müller-Quernheim, 2009; Richards et al., 2012; Vij and Noth, 2012; Song et al., 2013); some of these potential biomarkers have been identified using microarray technology (Selman et al., 2007; Konishi et al., 2009). Those studies have shown that changes in blood proteins, such as Krebs von den lungen 6 antigen (KL6), surfactant protein A (SPA), MMP7, CCL2, CCL18 and IL8, are diagnostic and prognostic for IPF. MMP-7, intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, IL8, vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 and S100A12 have prognostic value in patients with IPF (Richards et al., 2012).

By filtering the results obtained through microarray analysis, we identified 34 molecules that represent candidates for further

studies. Increased levels of expression of CCL2, CCL7 and IL8 were confirmed by qRT-PCR in the lungs of dogs with IPF compared to unaffected dogs. We focussed on CCL2 because of its high fold change by microarray analysis, the confirmation of increased expression by qRT-PCR, because CCL2 is detectable in both serum and BALF, and because a specific canine assay for CCL2 is available. Levels of CCL2 were higher in the serum of WHWTs with IPF than in healthy WHWTs, supporting the potential value of CCL2 as a biomarker in canine IPF. Other genes, such as FAP, not highlighted by the IPA biomarker-oriented analysis, but shown to be under- or over-expressed in the present study, may also have potential as biomarkers of canine IPF.

The present study was limited by several factors. Due to the limited availability of normal lung tissue, control dogs were not age- and breed-matched in the microarray and qRT-PCR studies. As a consequence, we cannot exclude age, breed and sex as significant confounding factors. Another major limitation of the microarray analysis was the use of pooled mRNA samples. Pooling has some advantages, since it reinforces signals for weakly expressed transcripts, decreases biological variation and reduces costs, since only one chip is used for each group (Kaminski and Friedman, 2002). Conversely, the level of expression of a specific gene in a group can be influenced by outlier samples and differentially expressed transcripts cannot be identified by statistical analysis. However, several results were confirmed by individual qRT-PCR analysis and, for CCL2, by analysis of serum protein levels, in a breed- and age-matched dogs.

## Conclusions

The present microarray study identified multiple genes and pathways differentially expressed in the lungs of dogs with IPF and associated with cellular proliferation, growth and death,

inflammation and the immune response, and developmental processes. Quantitative RT-PCR confirmed a significant increase in expression of genes encoding CCL2, CCL7, CXCL14, IL8 and FAP in dogs with IPF relative to control dogs, and a significant decrease in expression of PLUNC, identifying them as possible diagnostic or prognostic biomarkers. The potential of CCL2 as a serum biomarker was demonstrated by the presence of high serum concentrations in affected WHWTs compared to healthy WHWTs.

### Conflict of interest statement

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organisations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

### Acknowledgements

This work was supported by a grant from the 'Fonds Spéciaux pour la Recherche' from the University of Liège, Belgium.

### References

- Acharya, P.S., Zukas, A., Chandan, V., Katzenstein, A.L., Pure, E., 2006. Fibroblast activation protein: A serine protease expressed at the remodeling interface in idiopathic pulmonary fibrosis. *Human Pathology* 37, 352–360.
- Antoniades, H.N., Neville-Golden, J., Galanopoulos, T., Kradin, R.L., Valente, A.J., Graves, D.T., 1992. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 mRNA in human idiopathic pulmonary fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 89, 5371–5375.
- Augsten, M., Hagglof, C., Olsson, E., Stolz, C., Tsagozis, P., Levchenko, T., Frederick, M.J., Borg, A., Mücke, P., Egevad, et al., 2009. CXCL14 is an autocrine growth factor for fibroblasts and acts as a multi-modal stimulator of prostate tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 106, 3414–3419.
- Bartlett, J.A., Gakhar, L., Penterman, J., Singh, P.K., Mallampalli, R.K., Porter, E., McCray Jr., P.B., 2011. PLUNC: A multifunctional surfactant of the airways. *Biochemical Society Transactions* 39, 1012–1016.
- Buhling, F., Wille, A., Rocken, C., Wiesner, O., Baier, A., Meinecke, L., Welte, T., Pap, T., 2005. Altered expression of membrane-bound and soluble CD95/Fas contributes to the resistance of fibrotic lung fibroblasts to FasL induced apoptosis. *Respiratory Research* 6, 37.
- Carre, P.C., Mortenson, R.L., King Jr., T.E., Noble, P.W., Sable, C.L., Riches, D.W., 1991. Increased expression of the interleukin-8 gene by alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis. A potential mechanism for the recruitment and activation of neutrophils in lung fibrosis. *Journal of Clinical Investigation* 88, 1802–1810.
- Corcoran, B.M., Cobb, M., Martin, M.W., Dukes-McEwan, J., French, A., Fuentes, V.L., Boswood, A., Rhind, S., 1999. Chronic pulmonary disease in West Highland white terriers. *Veterinary Record* 144, 611–616.
- Coward, W.R., Saini, G., Jenkins, G., 2010. The pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease* 4, 367–388.
- Datta, A., Scotton, C.J., Chambers, R.C., 2011. Novel therapeutic approaches for pulmonary fibrosis. *British Journal of Pharmacology* 163, 141–172.
- Gakhar, L., Bartlett, J.A., Penterman, J., Mizrachi, D., Singh, P.K., Mallampalli, R.K., Ramaswamy, S., McCray Jr., P.B., 2010. PLUNC is a novel airway surfactant protein with anti-biofilm activity. *PLoS ONE* 5, e9098.
- Gharaei-Kermani, M., Denholm, E.M., Phan, S.H., 1996. Costimulation of fibroblast collagen and transforming growth factor  $\beta$ 1 gene expression by monocyte chemoattractant protein-1 via specific receptors. *Journal of Biological Chemistry* 271, 17779–17784.
- Heikkilä, H.P., Lappalainen, A.K., Day, M.J., Clercx, C., Rajamaki, M.M., 2011. Clinical, bronchoscopic, histopathologic, diagnostic imaging, and arterial oxygenation findings in West Highland White Terriers with idiopathic pulmonary fibrosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 25, 433–439.
- Johnson, V.S., Corcoran, B.M., Wotton, P.R., Schwarz, T., Sullivan, M., 2005. Thoracic high-resolution computed tomographic findings in dogs with canine idiopathic pulmonary fibrosis. *Journal of Small Animal Practice* 46, 381–388.
- Kaminski, N., 2003. Microarray analysis of idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 29, S32–S36.
- Kaminski, N., Allard, J.D., Pittet, J.F., Zuo, F., Griffiths, M.J., Morris, D., Huang, X., Sheppard, D., Heller, R.A., 2000. Global analysis of gene expression in pulmonary fibrosis reveals distinct programs regulating lung inflammation and fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 97, 1778–1783.
- Kaminski, N., Friedman, N., 2002. Practical approaches to analyzing results of microarray experiments. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 27, 125–132.
- Kaminski, N., Rosas, I.O., 2006. Gene expression profiling as a window into idiopathic pulmonary fibrosis pathogenesis: Can we identify the right target genes? *Proceedings of the American Thoracic Society* 3, 339–344.
- Kelly, M.M., Leigh, R., Gilpin, S.E., Cheng, E., Martin, G.E., Radford, K., Cox, G., Gaudie, J., 2006. Cell-specific gene expression in patients with usual interstitial pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 174, 557–565.
- Konishi, K., Gibson, K.F., Lindell, K.O., Richards, T.J., Zhang, Y., Dhir, R., Bisceglia, M., Gilbert, S., Yousem, S.A., Song, J.W., et al., 2009. Gene expression profiles of acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 180, 167–175.
- Krafft, E., Heikkilä, H.P., Jespers, P., Peeters, D., Day, M.J., Rajamaki, M.M., McEntee, K., Clercx, C., 2011. Serum and bronchoalveolar lavage fluid endothelin-1 concentrations as diagnostic biomarkers of canine idiopathic pulmonary fibrosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 25, 990–996.
- Kurth, I., Willmann, K., Schaerli, P., Hunziker, T., Clark-Lewis, I., Moser, B., 2001. Monocyte selectivity and tissue localization suggests a role for breast and kidney-expressed chemokine (BRAF) in macrophage development. *Journal of Experimental Medicine* 194, 855–861.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 25, 402–408.
- Maeyama, T., Kuwano, K., Kawasaki, M., Kunitake, R., Hagimoto, N., Matsuba, T., Yoshimi, M., Inoshima, I., Yoshida, K., Hara, N., 2001. Upregulation of Fas-signalling molecules in lung epithelial cells from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *European Respiratory Journal* 17, 180–189.
- Maher, T.M., 2012. Idiopathic pulmonary fibrosis: Pathobiology of novel approaches to treatment. *Clinics in Chest Medicine* 33, 69–83.
- Moodley, Y.P., Caterina, P., Scaffidi, A.K., Misso, N.L., Papadimitriou, J.M., McNulty, R.J., Laurent, G.J., Thompson, P.J., Knight, D.A., 2004. Comparison of the morphological and biochemical changes in normal human lung fibroblasts and fibroblasts derived from lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis during FasL-induced apoptosis. *Journal of Pathology* 202, 486–495.
- Moodley, Y.P., Misso, N.L., Scaffidi, A.K., Fogel-Petrovic, M., McNulty, R.J., Laurent, G.J., Thompson, P.J., Knight, D.A., 2003a. Inverse effects of interleukin-6 on apoptosis of fibroblasts from pulmonary fibrosis and normal lungs. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 29, 490–498.
- Moodley, Y.P., Scaffidi, A.K., Misso, N.L., Keerthisingam, C., McNulty, R.J., Laurent, G.J., Mutsaers, S.E., Thompson, P.J., Knight, D.A., 2003b. Fibroblasts isolated from normal lungs and those with idiopathic pulmonary fibrosis differ in interleukin-6/gp130-mediated cell signaling and proliferation. *American Journal of Pathology* 163, 345–354.
- Niedermeyer, J., Garin-Chesa, P., Kriz, M., Hilberg, F., Mueller, E., Bamberger, U., Rettig, W.J., Schnapp, A., 2001. Expression of the fibroblast activation protein during mouse embryo development. *International Journal of Developmental Biology* 45, 445–447.
- Norris, A.J., Naydan, D.K., Wilson, D.W., 2005. Interstitial lung disease in West Highland White Terriers. *Veterinary Pathology* 42, 35–41.
- Oyama, M.A., Chittur, S., 2005. Genomic expression patterns of cardiac tissues from dogs with dilated cardiomyopathy. *American Journal of Veterinary Research* 66, 1140–1155.
- Pardo, A., Selman, M., 2006. Matrix metalloproteinases in aberrant fibrotic tissue remodeling. *Proceedings of the American Thoracic Society* 3, 383–388.
- Peeters, D., Peters, I.R., Farnir, F., Clercx, C., Day, M.J., 2005. Real-time RT-PCR quantification of mRNA encoding cytokines and chemokines in histologically normal canine nasal, bronchial and pulmonary tissue. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 104, 195–204.
- Peeters, D., Peters, I.R., Clercx, C., Day, M.J., 2006. Real-time RT-PCR quantification of mRNA encoding cytokines, CC chemokines and CCR3 in bronchial biopsies from dogs with eosinophilic bronchopneumopathy. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 110, 65–77.
- Peeters, D., Peters, I.R., Helps, C.R., Gabriel, A., Day, M.J., Clercx, C., 2007. Distinct tissue cytokine and chemokine mRNA expression in canine sino-nasal aspergillosis and idiopathic lymphoplasmacytic rhinitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 117, 95–105.
- Peters, I.R., Helps, C.R., Hall, E.J., Day, M.J., 2004. Real-time RT-PCR: Considerations for efficient and sensitive assay design. *Journal of Immunological Methods* 286, 203–217.
- Peters, I.R., Peeters, D., Helps, C.R., Day, M.J., 2007. Development and application of multiple internal reference (housekeeper) gene assays for accurate normalisation of canine gene expression studies. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 117, 55–66.
- Prasse, A., Müller-Quernheim, J., 2009. Non-invasive biomarkers in pulmonary fibrosis. *Respirology* 14, 788–795.
- Richards, T.J., Kaminski, N., Baribaud, F., Flavin, S., Brodmerkel, C., Horowitz, D., Li, K., Choi, J., Vuga, L.J., Lindell, K.O., et al., 2012. Peripheral blood proteins predict mortality in idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 185, 67–76.
- Rosas, I.O., Richards, T.J., Konishi, K., Zhang, Y., Gibson, K., Lokshin, A.E., Lindell, K.O., Cisneros, J., Macdonald, S.D., Pardo, A., et al., 2008. MMP1 and MMP7 as potential peripheral blood biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS Medicine* 5, e93.
- Sekiya, T., Miyamasu, M., Imanishi, M., Yamada, H., Nakajima, T., Yamaguchi, M., Fujisawa, T., Pawankar, R., Sano, Y., Ohta, K., et al., 2000. Inducible expression of a Th2-type CC chemokine thymus- and activation-regulated chemokine by human bronchial epithelial cells. *Journal of Immunology* 165, 2205–2213.
- Selman, M., Carrillo, G., Estrada, A., Mejia, M., Becerril, C., Cisneros, J., Gaxiola, M., Perez-Padilla, R., Navarro, C., Richards, T., et al., 2007. Accelerated variant of idiopathic pulmonary fibrosis: Clinical behavior and gene expression pattern. *PLoS ONE* 2, e482.

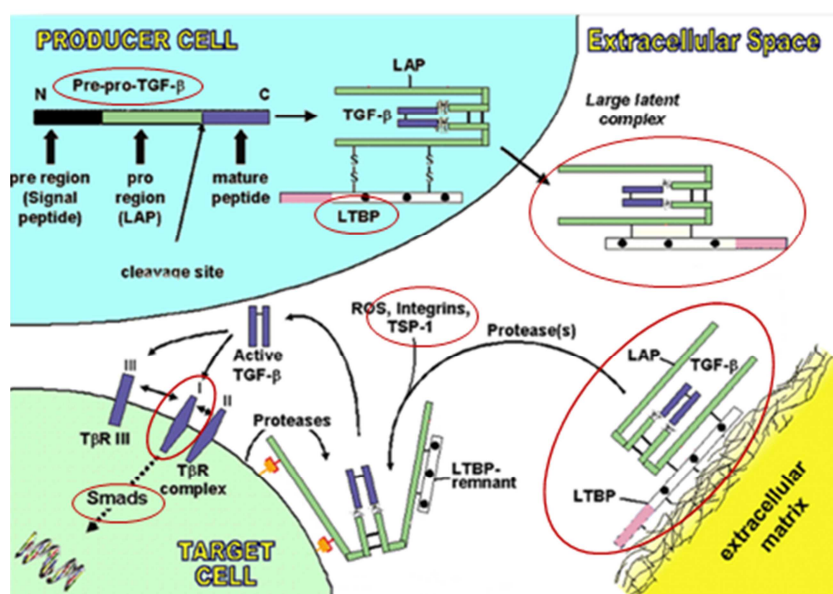
- Selman, M., Pardo, A., Kaminski, N., 2008. Idiopathic pulmonary fibrosis: Aberrant recapitulation of developmental programs? *PLoS Medicine* 5, e62.
- Song, J.W., Do, K.H., Jang, S.J., Colby, T.V., Han, S., Kim, D.S., 2013. Blood biomarkers MMP-7 and SP-A: Predictors of outcome in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 143, 1422–1429.
- Starnes, T., Rasila, K.K., Robertson, M.J., Brahma, Z., Dahl, R., Christopherson, K., Hromas, R., 2006. The chemokine CXCL14 (BRAF) stimulates activated NK cell migration: Implications for the downregulation of CXCL14 in malignancy. *Experimental Hematology* 34, 1101–1105.
- Sterling, T., Danail, B., 2010. A survey of current software for network analysis in molecular biology. *Human Genomics* 4, 353–360.
- Strieter, R.M., 2008. What differentiates normal lung repair and fibrosis? Inflammation, resolution of repair, and fibrosis. *Proceedings of the American Thoracic Society* 5, 305–310.
- Studer, S.M., Kaminski, N., 2007. Towards systems biology of human pulmonary fibrosis. *Proceedings of the American Thoracic Society* 4, 85–91.
- Syrjä, P., Heikkilä, H.P., Lilja-Maula, L., Krafft, E., Clercx, C., Day, M.J., Rönty, M., Myllärniemi, M., Rajamäki, M.M., 2013. The histopathology of idiopathic pulmonary fibrosis in West Highland white terriers shares features of both non-specific interstitial pneumonia and usual interstitial pneumonia in man. *Journal of Comparative Pathology* 149, 303–313.
- Vij, R., Noth, I., 2012. Peripheral blood biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *Translational Research* 159, 218–227.
- Wilson, M.S., Wynn, T.A., 2009. Pulmonary fibrosis: Pathogenesis, etiology and regulation. *Mucosal Immunology* 2, 103–121.
- Yamashita, C.M., Dolgonos, L., Zemans, R.L., Young, S.K., Robertson, J., Briones, N., Suzuki, T., Campbell, M.N., Gauldie, J., Radisky, D.C., et al., 2011. Matrix metalloproteinase 3 is a mediator of pulmonary fibrosis. *American Journal of Pathology* 179, 1733–1745.
- Zuo, F., Kaminski, N., Eugui, E., Allard, J., Yakhini, Z., Ben-Dor, A., Lollini, L., Morris, D., Kim, Y., DeLustro, B., et al., 2002. Gene expression analysis reveals matrilysin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 99, 6292–6297.

### **3. Etude 2: Le TGFB1 et ses voies d'activation, de stockage et de signalisation dans la FPIc**

En raison du rôle central du TGFB1 dans la pathogénie de la FPI chez l'homme évoqué précédemment, nous avons décidé de l'étudier dans la FPIc. Nous avons notamment cherché à déterminer si sa synthèse, ses voies d'activation et de stockage étaient altérées lors de FPIc et si le parenchyme pulmonaire atteint était le siège d'un « signal TGFB1 » actif. Les mécanismes de régulation du signal du TGFB1 incluent des changements dans la transcription du gène du TGFB1, la stabilité et la traduction de l'ARNm correspondant, des modifications post-transcriptionnelles, le stockage et l'activation des formes latentes, l'inhibition de la signalisation intracellulaire et l'inactivation du TGFB1. Certains de ces mécanismes ont ainsi été étudiés chez des chiens atteints de FPIc en comparaison de chiens sains. La concentration sérique en TGFB1 a également été évaluée avec l'hypothèse que des taux circulants élevés pourraient être un reflet d'une activité augmentée du TGFB1 au niveau pulmonaire et qu'elle pourrait être utilisée en tant que biomarqueur.

Le niveau d'expression génique du TGFB1 a ainsi été évalué par qRT-PCR alors que l'immunohistochimie a été utilisée pour tenter d'identifier les cellules produisant le TGFB1, ses lieux de stockage et d'évaluer de manière qualitative la quantité de protéines présentes à l'aide d'un anticorps anti-TGFB1, mais également d'identifier les cellules cibles pour le TGFB1 par l'intermédiaire d'un anticorps anti-TGFBRI. L'expression de certaines protéines impliquées dans le stockage (LTBP1, 3 et 4) et l'activation des formes latentes du TGFB1 (sous-unités  $\beta 6$  et  $\beta 8$  des intégrines  $\alpha \beta 6$  et  $\alpha \beta 8$ ), a été évaluée par qRT-PCR. En ce qui concerne la signalisation intracellulaire, nous avons choisi d'évaluer la voie des Smads. L'expression de la Smad 7, Smad inhibitrice de la signalisation intracellulaire, a ainsi été évaluée par qRT-PCR. Les Smad 2 et 3 étant présentes sous forme phosphorylées suite à la liaison du TGFB1 à ses récepteurs membranaires, nous avons utilisé un anticorps anti P-Smad2/3 pour confirmer par immunohistochimie la présence d'un signal intracellulaire actif du TGFB1. Les échantillons utilisés pour ces analyses provenaient de 12 WHWT atteints de FPIc et de 11 chiens contrôles de différentes races.

Figure 17 : Eléments des voies du TGFB1 étudiés dans la FPIc



LAP: latency associated peptide; LTBP: latent TGFB binding protein; ROS: reactive oxygen species; TβR: TGFB receptor; TGFB: transforming growth factor beta; TSP-1: thrombospondin-1

Tout d'abord, aucune différence significative dans l'expression génique du TGFB1 n'a été observée entre les chiens atteints et les chiens contrôles. Ce résultat doit toutefois être pondéré par la faible puissance statistique (0,285) obtenue. En région bronchique et pérbronchique, le même pattern d'immunoréactivité a été observé pour l'anticorps anti-TGFB1, avec un marquage intense et diffus dans la couche de tissu conjonctif entourant les bronches et les bronchioles et un marquage plus faible et granuleux dans les muscles lisses bronchiques, bronchiolaires et vasculaires. En région alvéolaire, une différence très nette était par contre observée. Chez les chiens contrôles, selon les champs, aucun marquage ou un marquage très faible était noté ; alors que chez les chiens atteints, un marquage uniforme intense et diffus était observé au niveau de la matrice fibreuse. Ces données indiquent que chez le chien, le TGFB1 est présent dans le poumon sain en particulier en région pérbronchique, avec un stockage dans la matrice extracellulaire. Chez les chiens atteints, le marquage intense dans la matrice fibreuse en région alvéolaire suggère la présence d'une quantité élevée de TGFB1 dans les zones fibrotiques avec une augmentation du stockage extracellulaire. Aucun marquage intracellulaire n'ayant été obtenu dans les deux groupes, il ne nous a par contre pas été possible d'identifier les cellules produisant le TGFB1. Bien que le TGFB1 sous forme de protéine semble présent en quantité augmentée dans les zones fibrotiques, aucune surexpression du gène n'a été observée, suggérant que la régulation de l'expression génique du TGFB1 n'est pas un mécanisme important de régulation des voies du TGFB1 dans la FPIc. Un marquage pour l'anticorps anti-TGFBRI a été observé dans les deux groupes au niveau des cellules épithéliales bronchiques et bronchiolaires et plus faiblement au niveau des muscles lisses. Au sein des poumons sains, les pneumocytes n'exprimaient pas ce récepteur alors qu'un marquage intense était observé de manière ponctuelle au niveau des cellules épithéliales alvéolaires, en particulier des pneumocytes hypertrophiques, chez les chiens atteints de FPIc. Ces résultats suggèrent que ces pneumocytes hypertrophiques sont une cible importante pour le TGFB1 lors de FPIc.

Un marquage nucléaire pour les P-Smad 2/3 a été observé dans les deux groupes. Chez les chiens sains, quelques cellules épithéliales alvéolaires et bronchiques étaient positives, indiquant

l'existence d'une activité basale du TGFB1 au sein du poumon sain. Dans les poumons des chiens atteints de FPIc, un marquage intense et concernant une proportion beaucoup plus importante des cellules a été mise en évidence au sein de l'épithélium lésionnel, confirmant l'hypothèse d'une augmentation du « signal TGFB1 » au niveau des cellules épithéliales pathologiques.

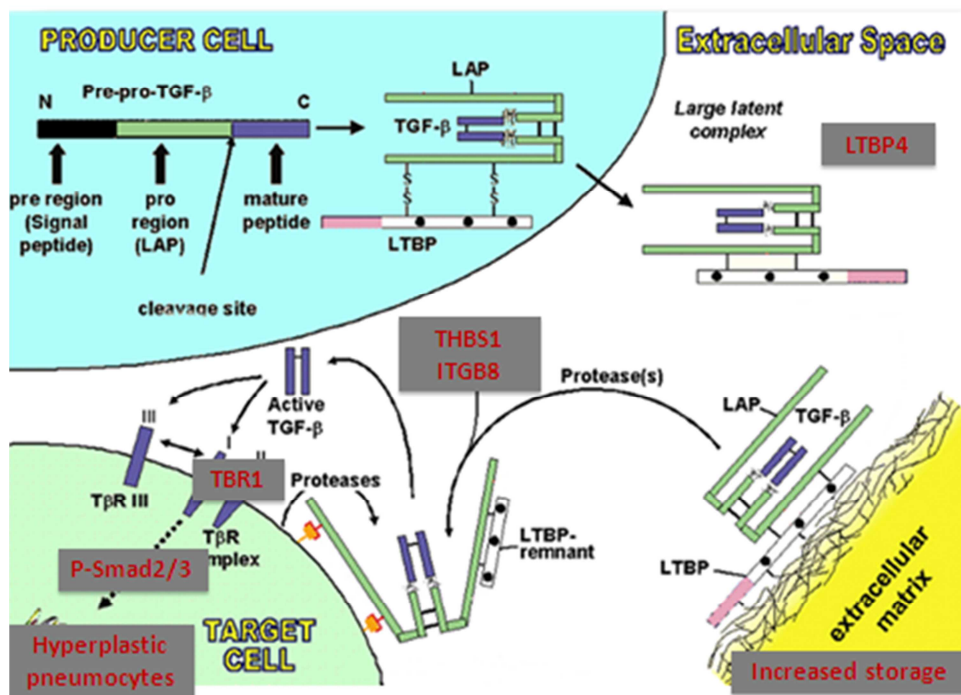
L'analyse des voies de stockage du TGFB1 a d'abord mis en évidence que les LTBP1, 3 et 4 sont toutes exprimées dans le poumon sain chez le chien. Les résultats suggèrent également une altération de ces voies lors de FPIc avec une diminution de l'expression de la LTPB4. L'interprétation de cette sous-expression est pour l'instant difficile. Même si l'on peut suggérer qu'elle pourrait s'accompagner d'une activation plus importante du TGFB1, la situation semble en réalité plus complexe. Tel qu'évoqué précédemment, le rôle des LTBP n'est en effet pas limité à l'inactivation du TGFB1 et même s'il a été suggéré que chaque isoforme puisse avoir des propriétés différentes, très peu de données sont actuellement connues sur leurs fonctions spécifiques.

Concernant les voies d'activation du TGFB1, il ressort de cette étude que les intégrines  $\alpha\beta6$  et  $\alpha\beta8$  et la THBS1 sont exprimées par le poumon sain et que leur expression est altérée lors de FPIc avec régulation négative de l'expression de l' $\alpha\beta8$  et une surexpression de la THBS1. Ces résultats suggèrent que les interactions avec la THBS1 pourraient être un mécanisme important d'activation du TGFB1 lors de FPIc, tel que suspecté chez l'homme. L'activation par l' $\alpha\beta6$  semble particulièrement importante lors de mécanismes pathologiques chez l'homme, comme lors de phénomène inflammatoire. L'activation par cette intégrine semble importante lors de FPI chez l'homme et une surexpression a été mise en évidence dans les cellules épithéliales des zones fibrotiques. Dans notre étude, l'expression de la sous-unité  $\beta6$  n'était pas significativement différente entre les 2 groupes, suggérant que cette voie d'activation n'est pas prépondérante dans la FPIc. Il est toutefois possible que l'absence de différence soit liée à une erreur de type  $\beta$  (puissance du test de seulement 0,382) ou que cette surexpression soit cellule-spécifique et ainsi plus difficilement détectable par qRT-PCR à l'échelle tissulaire.

Il a été décrit que l'expression de Smad 7 est stimulée par le TGFB1, ce qui pourrait constituer un rétrocontrôle négatif du signal. A l'inverse, une déficience dans cette voie régulation pourrait stimuler la voie du TGFB1. D'après nos résultats, il semble que ce mécanisme d'inhibition n'est ni stimulé ni déficient à l'échelle transcriptionnelle lors de FPIc.



Figure 18 : Altérations des voies du TGFB1 mises en évidence lors de FPIc



*ITGB8*: integrin  $\beta 8$ ; *LAP*: latency associated peptide; *LTBP*: latent TGFB binding protein; *P-Smad2/3*: phosphorylated Smad 2/3; *ROS*: reactive oxygen species; *TβR* or *TBR*: TGFB receptor; *TGFβ*: transforming growth factor beta; *THBS1*: thrombospondin-1

Dans une étude préliminaire comparant la concentration sérique en TGFB1 entre des WHWT sains, atteints de FPIc et un groupe de chiens de différentes races, nous avons obtenu une différence significative entre les chiens atteints et le groupe contrôle de différentes races. De manière plus surprenante, aucune différence n'a été observée entre WHWT sains et WHWT atteints. Ces résultats ne confortaient pas notre hypothèse initiale d'un taux circulant élevé en TGFB1, reflet de la présence des lésions pulmonaires de FPIc. Ils excluaient également son utilisation en tant que biomarqueur. Par contre, ils suggéraient l'existence d'une variabilité interraciale ou moins probablement d'un effet âge, les 2 groupes de WHWT étant plus âgés que les chiens du groupe contrôle. Nous avons donc testé cette hypothèse en mesurant la concentration sérique en TGFB1 dans différentes races et ce en incluant des chiens avec une prédisposition variable pour la FPIc, de fortement prédisposés à non prédisposés. Alors qu'aucun effet de l'âge n'a été mis en évidence, un effet race est nettement présent avec des concentrations sériques plus élevées dans les races prédisposées, en particulier le WHWT. Ces résultats suggèrent que le taux circulant en TGFB1 pourrait être, au moins partiellement, déterminé génétiquement chez le chien. Chez l'homme, la concentration sanguine en TGFB1 est en partie héritable (Grainger *et al.*, 1999). Tel qu'évoqué précédemment, des polymorphismes dans le gène, associés à une synthèse variable de TGFB1, ont été associés à la prédisposition pour la FPI. Par ailleurs, après transplantation autologue de moelle osseuse et chimiothérapie dans le cadre du traitement du cancer du sein (Anscher *et al.*, 1993), les taux sanguins en TGFB1 prétransplantation étaient plus élevés chez les patients développant par la suite une fibrose pulmonaire ou hépatique que chez ceux ne développant pas de fibrose. Mais comment expliquer dans ce cas que seuls certaines personnes ou certains chiens développent la maladie ? Une des hypothèses est que la présence de taux circulants élevés en TGFB1 ne serait pas suffisante en elle-même pour entraîner l'apparition de la maladie

mais pourrait induire une réponse inappropriée face à des lésions pulmonaires, réponse conduisant à terme au développement d'une fibrose. Cette hypothèse est appuyée par une étude réalisée chez la souris (Haider *et al.*, 2007). Un modèle de souris transgénique a été utilisé afin d'évaluer les conséquences d'une surexpression du TGF $\beta$ 1 sous forme active, par microinjection d'un fragment d'ADN contenant le gène modifié du TGF $\beta$ 1 associé à un promoteur de l'albumine. Ces souris surexpriment le TGF $\beta$ 1 au niveau hépatique, présentent des taux circulants élevés de TGF $\beta$ 1 actif et développent spontanément une fibrose hépatique. Aucune fibrose pulmonaire spontanée n'a été observée chez ces souris qui présentent par contre une fibrose pulmonaire plus sévère que les souris sauvages suite à l'administration de bléomycine. Ces résultats apportent ainsi une piste intéressante pour tenter d'expliquer la nette prédisposition raciale du WHWT, avec l'hypothèse que la présence de taux circulants importants de TGF $\beta$ 1 pourrait favoriser le développement d'une FPIc.

Cette étude présente plusieurs limites. Tout d'abord, la puissance des tests statistiques était insuffisante pour certaines analyses en raison de la taille limitée des groupes, il est ainsi possible que des différences entre les deux groupes n'aient pas pu être mises en évidence. Par ailleurs, les analyses qRT-PCR ont été effectuées sur des échantillons de tissu, la quantité d'ARNm a ainsi été évaluée à l'échelle tissulaire et non pas cellulaire, les conclusions ne peuvent donc pas être appliquées à un type cellulaire particulier. La principale limite de cette étude réside toutefois dans la constitution des groupes contrôles utilisés pour les analyses immunohistochimiques et de transcriptomiques. Ces groupes n'ont en effet pas pu être « matchés » pour l'âge et surtout pour la race, aucun tissu pulmonaire issu de WHWT sain n'ayant pu être obtenu. Or, tel que confirmé par l'analyse des concentrations sériques en TGF $\beta$ 1, il apparaît que la race peut être un facteur confondant important dans la FPIc. Une partie de nos résultats a toutefois été confirmée très récemment dans une étude immunohistochimique comparant un groupe de 14 WHWT à 3 WHWT sains (Lilja-Maula *et al.*, 2013a). Dans cette étude, les auteurs ont également mis en évidence une immunoréactivité plus élevée en P-Smad2/3 chez les WHWT atteints comparés aux WHWT sains et ce à l'aide d'une méthode semi-quantitative (% de cellules alvéolaires positives), confirmant l'existence d'une augmentation du « signal TGF $\beta$ 1 » lors de FPIc. Chez les chiens atteints, l'immunoréactivité était principalement observée au niveau de l'épithélium lésionnel. Cette étude a également évalué l'expression de LTP1. Une augmentation de l'immunoréactivité pour cette protéine était observée au niveau des cellules épithéliales alvéolaires anormales, dans l'interstitium et en région péribronchique et périvasculaire chez les WHWT avec FPIc en comparaison des contrôles. L'absence de concordance entre ces résultats et ceux que nous avons obtenus peut notamment être liée à la différence des techniques utilisées. En effet, en utilisant la qRT-PCR à partir d'échantillons de tissus, nous avons quantifié la quantité d'ARNm et non pas la quantité de protéines. De plus, une surexpression localisée de LTP1, par une population cellulaire particulière, peut ne pas être détectée par qRT-PCR mais observée par immunohistochimie. Une autre hypothèse est que la régulation de la transcription du gène de LTP1 ne serait pas un mécanisme important de régulation de la quantité de protéine présente dans les tissus.

Transforming growth factor beta 1 activation, storage and signaling pathways in idiopathic pulmonary fibrosis in dogs

Emilie Krafft<sup>1\*</sup>, Pascale Lybaert<sup>2</sup>, Elodie Roels<sup>1</sup>, Henna P Laurila<sup>3</sup>, Minna M Rajamäki<sup>3</sup>, Frédéric Farnir<sup>4</sup>, Marjukka Myllärniemi<sup>5</sup>, Michal J Day<sup>6</sup>, Kathleen Mc Entee<sup>7</sup>, Cécile Clercx<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Veterinary Clinical Sciences, Division of Companion Animal Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Belgium; <sup>2</sup> Laboratory of Experimental Hormonology, Faculty of Medicine, Université Libre de Bruxelles, Belgium; <sup>3</sup> Department of Equine and Small Animal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Finland Veterinary Teaching Hospital, Finland; <sup>4</sup> Department of Animal Production, Division of Genetics and Biostatistics, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liege, Belgium; <sup>5</sup> Department of Clinical Medicine and Transplantation Laboratory, University of Helsinki and Division of Pulmonary Medicine and Heart and Lung Center, Helsinki University Central Hospital, Finland; <sup>6</sup> School of Veterinary Sciences, University of Bristol, UK; <sup>7</sup> Laboratory of Physiology, Faculty of Medicine, Université Libre de Bruxelles, Belgium.

Short title: pulmonary fibrosis in dogs

Keywords: integrin, thrombospondin-1, Smads, latent binding protein

#### Abbreviations

IPF idiopathic pulmonary fibrosis

ITGB6 integrin chain  $\beta 6$

ITGB8 integrin chain  $\beta 8$

LTBP latent transforming growth factor binding protein

P-Smad2/3 phosphorylated Smad2/3

qRT-PCR quantitative reverse transcriptase PCR

RPS18 ribosomal protein S18

TBP TATA box binding protein

TGFBRI transforming growth factor beta receptor type I

TGFB transforming growth factor beta

THBS1 thrombospondin-1

WHWT West Highland white terrier

\* Corresponding author: Emilie Krafft, Department of Veterinary Clinical Sciences B44, Division of Companion Animal Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Boulevard de Colonster 20, 4000 Liège, Belgium; [e.krafft@ulg.ac.be](mailto:e.krafft@ulg.ac.be)

Cases were recruited at the University of Liège and at the Finland Veterinary Teaching Hospital. The laboratory work was performed at the University of Liège (gene expression analysis), at the University of Brussel (serum TGFB1 measurement, immunohistochemistry for TGFB1 and TGFBRI) and at the Helsinki University Central Hospital (immunohistochemistry for P-Smad2/3).

The study was supported by a grant from the FNRS (National fund for research, in Belgium)

Part of this work was presented as an abstract at the 20<sup>th</sup> ECVIM-CA Annual Congress 2010, Toulouse, France, at the 21<sup>th</sup> ECVIM-CA Congress 2011, Seville, Spain, at the 22<sup>th</sup> ECVIM-CA Congress 2012, Maastricht, Netherlands, at the 2013 BARL Summer Meeting, Nottingham, UK and at the 23<sup>th</sup> ECVIM-CA Congress 2013, Liverpool, UK.

#### Acknowledgments

We thank Eva Sutinen and Pascal Jaspers for excellent technical assistance.

## Abstract

**Background:** The pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) in dogs is poorly understood. In human, transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGFB1) is considered central in the pathogenesis.

**Objectives:** To investigate TGFB1 pathway in IPF.

**Animals:** Lung tissues from 12 affected and 11 control dogs. Serum from 16 affected West Highland white terriers (WHWTs) and healthy dogs from predisposed (13 WHWTs, 12 Scottish terriers and 13 Bichons Frise) and non-predisposed breeds (10 Whippets, 10 Belgian shepherds, 8 Labradors).

**Methods:** In this prospective study, immunohistochemistry was used to evaluate expression and localization of TGFB1 protein and proteins involved in TGFB1 signaling (TGFB receptor type I and phospho-Smad2/3). Pulmonary expression of TGFB1 and molecules involved in its storage (latent TGFB binding proteins (LTBP) 1, 2 and 4), activation ( $\alpha$ v $\beta$ 6 and  $\alpha$ v $\beta$ 8 integrins, thrombospondin-1) and signal inhibition (Smad 7) was analyzed by quantitative reverse transcriptase PCR. Circulating TGFB1 concentration was measured by ELISA.

**Results:** In IPF, high level of TGFB1 protein was found in areas of fibrosis, epithelial cells had strong expression of TGFB receptor type I and phospho-Smad2/3, gene expression was decreased for LTBP 4 ( $p=0.009$ ) and  $\beta$ 8 integrin ( $p<0.001$ ) and increased for thrombospondin-1 ( $p=0.016$ ); no difference was seen for Smad7, LTBP1 and 2. Serum TGFB1 concentration was higher in predisposed compared with non-predisposed breeds ( $p<0.0001$ ).

**Conclusions and clinical importance:** This study identified an enhanced TGFB1 signaling activity in IPF. TGFB1 storage and activation proteins with altered expression represent potential therapeutic targets. Higher circulating TGFB1 concentration in predisposed breeds might partly explain their susceptibility for IPF.

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) in dogs has been recently completely characterized clinically<sup>1-3</sup> and histologically<sup>4</sup>. This histological description has confirmed the fibrotic nature of the disease with an underlying mature fibrosis in all dogs and multifocal areas of accentuated subpleural and peribronchiolar fibrosis with occasional honeycombing and alveolar epithelial changes found in most dogs (type II pneumocytes atypia and hyperplasia). Inflammatory changes are limited to mild to moderate interstitial lymphoplasmacytic infiltration. Another striking figure of IPF is the major breed predisposition for the West Highland white terrier (WHWT). Rare cases have been described in other terrier breeds including the Staffordshire terrier<sup>5</sup> and the Scottish terrier<sup>6</sup> and in other small breeds such as the Bichon Frise (personal observation).

Breed predisposition suggests a genetic basis for the disease; however, the pathogenesis of IPF is poorly understood. Endothelin-1<sup>6</sup> and pro-collagen aminopeptide type III<sup>7</sup> have been studied as biomarkers of IPF and are probably involved in the pathogenesis. Recently, a pulmonary gene expression profile analysis has showed increased pulmonary expression of genes encoding cytokines such as CCL2, CCL7, IL8, CXCL14 and the fibroblast activation protein<sup>8</sup>.

Transforming growth factor beta 1 (TGFB1), a member of the TGFB superfamily, plays important regulatory roles in cell growth, morphogenesis, differentiation and apoptosis. It is a potent fibrogenic factor which increases extracellular matrix accumulation by enhancing collagen synthesis and suppressing protease production<sup>9</sup>. In human patients with IPF, increased TGFB1 concentrations are found both in bronchoalveolar lavage fluid<sup>10</sup> and plasma<sup>11</sup>. Moreover, TGFB1 mRNA and protein are overexpressed in lung tissue of human patients with IPF<sup>12-14</sup>. For all these reasons, dysregulated or aberrant TGFB1 signaling TGFB1 is now considered to be one of the primary causative agents of pulmonary fibrosis in man<sup>15</sup>.

TGFB1 is produced as an inactive form, the small latent complex, which is the active mature TGFB1 peptide bound to its propeptide. This small latent complex binds to latent TGF binding proteins (LTBPs) to form a large latent complex before being released from the cell. After excretion, most latent complexes are targeted to the extracellular matrix through LTBPs. This storage is a means of regulating TGFB1 signaling<sup>16</sup>. In vivo, latent complexes are activated by integrins  $\alpha\beta 6$ <sup>17,18</sup> and  $\alpha\beta 8$ <sup>19</sup> and by interaction with thrombospondin-1 (THBS1)<sup>20-22</sup>. The active form of TGFB1 binds to its specific type II receptors, which is followed by the recruitment of type I receptors (TGFBRI). Various intracellular signaling pathways downstream to the TGFB1 receptors have been described, including the Smad proteins<sup>23</sup>. Activation of TGFBRI results in Smad2/3 phosphorylation leading to a complex with Smad4. This complex translocates to the nucleus where it activates target genes by binding to specific promoter element. Smad7 inhibits TGFB1 signaling by binding to TGFBRI and interfering with Smad2 and Smad3 phosphorylation.

The aim of the present study was to evaluate TGFB1 biochemical pathways in healthy dogs and dogs with IPF. Specifically, the concentration of circulating TGFB1 was evaluated in addition to lung expression and localization of this molecule as well as proteins involved in its storage (LTBPs) and activation ( $\alpha\beta 6$  and  $\alpha\beta 8$  integrins and THBS1). We also analyzed proteins involved in TGFB1 signaling including TGFBRI, phosphorylated Smad2/3 (P-Smad2/3) and Smad7.

## Materials and Methods

All samples were obtained from privately owned dogs. This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health. The protocol was approved by the Committee of Experimental Animals of the University of Helsinki, Finland (permit number: ESLH-2008-05403) and of the University of Liège, Belgium (permit number 1435).

### *Animals*

Lung tissue samples were obtained from 12 WHWTs with IPF (mean age  $\pm$  standard error of the mean:  $12.8 \pm 0.4$  years) and 11 control dogs of various breeds (3 Beagles, 3 mixed-breed, one dog from each of the following breeds: Yorkshire terrier, Jack Russell terrier, Border collie, Newfoundland, Leonberger) ( $5.2 \pm 1.4$  years).

Serum was collected from 16 WHWTs with IPF ( $11.7 \pm 0.3$  years) and from 66 healthy control dogs from breeds with different predispositions to IPF. These included highly predisposed WHWTs (13 dogs,  $9.6 \pm 0.8$  years), two breeds reported to be mildly or moderately predisposed, the Scottish terrier (12 dogs,  $5.6 \pm 0.8$  years), and the Bichon Frise (13 dogs,  $5.4 \pm 1.0$  years) and 3 breeds considered to be non-predisposed: the Whippet (10 dogs,  $8.3 \pm 0.9$  years), the Belgian shepherd (10 dogs,  $5.6 \pm 0.1$  years) and the Labrador (8 dogs,  $4.9 \pm 1.2$  years).

Clinical diagnosis of IPF was based on compatible clinical signs and exclusion of other causes of chronic respiratory disease by thoracic radiography, bronchoscopy, bronchoalveolar lavage fluid analysis, echocardiography and fecal analysis (Baermann and flotation methods), and on the results of HRCT<sup>1,3</sup>. Euthanasia was indicated because of progressive respiratory failure in 12 dogs; diagnosis of IPF was confirmed post-mortem by microscopical examination of lung tissues<sup>4</sup>. The health status of the control dogs was assessed based on history (absence of clinical signs consistent with respiratory or cardiac disease, or any other disease with systemic consequences), physical examination, hematology and serum biochemistry. In the healthy WHWTs, blood gas analysis, bronchoscopy and thoracic HRCT were also performed<sup>1</sup>. The 11 control (non-WHWTs) dogs used for lung analyses were euthanized for non-pulmonary related reasons and histopathological examination confirmed normal lung architecture.

### *Lung and blood samples*

Full-thickness lung tissue samples were obtained within 30 minutes after euthanasia. Samples for RNA extraction were either placed in a 1.5mL cryotube<sup>a</sup>, snap frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  ( $n=4$ ) or transferred into in a cryotube<sup>a</sup> containing RNA later<sup>b</sup>, refrigerated at  $4^{\circ}\text{C}$  for up to 24h, and then frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further processing ( $n=19$ ). Samples for histopathology and immunohistochemistry were placed in 10% neutral buffered formalin. Since the lesion distribution is heterogeneous in IPF, samples for RNA extraction and for histopathological analysis were collected from adjacent areas to ensure microarray and quantitative reverse transcriptase PCR (qRT-PCR) analysis was performed on lesional tissue. Blood samples collected in plain tubes were centrifuged 30 min after collection at  $4^{\circ}\text{C}$  for 15 min at 3000g and the serum was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis.

### *Immunohistochemistry*

Paraffin wax-embedded sections of control ( $n=5$ ) and IPF lung ( $n=7$ ) were dewaxed in toluene and rehydrated in graded alcohol. For P-Smad2/3 only, antigens were retrieved by heating the sections in 0.01M citrate buffer (pH 6.0) in a microwave oven set to full power until the solution came to boil and for 10 minutes after this point. Endogenous peroxidase activity was blocked with 0.3% hydrogen peroxidase.

#### TGFB1 and TGFBR1

Tissue sections were incubated for 1 hour in blocking solution (10% normal goat serum in PBS) and then exposed to rabbit anti-human TGFB1<sup>c</sup> or anti-human TGFBR1-ALK5<sup>c</sup> (as described previously<sup>24-27</sup>), each diluted at 1:400 in the blocking solution at  $4^{\circ}\text{C}$  overnight. Secondary antibody (biotinylated goat anti-rabbit IgG<sup>d</sup>) was applied to the sections for 1 hour at room temperature at a concentration of 1:300 in the blocking solution. Immunoreactivity was detected by the use of a

peroxidase-labeled avidin-biotin complex kit<sup>d</sup> followed by incubation with 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride<sup>d</sup>. Sections were then counterstained with toluidine blue. For negative controls, the primary antibody was replaced by rabbit IgG<sup>d</sup> (1:5000) to determine the specificity of the labeling. Positive control tissue consisted of sections of canine myocardium.

#### P-Smad2/3

Tissue sections were exposed to the primary antibody: rabbit antibody against human, mouse and rat P-Smad2/3<sup>e</sup>, as described previously<sup>28</sup>, at 4°C overnight. The bound antibodies were visualized by use of the Novolink Polymer Detection System<sup>f</sup> and 3,3'-diaminobenzidine<sup>g</sup>. The sections were counterstained with Mayer's hematoxylin. For negative control, the sections were treated with isotype-specific antibody for rabbit<sup>h</sup>.

#### Quantitative RT-PCR

Total RNA was isolated from lung tissue samples (12 dogs with IPF, 11 control dogs) using the Micro to Mini Total RNA<sup>TM</sup> extraction kit<sup>i</sup> and its quality was checked, as described previously<sup>8</sup>. TATA box binding protein (TBP) and ribosomal protein S18 (RPS18) were used as non-regulated reference genes for normalization of gene expression<sup>29</sup>. The primer and probe sequences for TGFB1, RPS18 and TBP were the same as previously described<sup>29,30</sup>. Primers and probes were designed using the GenBank sequences for integrin chain  $\beta$ 6 (ITGB6; XM\_852055), integrin chain  $\beta$ 8 (ITGB8; XM\_532487), THBS1 (XM\_544610), SMAD7 (XM\_845400), LTBP1 (XM\_546547), LTBP3 (XM\_540857.3) and LTBP4 (XM\_533664.4), as described previously<sup>30</sup> (table 1). Quantitative RT-PCR was carried out in a two-tube, two enzyme format using a combination of a reverse transcriptase<sup>j</sup> and Hot-Start Taq Master Mix<sup>k</sup> as described previously<sup>30</sup>. A negative control of nuclease free water and a positive control sample with a known Ct value were included in each run; with only one transcript quantified on each plate. Duplicate reactions were run for each cDNA sample and a mean Ct value was calculated for each sample.

#### Measurement of serum concentration of TGFB1

TGFB1 concentration was measured in serum using a canine ELISA kit<sup>l</sup>, as per the manufacturer's instructions. The range of detection of this assay is 31.2 to 2000pg/mL. As indicated in the manufacturer's instructions for canine serum samples, a 40-fold dilution was performed and the concentration measured at the end of the procedure was multiplied by the dilution factor to obtain the real concentration.

#### Statistical analysis

Statistical analysis was performed using commercially available software<sup>m</sup>. Relative quantification of gene expression was performed using the  $\Delta C_t$  method. Mean relative qRT-PCR expressions were compared using the Mann-Whitney *U* test. Serum TGFB1 concentration in WHWTs with IPF was compared with healthy WHWTs with a t-test. Multivariate analysis was performed in healthy dogs to check influence of age and breed on serum TGFB1 concentration. If a factor was found significant, it was further studied using post-hoc contrasts in the GLM procedure with correction for multiple testing (Tukey Kramer). Statistical significance was defined as  $p < 0.05$ . No quantitative analysis was performed for immunohistochemical results.

## Results

### *TGFB1 gene expression, TGFB1 and its receptor TGFBR1 immunoreactivity*

Expression of TGFB1 mRNA was not significantly different between samples of lung from dogs with IPF and from control dogs ( $p=0.086$ ) (Figure 1A). In sections of lungs from all control



dogs (figure 2A), strong and diffuse TGFB1 labeling was seen in the layer of fibrous connective tissue surrounding bronchi and bronchioles and a weaker granular expression was seen in bronchial/bronchiolar and vascular smooth muscle (comparable intensity in all dogs). Endothelial cells and bronchial epithelial cells showed no or a very weak expression of TGFB1. In the interstitium between alveoli, the labeling was less consistent with some areas showing no labeling and others having weak expression (figure 2E). In contrast, bronchial and bronchiolar epithelial cells had distinct apical expression of TGFBRI in all dogs but there was only weak granular labeling of the smooth muscle and no expression within the layer of fibrous connective tissue surrounding bronchi or bronchioles (figure 2C). There was no TGFBRI labeling of alveolar tissue in any dog.

In sections of lung from all WHWTs with IPF, the same pattern of immunoreactivity (same localization and comparable intensity) was observed for both antibodies in bronchial areas (figure 2B and 2D). In areas of pulmonary fibrosis in all dogs, there was uniformly strong and diffuse expression of TGFB1 in the fibrous matrix (figure 2F). In contrast, TGFBRI was not visible within the fibrotic tissue, but there was very strong labeling of individual alveolar epithelial cells and particularly hyperplastic pneumocytes (figure 2G and 2H). In those sections of lung from dogs with IPF in which there was a concurrent inflammatory response, there was no expression of TGFB1 by macrophages or neutrophils, but some alveolar macrophages appeared to express TGFBRI.

For all staining, control sections were negative; a representative image in an affected lung is shown in figure 2I.

#### *TGFB1 signal transducer P-Smad2/3 immunoreactivity*

In healthy control lungs, P-Smad2/3 nuclear labeling was observed in some alveolar and bronchial epithelial cells (figure 3A). In the lungs of dogs with IPF, intense positive nuclear labeling was observed in the pathological alveolar epithelium (figure 3B).

#### *Gene expression of TGFB1 storage and activation proteins*

Relative LTBP1 and LTBP3 gene expression was not significantly different between the lungs of dogs with IPF and control dogs, but LTBP4 gene expression was decreased in IPF (figure 1B, C and D). Integrin  $\alpha\beta6$  and  $\alpha\beta8$  are heterodimeric molecules containing 2 distinct chains: the  $\alpha$  chain is common to many integrins while the  $\beta6$  chain is specific to  $\alpha\beta6$  and the  $\beta8$  chain to  $\alpha\beta8$ . The expression of the 2  $\beta$  subunits (ITGB6 and ITGB8) was measured. ITGB6 gene expression was not significantly different between the two groups ( $p=0.054$ ). Expression of ITGB8 was significantly lower ( $p<0.001$ ) and THBS1 expression was significantly higher ( $p=0.016$ ) in IPF relative to control (figure 4).

#### *Gene expression of the inhibitory Smad 7*

The expression level of Smad7 in pulmonary tissues of dogs with IPF was not significantly different from that of control dogs ( $p=0.834$ ) (figure 4).

#### *Serum TGFB1 concentration*

No significant difference in serum TGFB1 concentration was observed between WHWTs with IPF (mean  $\pm$  standard error of the mean:  $59.2 \pm 3.9$ ng/mL) and healthy WHWTs ( $66.0 \pm 4.1$ ,  $p=0.202$ ) (figure 5). The multivariate analysis performed on all healthy dogs shown no age influence ( $p=0.2363$ ), but a highly significant breed effect ( $p<0.0001$ ). Serum TGFB1 concentration was significantly higher in WHWTs compared with all breeds except for the Scottish terrier. Serum concentrations in the Scottish terriers were significantly higher than those in the

Whippet, Belgian shepherd and Labrador. Serum concentration was also higher in the Bichon Frise compared with the Whippet, Belgian shepherd and Labrador (figure 6).

### **Discussion**

The present study demonstrated that an active TGF $\beta$ 1 signaling exists in affected lungs, especially at the level of the pathological epithelium, as revealed by an intense staining for the intracellular messenger P-Smad2/3 and for TGF $\beta$ R1 in epithelial cells. While there was no clear overexpression of TGF $\beta$ 1 gene, increased TGF $\beta$ 1 protein content was found in affected lungs with intense interstitial labelling. This study suggested that activation and storage pathways are also modified in IPF with decreased expression of LTBP4 and ITGB8 and increased expression of THBS1. TGF $\beta$ 1 circulated in higher concentration in predisposed breeds, which might partly explain their susceptibility. Based on TGF $\beta$ 1 well-known profibrotic properties and the findings of this study, we can speculate that TGF $\beta$ 1 is probably involved in IPF pathogenesis in dogs and modulation of its storage, activation or signaling represents potential therapeutic targets.

Potential mechanisms for TGF $\beta$ 1 signal regulation include changes in TGF $\beta$ 1 gene transcription, stability and translation of TGF $\beta$ 1 mRNA, post-translational modifications, storage and activation of TGF $\beta$ 1 latent complexes, inhibition of TGF $\beta$ 1 intracellular signaling and inactivation of TGF $\beta$ 1. Some of these mechanisms were examined in dogs with IPF. In human IPF, TGF $\beta$ 1 mRNA and protein have been reported to be elevated<sup>12,13</sup>. In the present study, no significant overexpression for TGF $\beta$ 1 gene expression was found in the lung tissue of affected WHWTs compared with controls, while clear extracellular TGF $\beta$ 1 protein labeling was detected in fibrotic areas. These findings suggested that regulation of TGF $\beta$ 1 gene transcription is not an important regulatory mechanism for the TGF $\beta$ 1 pathway in IPF. Indeed, this pathway is known to be mainly modulated at post-transcriptional stages<sup>16,31</sup>.

Immunohistochemistry was used to identify cells producing TGF $\beta$ 1, areas of TGF $\beta$ 1 storage and TGF $\beta$ 1 target cells. In normal canine lungs, there was extracellular accumulation of TGF $\beta$ 1 in connective tissue surrounding bronchi and bronchioles. This indicates that, in dogs, TGF $\beta$ 1 is present in the normal lung and mainly stored in the extracellular matrix. In the lungs of dogs with IPF, there was intense TGF $\beta$ 1 labeling of the fibrous matrix. This is a common finding in human IPF<sup>13,32,33</sup>, consistent with high amount of TGF $\beta$ 1 in fibrotic areas and increased TGF $\beta$ 1 extracellular storage. Even in areas with inflammation, no TGF $\beta$ 1 expression was seen in alveolar macrophages, suggesting that, unlike in man, in dog, macrophages are not a source of TGF $\beta$ 1<sup>31-33</sup>. However, in general, no strong intracellular labeling was seen in normal lung or in IPF tissues, which precluded identification of cells producing TGF $\beta$ 1. The antibody used in this study is raised against an epitope of the C-terminus tail of TGF $\beta$ 1. As this epitope is common to TGF $\beta$ 1 precursor and mature forms, this antibody should recognize both precursor and mature TGF $\beta$ 1. But, as already shown for antibodies directed again the aminoterminal region of TGF $\beta$ 1, one antibody may preferentially crossreact with the intracellular form of TGF $\beta$ 1, while another reacts with the extracellular TGF $\beta$ 1 storage form<sup>34</sup>. So the absence of intracellular labelling found here could either be due to the technic use or to an absence of TGF $\beta$ 1 expression.

Labeling for TGF $\beta$ R1 was seen in normal lung and in the lung of dogs with IPF in bronchial and bronchiolar epithelial cells as well as a weak expression in the smooth muscles. In normal lungs, pneumocytes did not express TGF $\beta$ R1. In contrast, there was strong labeling of individual alveolar epithelial cells and particularly hyperplastic pneumocytes in IPF tissues. These hyperplastic pneumocytes appear to be an important target for TGF $\beta$ 1 in IPF. In the lungs of dogs with IPF, some alveolar macrophages also expressed TGF $\beta$ R1. Therefore, lung macrophages may be another TGF $\beta$ 1 target cell in IPF. Surprisingly, there was mainly intracellular labeling for TGF $\beta$ R1, while membrane labeling might have been expected. However, TGF $\beta$ 1 receptors are

constitutively internalized via endocytic pathways<sup>35</sup> and this might explain the observed intracellular labeling.

The finding of an increased extracellular storage of TGF $\beta$ 1 in fibrotic areas and of a trend toward increased gene expression of TGF $\beta$ 1 prompted evaluation of whether increased TGF $\beta$ 1 signaling was also present in affected lungs. P-Smad2/3 was used as an indicator of TGF $\beta$ 1 signaling in IPF lung tissues. P-Smad2/3 nuclear expression was observed in both healthy control lungs and lungs of dogs with IPF, as shown previously in human lungs<sup>36</sup>. In healthy control lungs, some positive alveolar epithelial cells and bronchial epithelial cells were seen, consistent with a basal TGF $\beta$ 1 signaling activity. In the lungs of dogs with IPF, intense positive nuclear labeling was observed in the diseased alveolar epithelium, suggesting enhanced TGF $\beta$ 1 signaling at the level of activated epithelial cells.

Lung expression of LTBP $\beta$ s was evaluated. Of the 4 isoforms, all but LTBP2 can associate with the small latent TGF $\beta$ 1<sup>37</sup>. Besides acting as matrix components, LTBP $\beta$ s have important functions in the regulation of TGF $\beta$ 1 activity. They facilitate latent TGF $\beta$ 1 secretion, mediate distribution of latent TGF $\beta$ 1 in the extracellular matrix for storage and regulate latent TGF $\beta$ 1 activation. The present study showed that LTBP1, -3 and -4 are all expressed in normal canine lungs. In the lungs of dogs with IPF, LTBP1 and LTBP3 gene expression was unchanged compared with controls, while LTBP4 expression was lower in diseased lungs than in control lungs. It has been suggested that each LTBP isoform has specific properties<sup>38,39</sup>, but little is known about their specific functions.

Thereafter, the expression of 3 proteins involved in TGF $\beta$ 1 latent complex activation (integrin  $\alpha$  $\beta$ 6, integrin  $\alpha$  $\beta$ 8 and THBS1) was evaluated. In normal human lungs, integrins  $\alpha$  $\beta$ 6 and  $\alpha$  $\beta$ 8 are present at low levels<sup>36,40</sup>. The results of the present study suggest that in dogs, both integrins and THBS1 are expressed in normal lungs. Activation via integrin  $\alpha$  $\beta$ 6 is speculated to be mainly implicated in pathological responses such as in injury and inflammation<sup>18,40</sup>. In human IPF, overexpression of  $\alpha$  $\beta$ 6 is found within pneumocytes lining alveolar ducts and alveoli<sup>41</sup> and in epithelial cells of fibrotic areas<sup>36</sup>. Integrin  $\alpha$  $\beta$ 8 is normally highly expressed in human airway epithelium<sup>19</sup>, but its expression is sparse in the lung of patients with IPF<sup>36</sup>. In the lungs of dogs with IPF, ITGB6 gene expression was not significantly different compared with normal lungs, but ITGB8 gene expression was decreased. In the present study, increased expression of THBS1 was documented as well, suggesting that interaction with THBS1 might also be an important mechanism for TGF $\beta$ 1 activation in IPF as it is suspected in human IPF<sup>42,43</sup>.

Expression of Smad 7 is stimulated by TGF $\beta$ 1, suggesting a negative feedback mechanism<sup>23</sup>. A defective negative retro-control could enhance TGF $\beta$ 1 signaling. No difference in Smad 7 gene expression was seen between IPF and control dogs, suggesting that this inhibitory pathway is neither stimulated nor defective at the transcriptional level in IPF.

TGF $\beta$ 1 serum concentration was evaluated with the hypothesis that a high circulating concentration would be a marker of high TGF $\beta$ 1 lung activity in dogs with IPF and that it could be used as a biomarker. Surprisingly, no difference was seen between affected and healthy WHWTs, which precludes its use as a biomarker. However, the data demonstrated that TGF $\beta$ 1 circulates at elevated concentrations also in healthy dogs from breeds predisposed to IPF. In man, blood TGF $\beta$ 1 concentration is heritable<sup>44</sup> and genetic variants have been associated with increased susceptibility for IPF or to disease progression in IPF<sup>45-47</sup>. The present study suggested that serum TGF $\beta$ 1 concentrations might be genetically determined in the dog as well and that there might be a cause-effect relationship between high circulating TGF $\beta$ 1 and development of IPF. However, because not all dogs from predisposed breeds develop the disease, a high serum TGF $\beta$ 1 concentration is not sufficient by itself but might trigger an inappropriate lung response to injury leading to pulmonary fibrosis, as suggested in mouse<sup>48</sup>.

The main limitation of this study was that the control group was poorly age- and breed-matched. Concerning the effect of age, no significant effect was found on serum TGFB1 concentration; however we could not exclude that age might have an impact on the TGFB1 pathways locally and might have impacted the qRT-PCR and immunohistochemistry results. Unfortunately, pulmonary tissue from healthy WHWTs was not available and despite the fact that control dogs mainly included small-breed dogs from which 2 terriers, we could not excluded that breed, independently from the status affected or free of IPF, has an impact on the TGFB1 pathway locally. However, part of these results has been corroborated in a very recent immunohistochemical study<sup>49</sup> comparing healthy and affected WHWTs. In this study, the authors also found an increased P-Smad2/3 immunoreactivity in WHWTs with IPF at the level of the pathological epithelium in comparison with 3 healthy WHWTs; confirming the existence of an enhanced TGFB1 signaling activity in affected WHWTs. This study also analyzed the expression of LTBP1. Increased peribronchial and perivascular LTBP-1 immunoreactivity was seen in WHWTs with IPF compared with controls. Alveolar LTPB-1 immunolabeling in diseased WHWTs was seen mainly in the altered alveolar epithelium. Lack of concordance between these results and our findings about LBTP1 may refer to the different technical approaches used. Using qRT-PCR on whole lung samples, we cannot exclude a localized overexpression of LTBP1 by a minor cell type population, which will show up using immunohistochemistry. Another hypothesis is that regulation of LTBP1 gene transcription is not an important regulatory mechanism determining the amount of protein present in the tissue.

In conclusion, TGFB1 and its activating, storage and signaling pathways are modified in dogs with IPF with increased TGFB1 labeling and increased signaling activity in the pathological epithelium. TGFB1 activating pathways is altered with a shift toward increased activation via THBS1; highlighting a potential therapeutic target with modulation of TGFB1 activity via inhibition of THBS1. High circulating TGFB1 concentration is found in healthy dogs from predisposed breed which might at least partly explain their high susceptibility to IPF.

#### Footnotes

<sup>a</sup> CM.LAB, Vordingborg, Denmark

<sup>b</sup> Ambio Inc., Huntington, UK

<sup>c</sup> Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, USA

<sup>d</sup> Vector Laboratories Inc., Burlingame, California, USA

<sup>e</sup> Ser465/467, Millipore, Billerica, Massachusetts, USA

<sup>f</sup> Novocastra, Leica Biosystems Newcastle Ltd., Newcastle Upon Tyne, UK

<sup>g</sup> DAB, Leica Biosystems Newcastle Ltd., Newcastle Upon Tyne, UK

<sup>h</sup> Invitrogen, Carlsbad, California, USA

<sup>i</sup> Invitrogen, Merckbeke, Belgium

<sup>j</sup> ImProm-II Reverse Transcription System, Promega Corporation, Southampton, UK

<sup>k</sup> Qiagen Ltd, Crawley, UK

<sup>l</sup> Mouse/Rat/Porcine/Canine TGFB1 Quantikine ELISA kit, R&D systems, Minneapolis, USA

<sup>m</sup> SigmaStat, Systat Software, Inc., San Jose, California, USA and Statistical Analysis Systems, SAS Institute, Cary, North Carolina, USA)

#### References

1. Heikkila HP, Lappalainen AK, Day MJ, et al. Clinical, bronchoscopic, histopathologic, diagnostic imaging, and arterial oxygenation findings in West Highland White Terriers with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Vet Intern Med* 2011;25:433-439.

2. Corcoran BM, King LG, Schwarz T, et al. Further characterisation of the clinical features of chronic pulmonary disease in West Highland white terriers. *Vet Rec* 2011;168:355.
3. Heikkila-Laurila HP, Rajamaki MM. Idiopathic pulmonary fibrosis in west highland white terriers. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2014;44:129-142.
4. Syrja P, Heikkila HP, Lilja-Maula L, et al. The histopathology of idiopathic pulmonary fibrosis in West Highland white terriers shares features of both non-specific interstitial pneumonia and usual interstitial pneumonia in man. *J Comp Pathol* 2013;149:303-313.
5. Lobetti RG, Milner R, Lane E. Chronic idiopathic pulmonary fibrosis in five dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 2001;37:119-127.
6. Krafft E, Heikkila HP, Jespers P, et al. Serum and bronchoalveolar lavage fluid endothelin-1 concentrations as diagnostic biomarkers of canine idiopathic pulmonary fibrosis. *J Vet Intern Med* 2011;25:990-996.
7. Heikkila HP, Krafft E, Jespers P, et al. Procollagen type III amino terminal propeptide concentrations in dogs with idiopathic pulmonary fibrosis compared with chronic bronchitis and eosinophilic bronchopneumopathy. *Vet J* 2013;196:52-56.
8. Krafft E, Laurila HP, Peters IR, et al. Analysis of gene expression in canine idiopathic pulmonary fibrosis. *Vet J* 2013;198:479-486.
9. Sheppard D. Transforming growth factor beta: a central modulator of pulmonary and airway inflammation and fibrosis. *Proc Am Thorac Soc* 2006;3:413-417.
10. Hiwatari N, Shimura S, Yamauchi K, et al. Significance of elevated procollagen-III-peptide and transforming growth factor-beta levels of bronchoalveolar lavage fluids from idiopathic pulmonary fibrosis patients. *The Tohoku J Exp Med* 1997;181:285-295.
11. Yong SJ, Adlakha A, Limper AH. Circulating transforming growth factor-beta(1): a potential marker of disease activity during idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 2001;120:68S-70S.
12. Coker RK, Laurent GJ, Jeffery PK, et al. Localisation of transforming growth factor beta1 and beta3 mRNA transcripts in normal and fibrotic human lung. *Thorax* 2001;56:549-556.
13. Broekelmann TJ, Limper AH, Colby TV, et al. Transforming growth factor beta 1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:6642-6646.
14. Bergeron A, Soler P, Kambouchner M, et al. Cytokine profiles in idiopathic pulmonary fibrosis suggest an important role for TGF-beta and IL-10. *Eur Respir J* 2003;22:69-76.
15. Sime PJ, O'Reilly KM. Fibrosis of the lung and other tissues: new concepts in pathogenesis and treatment. *Clin Immunol* 2001;99:308-319.
16. Todorovic V, Rifkin DB. LTBPs, more than just an escort service. *J Cell Biochem* 2012;113:410-418.
17. Nishimura SL. Integrin-mediated transforming growth factor-beta activation, a potential therapeutic target in fibrogenic disorders. *Am J Pathol* 2009;175:1362-1370.
18. Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, et al. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 1999;96:319-328.
19. Mu D, Cambier S, Fjellbirkeland L, et al. The integrin alpha(v)beta8 mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF-beta1. *J Cell Biol* 2002;157:493-507.
20. Murphy-Ullrich JE, Poczatek M. Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000;11:59-69.
21. Ribeiro SM, Poczatek M, Schultz-Cherry S, et al. The activation sequence of thrombospondin-1 interacts with the latency-associated peptide to regulate activation of latent transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 1999;274:13586-13593.

22. Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, et al. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell* 1998;93:1159-1170.
23. Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J* 2000;19:1745-1754.
24. Vercelli A, Bellone G, Abate O, et al. Expression of transforming growth factor-beta isoforms in the skin, kidney, pancreas and bladder in a German shepherd dog affected by renal cystadenocarcinoma and nodular dermatofibrosis. *J Vet MedA Physiol Pathol Clin Med* 2003;50:506-510.
25. Jugdutt BI, Palaniyappan A, Uwiera RR, et al. Role of healing-specific-matricellular proteins and matrix metalloproteinases in age-related enhanced early remodeling after reperfused STEMI in dogs. *Mol Cell Biochem* 2009;322:25-36.
26. Obayashi K, Miyagawa-Tomita S, Matsumoto H, et al. Effects of transforming growth factor-beta3 and matrix metalloproteinase-3 on the pathogenesis of chronic mitral valvular disease in dogs. *Am J Vet Res* 2011;72:194-202.
27. Yu CH, Yhee JY, Kim JH, et al. Pro- and anti-inflammatory cytokine expression and histopathological characteristics in canine brain with traumatic brain injury. *J Vet Sci* 2011;12:299-301.
28. Moyano JV, Greciano PG, Buschmann MM, et al. Autocrine transforming growth factor-beta 1 activation mediated by integrin alpha V beta 3 regulates transcriptional expression of laminin-332 in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Mol Biol Cell* 2010;21:3654-3668.
29. Peters IR, Peeters D, Helps CR, et al. Development and application of multiple internal reference (housekeeper) gene assays for accurate normalisation of canine gene expression studies. *Vet Immunol Immunopathol* 2007;117:55-66.
30. Peeters D, Peters IR, Farnir F, et al. Real-time RT-PCR quantification of mRNA encoding cytokines and chemokines in histologically normal canine nasal, bronchial and pulmonary tissue. *Vet Immunol Immunopathol* 2005;104:195-204.
31. Khalil N, Parekh TV, O'Connor R, et al. Regulation of the effects of TGF-beta 1 by activation of latent TGF-beta 1 and differential expression of TGF-beta receptors (T beta R-I and T beta R-II) in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 2001;56:907-915.
32. Khalil N, O'Connor RN, Flanders KC, et al. TGF-beta 1, but not TGF-beta 2 or TGF-beta 3, is differentially present in epithelial cells of advanced pulmonary fibrosis: an immunohistochemical study. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996;14:131-138.
33. Khalil N, O'Connor R, Unruh H, et al. Enhanced expression and immunohistochemical distribution of transforming growth factor-beta in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 1991;99:65S-66S.
34. Flanders KC, Thompson NL, Cissel DS, et al. Transforming growth factor-beta 1: histochemical localization with antibodies to different epitopes. *J Cell Biol* 1989;108:653-660.
35. Chen YG. Endocytic regulation of TGF-beta signaling. *Cell Res* 2009;19:58-70.
36. Lepparanta O, Sens C, Salmenkivi K, et al. Regulation of TGF-beta storage and activation in the human idiopathic pulmonary fibrosis lung. *Cell Tissue Res* 2012;348:491-503.
37. Saharinen J, Keski-Oja J. Specific sequence motif of 8-Cys repeats of TGF-beta binding proteins, LTBP, creates a hydrophobic interaction surface for binding of small latent TGF-beta. *Mol Biol Cell* 2000;11:2691-2704.
38. Vehvilainen P, Koli K, Myllarniemi M, et al. Latent TGF-beta binding proteins (LTBPs) 1 and 3 differentially regulate transforming growth factor-beta activity in malignant mesothelioma. *Hum Pathol* 2011;42:269-278.

39. Klopfleisch R, Schütze M, Gruber AD. Downregulation of transforming growth factor [beta] (TGF[beta]) and latent TGF[beta] binding protein (LTBP)-4 expression in late stage canine mammary tumours. *Vet J* 2010;186:379-384.
40. Breuss JM, Gallo J, DeLisser HM, et al. Expression of the beta 6 integrin subunit in development, neoplasia and tissue repair suggests a role in epithelial remodeling. *J Cell Sci* 1995;108:2241-2251.
41. Horan GS, Wood S, Ona V, et al. Partial inhibition of integrin alpha(v)beta6 prevents pulmonary fibrosis without exacerbating inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:56-65.
42. Kuhn C, Mason RJ. Immunolocalization of SPARC, tenascin, and thrombospondin in pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 1995;147:1759-1769.
43. Ide M, Ishii H, Mukae H, et al. High serum levels of thrombospondin-1 in patients with idiopathic interstitial pneumonia. *Respir Med* 2008;102:1625-1630.
44. Grainger DJ, Heathcote K, Chiano M, et al. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1. *Hum Mol Genet* 1999;8:93-97.
45. Son JY, Kim SY, Cho SH, et al. TGF-beta1 T869C Polymorphism May Affect Susceptibility to Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Disease Severity. *Lung* 2013;191:199-205.
46. Li XX, Li N, Ban CJ, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis in relation to gene polymorphisms of transforming growth factor-beta1 and plasminogen activator inhibitor 1. *Chin Med J* 2011;124:1923-1927.
47. Xaubet A, Marin-Arguedas A, Lario S, et al. Transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms are associated with disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:431-435.
48. Haider Y, Malizia AP, Keating DT, et al. Host predisposition by endogenous Transforming Growth Factor-beta1 overexpression promotes pulmonary fibrosis following bleomycin injury. *J Inflamm (Lond)* 2007;4:18.
49. Lilja-Maula L, Syrja P, Laurila HP, et al. Comparative Study of Transforming Growth Factor-beta Signalling and Regulatory Molecules in Human and Canine Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *J Comp Pathol* 2013.

## Figure Legends

Figure 1

Pulmonary gene expression levels of (A) transforming growth factor beta 1 (TGFB1), (B) latent transforming growth factor binding protein 1 (LTBP1), (C) LTBP3 and (D) LTBP4 measured by real-time quantitative reverse transcriptase-PCR in West Highland white terriers with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF, n=12) vs. control dogs (n=11). Results are presented as box plots: the lower, middle and upper lines of each box represent the 1st, 2nd and 3rd quartiles, respectively. The whiskers delineate the 10th and 90th percentiles. Dots show the maximum and minimum values.

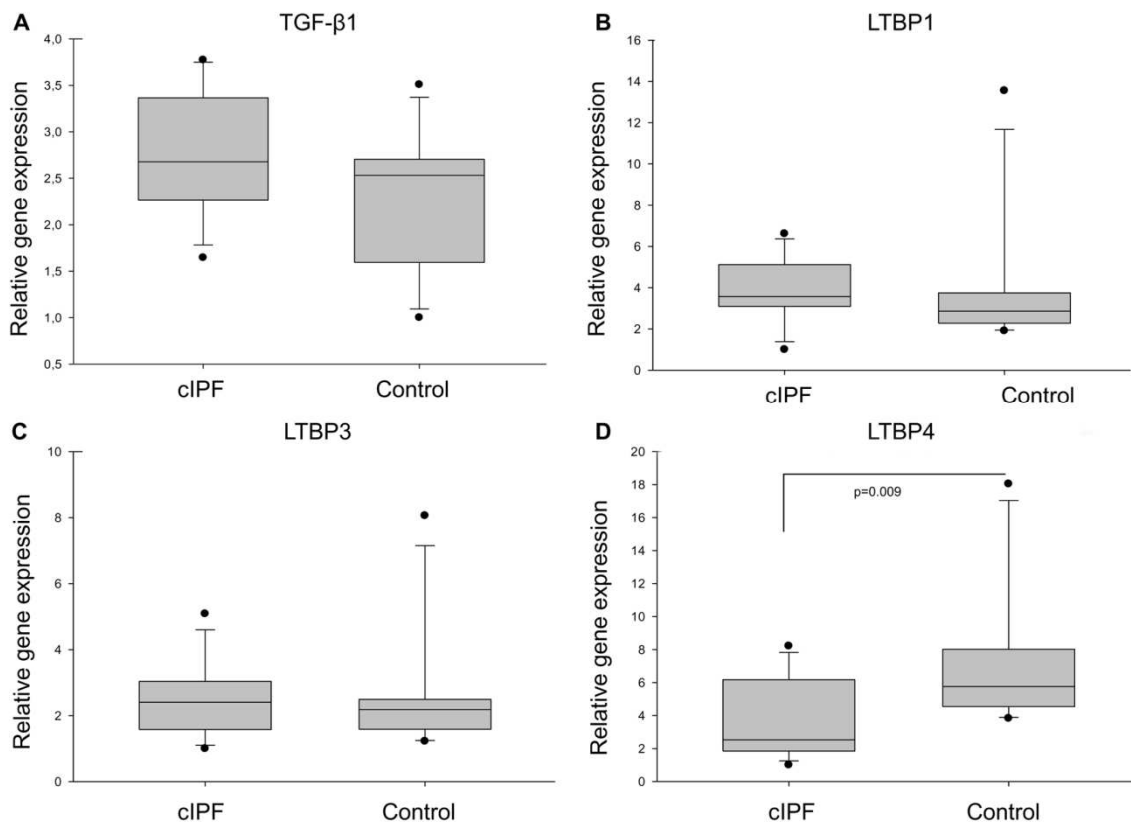




Figure 2

Transforming growth factor beta 1 (TGFB1) immunoreactivity in healthy control (A: bronchial area, E: alveolar area) and in West Highland white terrier with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) (B: bronchial area, F: alveolar area). TGFB receptor type I (TGFBR1) immunoreactivity in healthy control lung (C: bronchial areas) and in affected WHWT (D: bronchial area, G: alveolar area and H closer view). Control staining with rabbit IgG in an affected WHWT in I.

\* diffuse and intense staining. Arrows: distinct apical expression in bronchial and bronchiolar epithelial cells in C and D, strong labeling of individual alveolar epithelial cells in H.

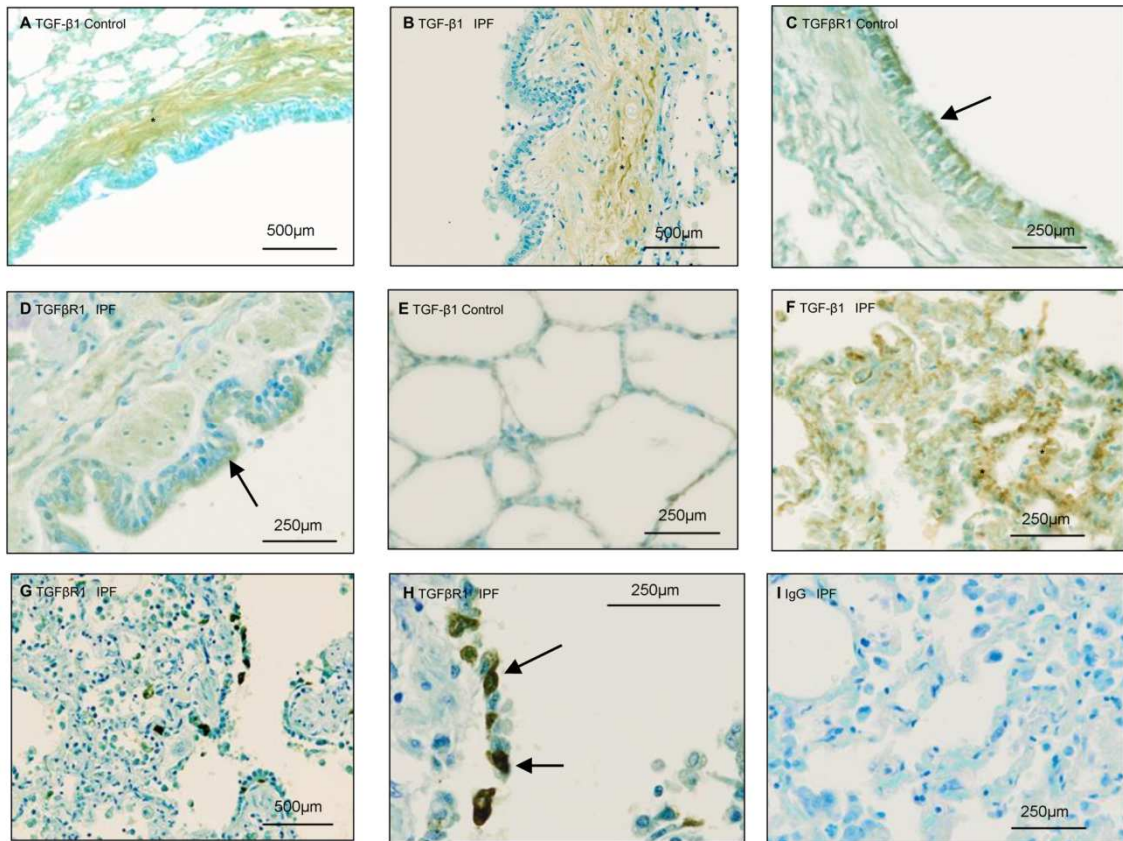


Figure 3

Phosphorylated Smad2/3 immunoreactivity in healthy control lung (A) showing positive (brown) bronchial epithelial nuclear staining and in West Highland white terrier with idiopathic pulmonary fibrosis (B, IPF) showing an intense positive nuclear labeling in the pathological alveolar epithelium (arrows).

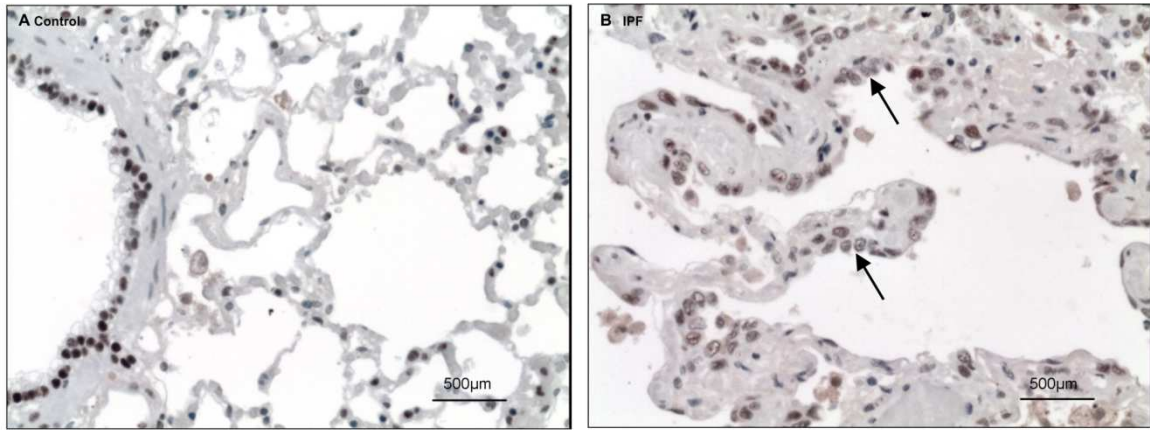


Figure 4

Pulmonary gene expression levels of (A) integrin chain  $\beta 6$  (ITGB6), (B) integrin chain  $\beta 8$  (ITGB8), (C) thrombospondin-1 (THBS1) and (D) Smad 7 measured by real-time quantitative reverse transcriptase-PCR in West Highland white terriers with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF, n=12) vs. control dogs (n=11) and represented as box plot.

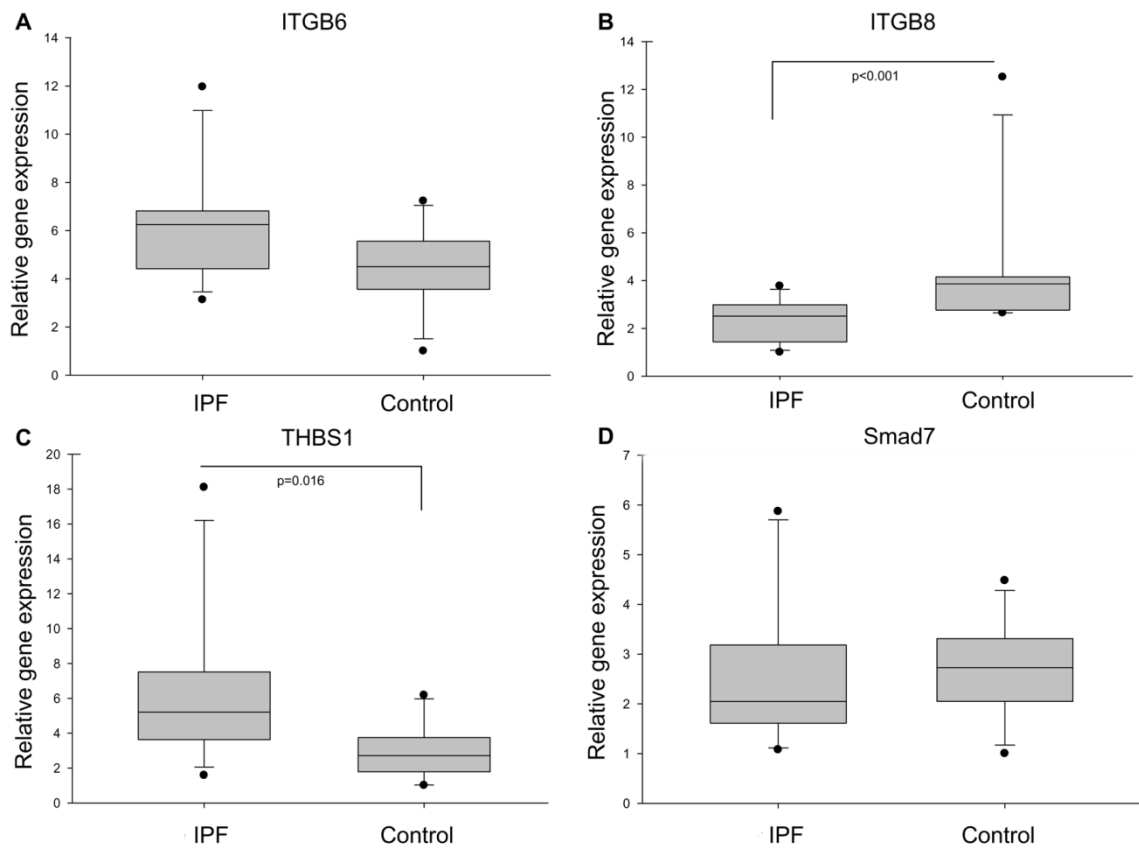


Figure 5

Serum transforming growth factor beta 1 (TGFB1) concentration measured by ELISA in West Highland white terriers (WHWTs) with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF, n=16) and in healthy WHWTs (n=13). Results are presented as dot-plots. The vertical bars indicate the mean  $\pm$  the standard error of the mean.

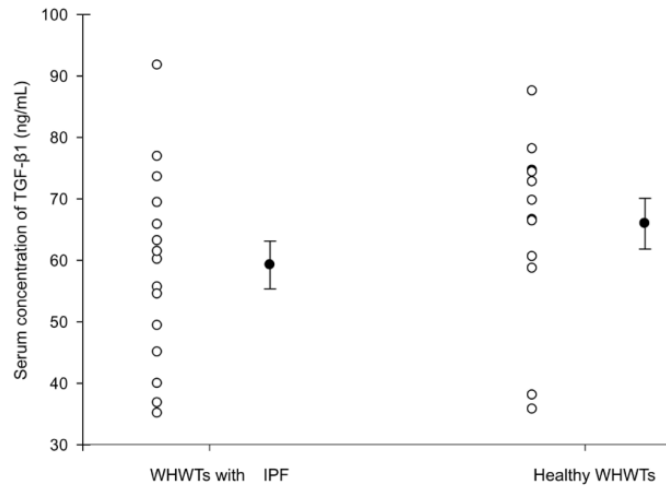
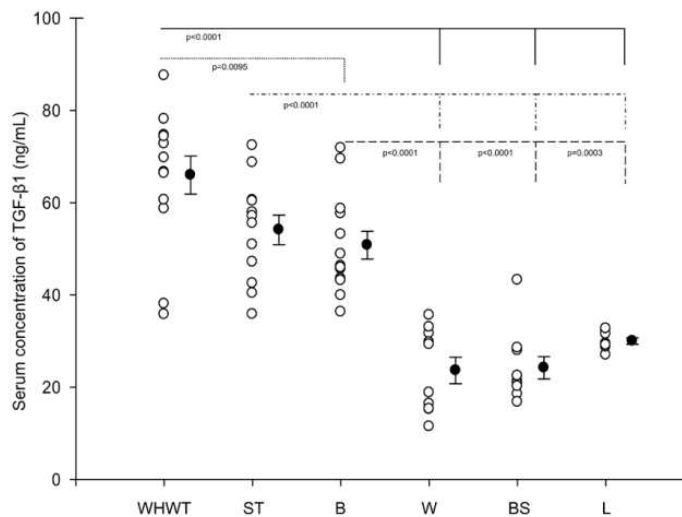


Figure 6

Serum transforming growth factor beta 1 (TGFB1) concentration measured by ELISA in healthy dogs (n=66) from breeds with different predispositions to idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), including the highly predisposed West Highland white terrier (WHWTs, n=13), 2 breeds reported to be mildly or moderately predisposed: the Scottish terrier (ST, n=12), and the Bichon Frise (B, n=13) and 3 breeds considered to be non-predisposed: the Whippet (W, n=10), the Belgian shepherd (BS, n=10) and the Labrador (L, n=8). Results are presented as dot-plots. The vertical bars indicate the mean  $\pm$  the standard error of the mean.



## 4. Etude 3 : La sérotonine dans la FPIc

### 4.1 Introduction

La sérotonine, également appelée 5-hydroxytryptamine, est une monoamine synthétisée à partir du tryptophane dans le système nerveux central mais également par les cellules entérochromaffines du tractus gastro-intestinal. La sérotonine sécrétée par les cellules entérochromaffines est libérée dans le torrent circulatoire puis stockée par les plaquettes qui la prennent en charge ou la libèrent par l'intermédiaire de son transporteur (5HTT ou SERT).

Nous nous sommes intéressés à la sérotonine dans la FPIc d'abord en raison de l'évocation récente de son implication dans la pathogénie de la FPI chez l'homme. En effet, même si elle est principalement connue pour son rôle de neurotransmetteur, elle a également de nombreuses fonctions régulatrices à l'extérieur du système nerveux central (Frishman et Grewal, 2000), par l'intermédiaire de 7 sous-types différents de récepteurs (Hoyer *et al.*, 2002; Noda *et al.*, 2004). Au-delà de ses rôles physiologiques, elle est impliquée entre autres dans des processus fibrotiques tels que la fibrose hépatique (Ruddell *et al.*, 2006) ou l'endocardiose mitrale (Fox et Khattar, 2004; Disatian et Orton, 2009). Ces propriétés profibrotiques sont principalement médiées par l'intermédiaire des récepteurs de type 2A (5HTR2A) et 2B (5HTR2B) et sont notamment liées à une induction de la synthèse de TGFB1 (Grewal *et al.*, 1999). Dans une étude récente consacrée à l'étude de l'implication de la sérotonine dans la FPI chez l'homme (Konigshoff *et al.*, 2010), l'expression des récepteurs de type 1A, 1B et 2B était augmentée au niveau pulmonaire chez les patients atteints de FPI ou de pneumopathie interstitielle non spécifique idiopathique en comparaison de donneurs sains alors que l'expression du récepteur 5HTR2A était augmentée spécifiquement lors de FPI. Les récepteurs 5HTR2A et 5HTR2B étaient concentrés respectivement au niveau des fibroblastes et de l'épithélium. Le blocage de signalisation de la sérotonine par l'administration d'un antagoniste non sélectif de 5HTR2A et 2B permettait une réduction des lésions de fibrose dans le modèle expérimental murin induit par la bléomycine.

L'analyse du profil d'expression de la FPIc réalisée précédemment avait également mis en avant les voies de la sérotonine. Le récepteur 5HTR2B faisait partie des gènes avec un différentiel d'expression important entre le pool de chiens atteints et de chiens sains, avec un « fold-change » de 5,2. Pour les autres récepteurs, les résultats n'étaient pas interprétables, l'intensité observée pour les sondes correspondantes n'étant pas significativement différente du bruit de fond. Le « fold-change » était de -1,96 pour le 5HTT, donc juste supérieur au seuil arbitraire choisi.

Enfin, la sérotonine avait déjà été évaluée comme biomarqueur chez le chien dans l'endocardiose mitrale. Une concentration sérique plus élevée a d'abord été mise en évidence chez les chiens atteints mais également chez des chiens de petites races, en particulier le cavalier King Charles spaniel, en comparaison de chiens sains de grandes races (Arndt *et al.*, 2009). Une étude très récente (Ljungvall *et al.*, 2013) a confirmé la présence d'une concentration sérique en sérotonine plus élevée chez le cavalier King Charles. Chez les chiens atteints d'endocardiose mitrale, une association inverse a également été notée entre la concentration sérique et la sévérité de la cardiopathie, une concentration plus faible étant observée chez les chiens les plus atteints en comparaison de ceux avec une endocardiose débutante.

En regard de l'ensemble de ces résultats, nous avons décidé d'analyser par qRT-PCR une partie des voies de la sérotonine au niveau pulmonaire (5HTR2A et 2B et 5HTT) chez des chiens atteints de FPIc en comparaison de chiens sains. Nous avons également évalué la concentration sérique en sérotonine afin de déterminer si elle circule à des taux plus élevés chez les chiens atteints de FPIc en comparaison de chiens sains et de chiens atteints d'autres affections

respiratoires chroniques. L'objectif était ainsi de déterminer si la sérotonine pouvait être impliquée dans la pathogénie de la FPIc et si elle pouvait avoir un intérêt en tant que biomarqueur.

## 4.2 Matériel et méthode

### 4.2.1 Animaux

Du tissu pulmonaire a été obtenu à partir de 14 chiens avec un diagnostic de FPIc confirmé par histologie (12 WHWT, 1 Scottish terrier et 1 Lhasa Apso, d'âge moyen 13 ans) et 11 chiens contrôles (de différentes races et d'âge moyen 6,3 ans). Ces chiens contrôles avaient été euthanasiés pour des raisons autres qu'une atteinte cardiopulmonaire ou une maladie systémique et l'analyse histologique des tissus pulmonaires a confirmé la présence d'une architecture pulmonaire normale.

Afin d'évaluer l'intérêt potentiel de la sérotonine en tant que biomarqueur diagnostique, du sérum a été collecté chez 13 chiens avec FPIc (10 WHWT, 2 Scottish terriers, 1 Yorkshire terrier, d'âge moyen 11,6 ans), 9 chiens avec bronchite chronique (de différentes races et d'âge moyen 9,3 ans), 10 chiens avec bronchopneumopathie éosinophilique (de différentes races et d'âge moyen 7,5 ans) et 10 WHWT sains (âge moyen 9,4 ans).

Le diagnostic clinique de FPIc a été basé sur la présence de signes cliniques compatibles et sur l'exclusion des autres affections cardiorespiratoires chroniques par radiographies thoraciques, bronchoscopie, analyse du LLBA, échocardiographie et coproscopie ainsi que sur les résultats de la TDM-HR (Heikkila *et al.*, 2011; Heikkila-Laurila et Rajamaki, 2014). Tous les chiens ont été euthanasiés par la suite en raison d'une détérioration de leur fonction respiratoire, et le diagnostic de FPIc a été confirmé par histologie. Le statut des chiens sains était basé sur l'anamnèse (absence de signes cliniques en faveur d'une pathologie cardiorespiratoire ou d'une atteinte systémique) et sur les résultats des différents examens (hématologie, biochimie, gaz sanguin, bronchoscopie et TDM-HR).

### 4.2.2 Prélèvements

Les échantillons de tissu pulmonaire ont été obtenus dans les 30 minutes suivant l'euthanasie. Pour permettre la conservation de l'ARN, ils ont ensuite été placés dans un cryotube<sup>1</sup> de 1,5mL, puis soit surgelés dans l'azote liquide et directement stockés à -80°C, soit mis en contact avec du RNA later<sup>2</sup>, réfrigérés à 4°C jusqu'au lendemain et ensuite placés à -80°C. Le sang a été collecté sur tube sec puis, après 30 min, centrifugé à 4°C et 3000g durant 15 min. Le sérum obtenu a été stocké à -20°C jusqu'à analyse.

### 4.2.3 RT-PCR quantitative

L'ARN a isolé à partir du tissu pulmonaire grâce au kit d'extraction Micro to Mini Total RNA™ extraction kit<sup>3</sup> et sa qualité vérifiée, comme décrits précédemment (Krafft *et al.*, 2013). Les gènes TATA box binding protein (TBP) et ribosomal protein S18 (RPS18) ont été utilisés comme gènes de référence non régulés pour normalisation de l'expression génique. Les amorces et sondes ont été conçues à partir des séquences GeneBank pour 5HRT2A (XM\_534122), 5HTR2B (NM\_001024633) et 5HTT (XM\_548304) comme décrit précédemment (Peeters *et al.*, 2005). Les RT-PCR ont été réalisées selon un format 2 tubes- 2 enzymes à l'aide d'une reverse transcriptase<sup>4</sup> et du Hot-Start Taq Master Mix<sup>5</sup>, comme décrit précédemment. Un contrôle négatif constitué d'eau

<sup>1</sup> CM.LAB, Vordingborg, Danemark

<sup>2</sup> Ambio Inc., Huntington, UK

<sup>3</sup> i Invitrogen, Merckelbeke, Belgique

<sup>4</sup> ImProm-II Reverse Transcription System, Promega Corporation, Southampton, UK

<sup>5</sup> Qiagen Ltd, Crawley, UK

sans nucléase et un contrôle positif avec une valeur de Ct connue ont été inclus sur chaque plaque et l'expression d'un seul gène a été évaluée par plaque. Les réactions ont été réalisées en double pour chaque échantillon de cDNA et une valeur moyenne a été calculée.

#### 4.2.4 Dosage sérique de la sérotonine

La concentration sérique en sérotonine a été mesurée à l'aide d'un kit ELISA<sup>6</sup> (évalué et utilisé précédemment chez le chien (Arndt *et al.*, 2009)), selon les instructions du fabricant.

#### 4.2.5 Analyse statistique

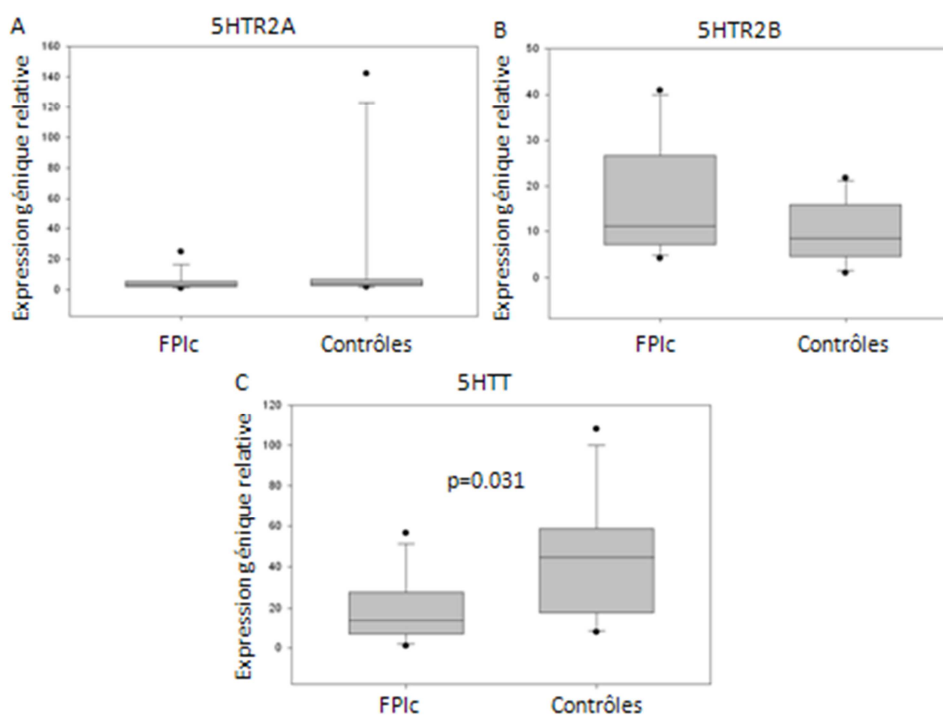
L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un logiciel commercial<sup>7</sup>. Une quantification relative de l'expression génique a été réalisée selon la méthode  $\Delta$ Ct. Les expressions géniques dans les deux groupes ont été comparées à l'aide d'un test de Mann-Whitney. La concentration sérique en sérotonine dans chaque groupe a ensuite été comparée à l'aide d'un test t de Student et d'une analyse de variance (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks). Le seuil de significativité a été défini pour un  $p < 0,05$ .

### 4.3 Résultats

L'expression des deux récepteurs (5HTR2A, 5HTR2B) n'était pas différente entre les chiens avec FPIc et les chiens contrôles, alors que l'expression du transporteur (5HTT) était significativement plus faible dans le groupe FPIc.

Figure 19 : Taux d'expression pulmonaire (A) du récepteur de la sérotonine de type 2A (5HTR2A), (B) du récepteur de la sérotonine de type 2B (5HTR2B) et (C) du transporteur de la sérotonine (5HTT) chez des chiens avec fibrose pulmonaire idiopathique canine (FPIc, n=14) et des chiens contrôles (n=11).

Les résultats sont présentés sous la forme de Box plot.

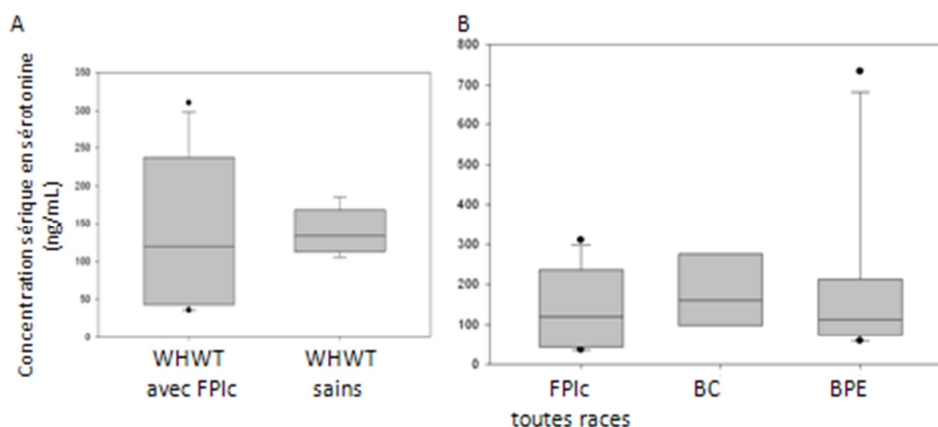


<sup>6</sup> Serotonin ELISA, Demeditec Diagnostics GmbH, Allemagne

<sup>7</sup> SigmaStat, Systat Software, Inc., San Jose, California, USA

Chez les WHWT, la concentration sérique en sérotonine n'était pas différente entre les chiens atteints de FPIc et les chiens sains. Aucune différence n'a également été mise en évidence entre les chiens avec FPIc et les chiens avec bronchite chronique ou bronchopneumopathie éosinophilique.

Figure 20 : Concentration sérique en sérotonine (A) chez des West Highland white terriers (WHWT) atteints de fibrose pulmonaire idiopathique canine (FPIc, n=10) en comparaison de WHWT sains (n=10) ; (B) chez des chiens atteints de FPIc (toutes races, n=13) en comparaison de chiens atteints de bronchite chronique (BC, n=9) et de bronchopneumopathie éosinophilique (BPE, n=10)



#### 4.4 Discussion

Les résultats obtenus indiquent tout d'abord que la sérotonine ne semble pas avoir d'intérêt en tant que biomarqueur sérique dans la FPIc, aucune différence n'ayant été mise en évidence entre les différents groupes. Par ailleurs, ces résultats combinés à l'absence de modification de l'expression des récepteurs 5HRT2A et 5HTR2B, classiquement impliqués dans les processus profibrotiques, ne sont pas en faveur d'une modification des voies de la sérotonine dans la FPIc et donc de son implication dans la pathogénie. Une expression pulmonaire plus faible du transporteur 5HTT a toutefois été notée dans notre étude chez les chiens atteints de FPIc en comparaison de chiens sains, résultats comparables à ceux obtenus chez les hommes atteints de FPI (Konigshoff *et al.*, 2010). La régulation négative de l'expression du 5HTT peut avoir un impact sur la quantité de sérotonine présente au sein du tissu. En effet si le 5HTT est nécessaire pour la capture et le stockage de la sérotonine au sein des plaquettes, il intervient également dans la prise en charge de la sérotonine puis son inactivation par les cellules exprimant la monoamine oxydase (Ni et Watts, 2006; Brenner *et al.*, 2007). Le 5HTT est ainsi la principale voie de clairance de la sérotonine par les cellules pulmonaires. Une diminution de l'expression du 5HTT au niveau pulmonaire pourrait ainsi augmenter la quantité de sérotonine disponible pour se lier aux récepteurs, et ce même en présence d'une quantité normale de sérotonine dans le sang. Une diminution importante de l'expression du 5HTT a également déjà été notée au sein des valves mitrales en phase avancée de cardiopathie mais pas en phase débutante, suggérant que cette régulation négative du transporteur n'interviendrait pas dans la phase d'initiation des lésions (Scruggs *et al.*, 2010).

Ces premiers résultats n'indiquent pas une altération majeure des taux circulants de sérotonine et de ses voies de signalisation au sein des poumons lors de FPIc. Même si ces données ne suggèrent pas un rôle prépondérant de la sérotonine dans la pathogénie de la FPIc, la régulation négative de l'expression du 5HTT pourrait conduire à une accumulation de sérotonine au sein des

poumons, où elle pourrait participer au processus de fibrose. Il s'agit toutefois de spéculations et d'autres études sont nécessaires pour conclure.



## **5. Etude 4 : La concentration en endothéline-1 (ET1) dans le sérum et le liquide de lavage bronchoalvéolaire en tant que biomarqueur diagnostique de la FPIc**

L'ET1 appartient à la famille des endothélines comportant 3 peptides vasoactifs (endothéline-1, 2 et 3) avec des structures comparables (Rubanyi et Polokoff, 1994). L'endothéline-1 (ET1) est vasoactive mais a également des propriétés pro-inflammatoires et profibrotiques (Rubanyi et Polokoff, 1994; Teder et Noble, 2000). L'ET1 a été choisie comme biomarqueur candidat de la FPIc, tout d'abord pour son intérêt prouvé dans la FPI humaine. L'ET1 est en effet présente en quantité augmentée dans le sérum (Ugucioni *et al.*, 1995) et le LLBA (Reichenberger *et al.*, 2001) chez les patients atteints de FPI. L'ET1 est également surexprimée chez les patients atteints de FPI : une quantité augmentée d'ARNm (Saleh *et al.*, 1997), ainsi que de l'immunoréactivité en endothéline par immunohistochimie ont été notées dans le tissu pulmonaire (Giaid *et al.*, 1993; Ugucioni *et al.*, 1995).

Par ailleurs, l'ET1 a déjà été étudiée en médecine vétérinaire en tant que biomarqueur dans différentes affections cardiorespiratoires. Une augmentation significative de la concentration plasmatique en ET1 a d'abord été notée en phase d'insuffisance cardiaque par rapport aux chiens sains et aux chiens atteints de cardiopathies compensées (Prosek *et al.*, 2004). Dans cette étude, la concentration plasmatique en ET1 était également corrélée à différents marqueurs échocardiographiques de surcharge volumique et de fonction systolique ; ce qui suggérait que l'ET1 pourrait être un marqueur de progression de l'insuffisance cardiaque. Une autre étude (Tessier-Vetzel *et al.*, 2006) a, par la suite, mis en évidence une influence significative du stade « ISACHC » (International Small Animal Cardiac Health Council), toutes cardiopathies confondues, sur la concentration plasmatique en ET1 ainsi qu'une corrélation positive entre le taux en ET1 et la pression dans l'artère pulmonaire en systole. Néanmoins, dans une autre étude portant sur l'endocardiose mitrale (Piantedosi *et al.*, 2009), aucune corrélation n'était mise en évidence entre le stade d'insuffisance cardiaque et la concentration plasmatique en ET1. L'intérêt de l'ET1 pour différencier affections cardiaques et respiratoires a été étudié dans deux publications. Dans la première étude (Tessier-Vetzel *et al.*, 2006), pour une affection de sévérité moyenne, une concentration plasmatique plus élevée était rencontrée lors de cardiopathies que lors d'affections respiratoires. Néanmoins, aucune différence significative n'était mise en évidence lors d'atteinte plus sévère. Dans la seconde étude (Prosek *et al.*, 2007), la concentration plasmatique en ET1 permettait de différencier les dyspnées d'origine cardiaque et non cardiaque avec une bonne sensibilité / spécificité. Néanmoins des performances supérieures étaient notées pour deux autres biomarqueurs étudiés : propeptide atrial natriurétique N terminal (NT-pro ANP) et peptide natriurétique de type B (BNP).

Même si aucun kit commercial n'existait pour la mesure de l'ET1 dans l'espèce canine, ce dosage était facilement réalisable. En effet, une homologie de 100% a été mise en évidence entre les séquences canine et humaine de l'ET1 (Biondo *et al.*, 2003) et les performances de différents kits humains avaient déjà été évaluées précédemment (Schellenberg *et al.*, 2008) ; le kit ELISA de chez IBL (Endothelin-1 Assay kit, Immuno-Biological Laboratories Co., Takasaki-Shi, Gunma, Japan) présentant les meilleures précision et linéarité a donc été choisi pour cette étude. Ce kit n'était validé que sur plasma, sérum et surnageant de culture cellulaire. Néanmoins, le dosage de l'ET1 dans le LLBA avait déjà été effectué chez l'homme et chez le cheval et a pu être réalisé avec ce kit chez le chien ; la seule limite étant le seuil de détection, les concentrations dans le LLBA étant faibles.

Afin d'évaluer l'ET1 en tant que biomarqueur, il était nécessaire de la mesurer chez des chiens atteints en comparaison de chiens sains pour vérifier que la présence de cette maladie

s'accompagne d'une modification des taux en ET1, mais également chez des chiens atteints d'autres pathologies respiratoires afin de déterminer la sensibilité et la spécificité au sein d'une population avec des signes cliniques et biologiques comparables. La FPIc étant majoritairement rencontrée chez des chiens âgés et de race WHWT, l'âge et la race sont deux facteurs confondants à prendre en compte dans des études portant sur la FPIc. Deux groupes sains de race différente ont donc été inclus pour évaluer cet effet race. L'ET1 a donc été mesurée chez des chiens atteints de FPI (groupe composé quasi exclusivement de WHWT), de bronchite chronique, principal diagnostic différentiel de la FPIc, et de bronchopneumopathie éosinophilique et également chez deux populations de chiens sains : un groupe de WHWT et un groupe de Beagles issus du chenil expérimental de la faculté. Cette étude s'est principalement intéressée à la concentration sérique (facilité d'obtention en pratique courante, absence de problème de sensibilité de la méthode).

Aucune différence pour la concentration sérique en ET1 n'a d'abord été mise en évidence entre les deux groupes sains (WHWT et Beagles), suggérant que la race n'a pas d'effet sur la concentration sérique en ET1. Une analyse de covariance a donc ensuite été réalisée sur l'ensemble des chiens pour étudier l'effet de l'âge et du statut. En accord avec les résultats obtenus dans une autre étude (Tessier-Vetzel *et al.*, 2006), aucun effet significatif de l'âge n'a été mis en évidence. La concentration sérique en ET1 était par contre significativement différente en fonction du statut, avec une valeur plus élevée dans le groupe avec FPIc en comparaison des chiens sains et des chiens atteints de bronchite chronique et de bronchopneumopathie éosinophilique, confirmant l'intérêt de l'ET1 comme biomarqueur. Une analyse de la courbe ROC a ensuite été réalisée pour en évaluer les performances et identifier une valeur seuil idéale. Ainsi dans cette étude, une valeur en ET1 supérieure à 1,9 pg/mL permettait de conclure à une FPIc avec une sensibilité et une spécificité de 91,7% et 87,5% respectivement par rapport à une bronchite chronique ou une bronchopneumopathie éosinophilique.

Au cours de cette étude, l'ET1 a également été mesurée dans le LLBA chez un nombre limité de chiens. Elle était mesurable chez tous les chiens atteints de FPIc alors que sa concentration était inférieure au seuil de détection chez les autres chiens testés (sains et atteints de bronchite chronique). Un échantillon plus large aurait toutefois été nécessaire pour conclure avec certitude.

L'excellente spécificité de l'ET1 pour le diagnostic de la FPIc retrouvée ici se distingue des résultats décrits chez l'homme. En effet, en médecine humaine, l'ET1 est incriminée dans de nombreuses affections respiratoires et est présente en concentration augmentée dans le sang ou le LLBA de manière peu spécifique. Des taux élevés en ET1 dans le sérum et/ou le LLBA sont en effet notés dans différentes maladies pulmonaires interstitielles autres que la FPI (Yamakami *et al.*, 1997); sclérodémie avec atteinte pulmonaire (Morelli *et al.*, 1995), sarcoïdose (Abraham *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1999; Reichenberger *et al.*, 2001; Terashita *et al.*, 2006), mucoviscidose (Siahanidou *et al.*, 2000), asthme (Gawlik *et al.*, 2006) ou bronchite chronique (Fujii *et al.*, 1999; Bacakoglu *et al.*, 2003; Nikolaou *et al.*, 2003). Chez le chien, une concentration sérique augmentée en ET1 a été précédemment rapportée chez un nombre limité de chiens avec différentes atteintes respiratoires (Tessier-Vetzel *et al.*, 2006; Prosek *et al.*, 2007) : flaccidité trachéale, pneumonie, néoplasme, épanchement pleural néoplasique, paralysie laryngée et bronchite chronique. A l'exception de la bronchite chronique, la FPIc est facilement différenciée de ces affections d'après les signes cliniques ou le résultat d'examen complémentaires simples.

L'ET1 est également utilisée comme biomarqueur à visée pronostique dans différentes affections chez l'homme ou chez l'animal. En médecine humaine, l'ET1 est un facteur prédictif indépendant de mortalité chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque débutante à modérée (Pousset *et al.*, 1997; Hulsmann *et al.*, 1998). Néanmoins dans le cadre de la FPI, aucune étude ne rapporte un intérêt pronostic de l'ET1. Dans une étude réalisée chez le chien (Tessier-Vetzel *et al.*,

2006), la concentration plasmatique en ET1 était corrélée avec la survie lors d'affections respiratoires et dans un modèle d'ischémie- reperfusion myocardique, la concentration sanguine en ET1 est moins élevée chez les chiens survivants (Vago *et al.*, 2004). Au moment de la publication de l'article, la valeur pronostique de l'ET1 n'avait pas pu être évaluée, aucune donnée de survie n'étant disponible pour le groupe atteint de FPIc ; toutefois les chiens ont été suivis pendant plusieurs années par l'équipe finlandaise et leur survie déterminée. La concentration sérique en ET1 a donc pu être évaluée dans une publication récente en tant que biomarqueur pronostique (Lilja-Maula *et al.*, 2014). Aucun lien entre la concentration sérique en ET1 au moment du diagnostic et la survie lors de FPIc n'a été mis en évidence dans cette étude.

**Table 4 : Effets de différentes variables sur la survie lors de fibrose pulmonaire idiopathique canine (analyse de régression de Cox), d'après (Lilja-Maula *et al.*, 2014)**

Variable (unit change)	N	IPF-Specific Survival HR (95% CI)	P	All-Cause Survival HR (95% CI)	P
PaO <sub>2</sub> mmHg (10)	15	0.60 (0.21–1.72)	.34	1.20 (0.58–2.46)	.63
PaCO <sub>2</sub> mmHg (1)	15	0.96 (0.75–1.23)	.75	1.02 (0.86–1.21)	.78
P(A-a)O <sub>2</sub> mmHg (10)	14	1.59 (0.67–3.73)	.29	0.93 (0.51–1.68)	.81
ET1 pg/mL (1)	10	1.11 (0.70–1.75)	.67	0.91 (0.59–1.42)	.69
HU (100)	10	0.71 (0.08–5.98)	.75	0.69 (0.27–1.76)	.44
Severity of radiographic bronchointerstitial pattern (severe)	15	2.68 (0.29–24.4)	.38	0.66 (0.20–2.21)	.50
Presence of radiographic alveolar pattern (yes)	15	1.87 (0.36–9.74)	.46	1.51 (0.46–4.95)	.50

Chez l'homme (Stewart *et al.*, 1991) comme chez le chien (Tessier-Vetzel *et al.*, 2006), l'hypertension pulmonaire s'accompagne d'une élévation de la concentration sanguine en ET1. L'hypertension pulmonaire est une complication fréquente de la fibrose pulmonaire dans ces deux espèces (Schober et Baade, 2006; Raghu *et al.*, 2011). L'absence de la réalisation d'un examen cardio-Doppler chez les chiens atteints de FPIc est la principale limite de cette étude, d'autant plus qu'une cardiomégalie droite, un aplatissement du septum ou une dilatation du tronc pulmonaire ont été observés chez certains chiens, suggérant l'existence d'une hypertension pulmonaire. Néanmoins, aucune différence dans la concentration sérique en ET1 n'a été notée entre ces chiens et ceux avec un examen échocardiographique normal et les valeurs sériques les plus élevées ont été observées chez les chiens sans anomalie cardiaque.

En conclusion de cette étude, la concentration sérique en ET1 n'est pas influencée de manière significative par les facteurs race et âge chez le chien ; elle est significativement augmentée lors de FPIc en comparaison avec des chiens sains et des chiens atteints d'autres affections respiratoires chroniques et l'ET1 semble détectable dans le LLBA uniquement chez les chiens atteints de FPIc. La sensibilité et la spécificité de l'ET1 sérique pour la distinction d'une FPIc par rapport à une bronchite chronique ou une bronchopneumopathie éosinophilique étaient très bonnes dans cette population, suggérant que l'ET1 aurait un grand intérêt diagnostique lors de FPIc. L'intérêt pronostique de l'ET1 semble par contre limité.

## Serum and Bronchoalveolar Lavage Fluid Endothelin-1 Concentrations as Diagnostic Biomarkers of Canine Idiopathic Pulmonary Fibrosis

E. Krafft, H.P. Heikkilä, P. Jespers, D. Peeters, M.J Day, M.M. Rajamäki, K. Mc Entee, and C. Clercx

**Background:** Diagnosis of canine idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is challenging. Endothelin-1 (ET1) is a biomarker of IPF in humans, but whether ET1 can detect and differentiate IPF from other canine respiratory diseases is unknown.

**Objective:** To evaluate whether measurement of the concentration of ET1 in serum and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) can be used to distinguish canine IPF from chronic bronchitis (CB) and eosinophilic bronchopneumopathy (EBP).

**Animals:** Twelve dogs with IPF, 10 dogs with CB, 6 dogs with EBP, 13 privately owned healthy West Highland White Terriers (WHWT), and 9 healthy Beagle dogs.

**Methods:** Prospective, case control study. ET1 concentration was determined by ELISA in serum and in BALF.

**Results:** No significant difference in serum ET1 concentration was detected between healthy Beagle dogs and WHWT. Serum ET1 concentration was higher in dogs with IPF (median interquartile range; 2.32 pg/mL, 2.05–3.38) than healthy Beagle dogs (1.28, 1.07–1.53;  $P < .001$ ), healthy WHWT (1.56, 1.25–1.85;  $P < .001$ ), dogs with EBP (0.94 0.68–1.01;  $P = .001$ ), and dogs with CB (1.54 0.74–1.82;  $P = .005$ ). BALF ET1 concentration was below the detection limit in healthy WHWT and in dogs with CB, whereas it was measurable in all dogs with IPF. A cut-off serum concentration of 1.8 pg/mL had a sensitivity of 100% and a specificity of 81.2% for detection of IPF, with an area under the receiver operating characteristic curve of 0.818.

**Conclusions and Clinical Importance:** Serum ET1 can differentiate dogs with IPF from dogs with EBP or CB. ET1 can be detected in BALF of dogs with IPF.

**Key words:** Biomarker; Dog; Endothelin-1; Pulmonary fibrosis.

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a devastating disease of increasing prevalence, with a median survival time of 3–5 years in humans.<sup>1</sup> The exact mechanisms underlying the development of IPF remain unknown,<sup>2</sup> and currently no treatment has proven efficacious.<sup>3</sup> Although IPF has been described in dogs,<sup>4–7</sup> little is known about its prevalence, pathogenesis, and prognosis. In humans, a consensus classification<sup>8</sup> defines the term IPF very narrowly to a specific form of fibrosing interstitial pneumonia with an unknown etiology and a specific histologic appearance. Despite striking similarities between the human and canine diseases, it is not clear yet whether they are strictly identical, especially from a histopathologic point of view.

*From the Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Liège, Belgium (Krafft, Peeters, Mc Entee, Clercx); the Department of Equine and Small Animal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Helsinki, Finland (Heikkilä, Rajamäki); the Laboratory of Physiology, Faculty of Medicine, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium (Jespers, Mc Entee); and the School of Veterinary Sciences, University of Bristol, Bristol, UK (Day). The work was done at the Department of Companion Animal and Equine Clinical Sciences of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Belgium, at the Laboratory of Physiology of the Faculty of Medicine, Université Libre de Bruxelles, Belgium, and at the Veterinary Teaching Hospital of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Finland. Part of this work was presented as an abstract at the 2010 ACVIM Forum, Anaheim, CA, and at the 20th ECVIM-CA Annual Congress 2010, Toulouse, France.*

*Corresponding author: E. Krafft, Department of Companion Animal and Equine Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine B44, University of Liège, Boulevard de Colonster 20, 4000 Liège, Belgium; e-mail: e.krafft@ulg.ac.be*

*Submitted February 11, 2011; Revised May 23, 2011; Accepted June 14, 2011.*

*Copyright © 2011 by the American College of Veterinary Internal Medicine*

*10.1111/j.1939-1676.2011.0766.x*

### Abbreviations:

BALF	bronchoalveolar lavage fluid
CB	chronic bronchitis
EBP	eosinophilic bronchopneumopathy
ET1	endothelin-1
HRCT	high-resolution computed tomography
IPF	idiopathic pulmonary fibrosis
IQ	interquartile range
ROC	receiver operating characteristic
TCC	total cell count
WHWT	West Highland White Terrier(s)

IPF is mainly recognized in terrier dogs, especially the West Highland White Terrier (WHWT). It is often first diagnosed in middle-aged to older dogs, but typical signs have been described in dogs as young as 2 years old. Affected dogs generally have a history of progressive dyspnea and exercise intolerance with or without cough.<sup>4–6</sup> Differentiating IPF from other chronic respiratory diseases, especially chronic bronchitis (CB) is challenging. Thoracic auscultation, thoracic radiography, bronchoscopy, and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) analysis generally are poorly specific.<sup>7</sup> Definitive diagnosis ultimately relies on histopathology but antemortem lung biopsy specimens is rarely performed in veterinary practice. In people with IPF, improvements in diagnosis have come from the use of diagnostic biomarkers<sup>9,10</sup> such as endothelin-1 (ET1), pulmonary function tests, and the increasing accuracy of high-resolution computed tomography<sup>11</sup> (HRCT).

ET1, a vasoactive peptide with proinflammatory and profibrotic properties,<sup>12</sup> has been identified as both a diagnostic biomarker and mediator of IPF in humans.<sup>13–15</sup> High concentrations of ET1 have been detected in serum<sup>16</sup> and BALF<sup>17</sup> from people with IPF. Although

serum ET1 concentrations have been evaluated in a limited number of dogs with respiratory and cardiac disorders,<sup>18–21</sup> ET1 has not been evaluated as a biomarker for discriminating among respiratory diseases in dogs.

Because clinical confirmation of canine IPF is challenging, identification of blood or BALF biomarkers would greatly assist the diagnostic process. The aim of this study was to determine whether concentrations of serum and BALF ET1 would be higher in dogs with IPF than in healthy dogs or in dogs with other chronic lower respiratory diseases, and would therefore be useful diagnostic biomarkers for IPF.

## Materials and Methods

### Animals

Two groups of control dogs (healthy WHWT and Beagle dogs) and 3 groups of dogs with chronic lower respiratory disease (IPF, CB, and eosinophilic bronchopneumopathy [EBP]) were investigated. Healthy dogs included a group of 13 privately owned Finnish WHWT and a group of 9 Beagle dogs housed at the Liège University Veterinary Small Animal Teaching Hospital. The Beagles were kept under ethical approval from the Ethics Committee for Animal Well Being of the University of Liège. The health status of the control dogs was assessed based on history (absence of clinical signs consistent with respiratory or cardiac disease, or any other disease with systemic consequences), physical examination, hematology, and biochemistry, thoracic radiographs, bronchoscopy, and BALF analysis. In healthy WHWT, arterial blood gas analysis, echocardiography, and thoracic HRCT also were performed according to previously described techniques.<sup>7</sup>

IPF was diagnosed in 12 dogs with compatible clinical signs based on exclusion of other causes of chronic respiratory diseases by thoracic radiography, bronchoscopy, BALF analysis, echocardiography, and fecal analysis (Baermann and flotation methods), and based on results of HRCT, postmortem histopathology, or both, as described previously.<sup>7</sup>

In order to assess the specificity of ET1 in the diagnosis of IPF, dogs suffering from CB (n = 10) or EBP (n = 6) were included in the study. The diagnosis of CB<sup>22</sup> was made based on compatible clinical signs (chronic productive cough, good general condition), thoracic radiography, bronchoscopy, BALF analysis, and histopathology of the bronchial mucosa, as well as time course of the disease and long-term outcome. These findings allowed exclusion of other lower airway diseases (eg, EBP, infectious pneumonia, or pulmonary neoplasia).

Diagnosis of EBP was made based on compatible signalment (young dogs, mostly large breeds) and clinical signs, bronchoscopic and BALF findings, and histopathologic examination of bronchial biopsies in addition to good clinical response after glucocorticoid therapy.<sup>23</sup> Pulmonary parasitism was excluded by fecal analysis (Baermann method), therapeutic trial (fenbendazole), or both. No specific test was used for detection of heartworm disease, as none of the dogs with EBP had traveled outside Belgium, a country that is nonendemic for heartworm disease.

The study protocol was approved by the Committee of Experimental Animals of Western Finland and the Committee of Animal Experimentation of Liège University.

### Clinical Investigation

Echocardiography and HRCT were performed as described previously<sup>7</sup> and BAL was performed during bronchoscopy under anesthesia as follows: 3 (20 mL each<sup>23</sup>) or 2 aliquots (1 mL/kg each<sup>24</sup>) of warm sterile saline solution (0.9%) were instilled in at least 2 different lung lobes. The BALF samples were processed as

described previously.<sup>23,24</sup> A sample of BALF was placed in an ethylenediaminetetraacetic acid tube for the determination of the total cell count (TCC) (nucleated), with a hemocytometer. Cytological preparations were prepared by cytocentrifugation and stained with May-Grünwald-Giemsa stain for general assessment and manual differential cell counting. Quantitative bacterial culture was performed, the limit of infection was set to bacterial growth of  $10^4$  CFU/mL.<sup>25</sup>

In cases of IPF, multiple samples of subpleural lung tissue from 2 to 6 lung lobes were collected postmortem when the dogs were eventually euthanized. When CB or EBP was suspected, endoscopic biopsies of bronchial mucosa were obtained. Samples were fixed in 10% neutral buffered formalin, processed routinely, and sections were stained with hematoxylin and eosin.

### ET1 Analysis

Blood samples collected in plain tubes were centrifuged immediately after collection at 4°C for 15 minutes at  $3,000 \times g$  and the serum was stored at  $-20^\circ\text{C}$  until analysis. An aliquot of BALF was centrifuged immediately after collection and the supernatant was frozen at  $-80^\circ\text{C}$  within 30 minutes of sampling. ET1 concentration was measured in the serum of all dogs, and in the BALF of 6 dogs with IPF, 5 dogs with CB, and 5 healthy WHWT.

ET1 analysis was performed with a human sandwich ELISA kit,<sup>a</sup> which had been validated previously for use with canine serum.<sup>26</sup> The kit had a sensitivity of 0.23 pg/mL and was highly specific for ET1. Before measurement, pre-extraction with a Sep-Pak C-18 column<sup>b</sup> was required. This step also permitted a 2-fold concentration of the sample and was therefore also performed with BALF samples to increase the likelihood of being able to detect ET1.

### Statistics

Data were expressed as mean ( $\pm$  SD) when they were normally distributed or as median (interquartile range [IQ]) otherwise. Statistical analysis was performed by commercially available software.<sup>c</sup> Influence of breed was analyzed by comparing the group of healthy Beagles with the group of healthy WHWT, by an unpaired Student *t*-test. Influence of age and group was analyzed by 2-way analysis of variance in all groups of dogs together. If age, group, or both effects was found to be significant, it was studied further by Mann-Whitney tests. A receiver operating characteristic (ROC) curve was constructed on the sensitivity and specificity of the assay for each cut-off value. Correlations were assessed by Spearman's rank-correlation test. Statistical significance was defined as  $P < .05$ .

## Results

### Animals

**Control Groups.** Thirteen healthy Finnish WHWT, aged 3–14 years (mean age, 9.3 years) and weighing an average of  $9 \pm 0.4$  kg, were included. Hematology, biochemistry, thoracic radiography, echocardiography (all dogs), arterial blood gas analysis (12 dogs), HRCT, and bronchoscopy (10 dogs) did not show significant abnormalities. Detailed results of these investigations are reported elsewhere.<sup>7</sup> BALF TCC was  $<420$  cells/mm<sup>3</sup> in all dogs, with a maximum percentage of neutrophils of 7%.

Nine healthy Beagle dogs, aged 3–8 years (mean age, 6.6 years) and weighing an average of  $15 \pm 0.3$  kg, were included as a second control group. A complete diagnostic evaluation was performed in all dogs. Hematology and biochemistry results were normal. Thoracic radiography showed no abnormality or the presence of a mild

bronchial or bronchointerstitial pattern, which was considered normal for the age of the dogs. Bronchoscopy was unremarkable and BALF TCC was  $<475$  cells/mm<sup>3</sup> in all dogs, with a maximum percentage of neutrophils of 20% in 1 dog and  $<10\%$  in all other dogs.

**IPF Group.** Twelve dogs with IPF were included in the study, including 11 WHWT from Finland and 1 Scottish Terrier from Belgium. These dogs were 8–13 years old (mean age, 12 years) with an average body weight of  $11 \pm 0.6$  kg. Six dogs had a history of exercise intolerance and cough, 3 had only exercise intolerance, and 2 dogs exhibited only cough. One dog had a history of panting only. The median duration of clinical signs was 12 months (IQ, 9–18). Crackles were noticed on lung auscultation in 9 dogs. Detailed findings in the 11 WHWT with IPF have been reported previously.<sup>7</sup> Serum biochemistry and hematology tests identified no consistent changes. The most common radiographic finding was a diffuse moderate to severe bronchointerstitial pattern, with 3 dogs showing patchy alveolar opacities. Right-sided cardiomegaly was noticed in 6 dogs. Echocardiography was performed in 11 dogs. Echocardiographic signs of pulmonary arterial hypertension (right-sided heart enlargement, septal flattening, dilatation of the pulmonary artery) were detected in 7 dogs. Echocardiography excluded the presence of clinically relevant primary cardiac disease. Bronchoscopy was performed in 9 dogs and identified mainly mucosal irregularity, tracheal or bronchial collapse, and the presence of a moderate amount of mucus. BALF analysis showed moderate increase in TCC (median, 805 cells/mm<sup>3</sup>; IQ, 734–1,481) and in some dogs a moderate increase in the percentage of neutrophils (4.5%; IQ, 3.6–24.7).<sup>7</sup> Fecal samples were negative for parasites in all 8 dogs in which the analysis was performed.

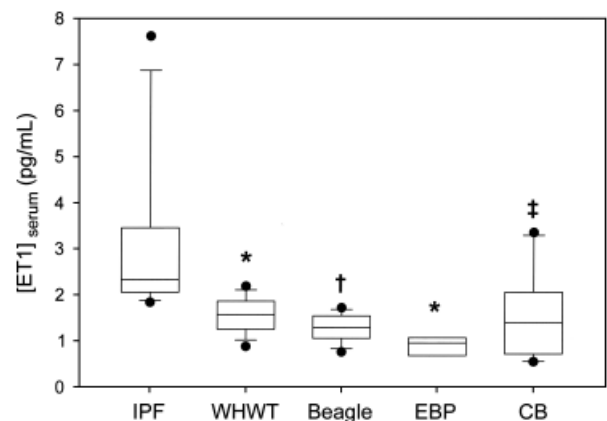
Diagnosis was confirmed by histopathology in 6 dogs, HRCT in 1 dog, and both techniques in 5 additional cases. On HRCT, ground glass opacity was detected in all dogs, associated with traction bronchiectasis in 5 animals and “honeycombing” in 2 dogs.<sup>7</sup> Histopathologic examination of pulmonary tissues revealed moderate to severe accumulation of extracellular matrix in the interstitium, hyperplasia of type II pneumocytes, and an increased number of macrophages in the alveolar spaces. The lesion distribution was heterogeneous. Additionally, blood gas analysis performed in 9 dogs showed low arterial partial pressure of oxygen (PaO<sub>2</sub>) ( $60.8 \pm 15.4$  mmHg, reference range: 90–100) and increased alveolar-arterial oxygen gradient ( $55.3 \pm 16.5$  mmHg, reference range:  $< 20$ ).<sup>7</sup>

**CB Group.** Ten cases of CB (1 each of Brittany Spaniel, Poodle, Dachshund, Jack Russell Terrier, Belgian Shepherd, Irish Setter, Doberman, Labrador Retriever, Yorkshire Terrier, and mixed breed dog) were included. Age ranged from 6 months to 12 years (mean, 8.5 years) and the average body weight was  $22 \pm 5$  kg. All dogs were presented for chronic cough, with a median duration of the clinical signs of 6 months (IQ, 3–12). Thoracic radiography revealed moderate to severe bronchointerstitial opacity in all dogs. Neutrophilic leukocytosis was present in 4 dogs (range, 16,700–28,000 neutrophils/ $\mu$ L; reference range, 3,000–11,500), whereas hematology was

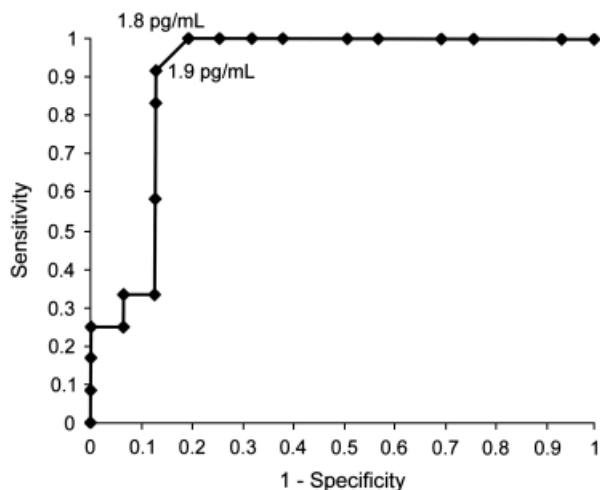
normal in the 6 remaining cases. During bronchoscopy, an increased amount of mucus was noted in the airway of all dogs, associated with mucosal irregularities in 6 cases. BALF analysis identified a mild increase in TCC in all dogs (median, 500 cells/mm<sup>3</sup>; IQ, 440–540), with increased percentage of neutrophils (35%; IQ, 18–38%). Histopathology of the bronchial mucosa was performed in 7 dogs and no eosinophilic infiltration was observed. Pulmonary parasitism was excluded by fecal analysis (5 dogs), therapeutic trial, or both.

**EBP Group.** Six dogs (1 each of Labrador, Fox Terrier, Rottweiler, and Whippet and 2 mixed breed dogs) with EBP were included. Age ranged from 5 months to 13 years (mean, 6.5 years) and the average body weight was  $23 \pm 5$  kg. Cough was noticed in all dogs, with a median duration of clinical signs of 4 months (IQ, 2–10). Moderate to severe bronchointerstitial opacity was seen on thoracic radiography in 5 dogs, whereas nodular opacities were noticed in the 6th dog. Peripheral eosinophilia was present in 2 dogs (2,300 and 2,900 eosinophils/ $\mu$ L, respectively; reference range,  $<750/\mu$ L). Bronchoscopy disclosed the presence of a large quantity of mucus in 4 dogs and polypoid change of the mucosa in 3 dogs. BALF TCC was markedly increased in all dogs (range, 950–3,900 cells/ $\mu$ L) with an increase in the percentage of eosinophils (median, 30.5%; IQ, 30–70). Histopathology of bronchial mucosal biopsies was performed in 5 dogs and revealed eosinophilic infiltration of the mucosa. Pulmonary parasitism was excluded by fecal analysis (3 dogs), therapeutic trial, or both.

**ET1 Analysis.** Median serum ET1 concentrations were 2.32 pg/mL (IQ, 2.05–3.37) in dogs with IPF, 1.38 (IQ, 0.74–1.82) in dogs with CB, 0.94 (IQ, 0.68–1.01) in dogs with EBP, 1.56 (IQ, 1.25–1.85) in healthy WHWT, and 1.22 (IQ, 1.09–1.50) in control Beagle dogs (Fig 1).



**Fig 1.** Box plot of serum endothelin-1 concentration in dogs with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF,  $n = 12$ ), in healthy West Highland White Terriers (WHWT,  $n = 13$ ), in healthy Beagles ( $n = 9$ ), in dogs with eosinophilic bronchopneumopathy (EBP,  $n = 6$ ), and with chronic bronchitis (CB,  $n = 10$ ). The lower, middle, and upper lines of each box represent the 1st, 2nd, and 3rd quartiles, respectively. The whiskers, where present, delineate the 10th and 90th percentiles. Dots, where present, show the maximum and minimum values. \*, †, ‡ Statistically different from the IPF group with  $P < .001$ ,  $P = .001$ , and  $P = .005$ , respectively.



**Fig 2.** Receiver operating characteristic curve of serum endothelin-1 concentration in dogs with idiopathic pulmonary fibrosis ( $n = 12$ ) and with chronic bronchitis or eosinophilic bronchopneumopathy ( $n = 16$ ). The area under the curve is 0.818.

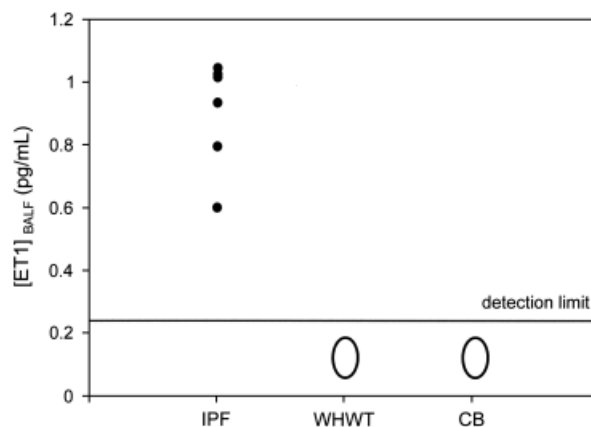
No difference was found between both groups of control dogs ( $P = .063$ ), excluding a breed influence on serum ET1 concentration. There was an age difference between the groups, with the dogs with IPF being older than the others. Nevertheless, the analysis of covariance (age and group) performed on all dogs showed no significant effect of age, whereas the group effect was highly significant ( $P < .001$ ). Serum ET1 concentration was significantly higher in the dogs with IPF compared with all of the other groups: CB ( $P = .005$ ), EBP ( $P = .001$ ), healthy WHWT ( $P < .001$ ), and control Beagle dogs ( $P < .001$ ). Serum ET1 in the dogs with EBP was significantly lower than in Beagle dogs ( $P = .011$ ) and in healthy WHWT ( $P = .001$ ). The ability of ET1 concentration to distinguish dogs with IPF from dogs with other lower chronic respiratory disorders (CB and EBP groups) was evaluated by an ROC curve (Fig 2), which indicated an area under the curve of 0.818 with a cut-off value of 1.8 pg/mL, yielding a sensitivity of 100% and a specificity of 81.2%. The sensitivity and the specificity of the cut-off value of 1.9 pg/mL were 91.7 and 87.5%, respectively.

In dogs with IPF, no correlation was found between serum ET1 concentration and the duration of clinical signs, blood gas results, or BALF TCC.

In all dogs with IPF, ET1 concentration was measurable in BALF, with a mean value of  $0.97 \pm \text{SD } 0.17$  pg/mL, whereas ET1 concentration was below the limit of detection in BALF from dogs with CB and healthy WHWT (Fig 3). In dogs with IPF, no correlation was found between BALF and serum ET1 concentrations ( $P = .71$ ).

## Discussion

The aim of the present study was to assess serum and BALF ET1 concentrations as potential biomarkers for the diagnosis of canine IPF. Serum ET1 concentration was higher in dogs with IPF than in healthy dogs or in dogs with CB or EBP. A cut-off value of 1.8 pg/mL has a



**Fig 3.** Dot plot of endothelin-1 concentration in bronchoalveolar lavage fluid of dogs with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF,  $n = 6$ ), healthy West Highland White Terriers (WHWT,  $n = 5$ ), and dogs with chronic bronchitis (CB,  $n = 5$ ).

sensitivity of 100% and a specificity of 81.2% for detection of IPF. Moreover, ET1 was only detectable in the BALF of dogs with IPF, but not in BALF from healthy dogs or dogs with CB.

The diagnosis of canine IPF is challenging and relies ultimately on HRCT<sup>7,27</sup> and histopathologic analysis. Unfortunately, antemortem lung biopsy samples are not collected routinely and HRCT is not currently readily available in veterinary practice. Therefore, blood or BALF biomarkers that are sensitive and specific for IPF would be very helpful in the diagnostic process. In the present study, we used histopathology, HRCT, or both to diagnose IPF and explored the diagnostic potential of ET1, a well-known biomarker of human IPF.<sup>15,17,28</sup>

Various kits, commercially available for ET1 measurement in people, have been used in dogs.<sup>18,20</sup> These tests are a source of variation among studies because the performance characteristics of each immunoassay vary considerably. The kit used in the present study was chosen because it has been shown to be the most reliable in dogs.<sup>26</sup> ET1 is a labile protein therefore the samples need to be stored frozen.

Age and breed were 2 possible confounding factors in this study. Because of the predisposition of dogs of terrier breeds, and more specifically WHWT, to IPF, we compared serum ET1 concentrations in healthy control WHWT and Beagles. No significant difference was found, suggesting that there is no breed effect on normal ET1 serum concentrations. Plasma ET1 concentration is increased in healthy elderly people<sup>29,30</sup> and IPF is more often recognized in older dogs.<sup>6,7,27</sup> However, covariance analysis did not identify an effect of age on serum ET1 concentration. This result is in agreement with another study, which showed no correlation between age and plasma ET1 concentration in a group of 76 healthy dogs.<sup>20</sup>

In humans, ET1 is implicated in the pathogenesis of many respiratory disorders, and increased blood, BALF, and tissue ET1 concentrations have been described in interstitial pulmonary diseases,<sup>17</sup> asthma,<sup>31,32</sup> and chronic obstructive pulmonary disease (COPD).<sup>33-37</sup> In dogs, interstitial disorders include IPF<sup>4-7</sup> and EBP.<sup>38</sup>

Increased ET1 concentrations have been reported in a limited number of dogs with respiratory disorders.<sup>20,21</sup> These respiratory conditions included tracheal flaccidity, pneumonia, pulmonary neoplasia, neoplastic pleural effusion, laryngeal paralysis, and CB. With the exception of CB, IPF is easily differentiated from these conditions on the basis of clinical signs and other simple diagnostic procedures. In the present study, we focused on the diagnosis and pathogenesis of canine IPF in comparison with CB and EBP.

Canine CB<sup>22</sup> is a disorder resembling human COPD, although airway remodeling seems to be less common than in the human disease, where bronchitis usually is complicated by pulmonary emphysema. In human medicine, ET1 has been implicated in the pathogenesis of COPD, although contradictory results have been published. In blood, BALF or sputum, ET1 concentration has been shown to be either normal<sup>17,33</sup> or increased.<sup>33-37</sup> In the present study, no significant difference in serum ET1 concentration was found between dogs with CB and healthy dogs, although high concentrations were found in 2 animals with CB. The reason why some individuals in the CB group had increased serum ET1 concentrations is unknown, but is not related to features such as duration of clinical signs. The occurrence of concomitant undiagnosed IPF in these 2 dogs was considered unlikely, because they were not from predisposed breeds (1 Irish Setter and 1 mixed breed).

Canine EBP and human asthma share some similarities, such as the occurrence of a dominant T-helper 2-mediated inflammatory response, with eosinophilic infiltration and airway remodeling.<sup>38</sup> In human asthmatics, ET1 concentrations are increased in BALF and blood.<sup>32</sup> Remission of the clinical signs after treatment leads to a marked reduction or even normalization of serum ET1 concentration.<sup>32</sup> ET1 has been implicated in the pathogenesis of bronchoconstriction and airway remodeling.<sup>31</sup> Plasma and BALF ET1 concentrations also are increased in horses suffering from seasonal recurrent airway obstruction (RAO).<sup>39</sup> In contrast, in the present study, there was no increase in serum concentrations of ET1 in dogs with EBP. Of note is the fact that bronchoconstriction is not a major feature of canine EBP, as compared with human asthma and equine seasonal RAO.

Serum ET1 concentration was higher in dogs with IPF than in both control groups and in dogs with CB or EBP. ET1 is implicated in the development of human IPF by enhancing matrix production, by stimulating production of types I and III collagen, by inhibiting expression of matrix metalloproteinase-1 and by promoting fibroblast differentiation into a myofibroblastic cell type.<sup>15</sup> Moreover, ET1 has been shown to initiate alveolar epithelial cell transition into fibroblast-like cells, a process termed epithelial-mesenchymal transition.<sup>40</sup> Finding increased ET1 concentration in dogs with IPF supports the hypothesis that ET1 might also be involved in the pathogenesis of canine IPF.

The analysis of the ROC curve confirmed that serum ET1 measurement can be used to diagnose IPF and to differentiate IPF from CB and EBP with excellent sensitivity (100%) and specificity (82%) using a cut-off value

of 1.8 pg/mL. A cut-off value of 1.9 pg/mL improved specificity (88%) with a small decrease in sensitivity (92%). All dogs with IPF had concentrations above 1.8 pg/mL, whereas concentrations for all dogs with EBP were <1.3 pg/mL. There was some overlap between results obtained in dogs with IPF and dogs with CB, indicating that IPF and CB could not be differentiated unequivocally on the basis of serum ET1 concentration alone. Therefore, we further compared BALF ET1 concentrations in dogs with IPF to those in healthy dogs and dogs with CB. BALF ET1 analysis was performed using the same test kit that had been validated previously for canine blood ET1, but not for measurement of ET1 in canine BALF.<sup>26</sup> BALF ET1 was measurable in all dogs with IPF, but was under the detection limit of the test in all healthy WHWT and dogs with CB. Despite the use of a modified extraction technique, leading to a 6-fold increase in concentration, ET1 was still under the limit of detection (performed in 2 healthy dogs; data not shown). Protein concentrations generally are much lower in BALF than in blood, and lack of sensitivity of the tests validated in serum is a common problem when used on BALF.<sup>39</sup> Radioimmunoassays, with a lower detection limit than ELISAs, could have been used but none of them has been validated for canine samples. Despite this technical limitation, the present study identified measurable BALF ET1 concentrations in dogs with IPF only. As there was overlap in the ET1 serum concentrations between the IPF and the CB groups, coupled serum and BALF ET1 measurements would be more indicative of IPF than serum concentrations alone.

Even though both serum and BALF ET1 concentrations were increased in dogs with IPF, no correlation was found between the 2 measurements. Such lack of correlation has been reported previously<sup>18</sup> and can be explained by the metabolism of the molecule. ET1 is known to be produced locally, acts mainly via autocrine and paracrine modes, and is almost exclusively eliminated by pulmonary clearance.<sup>12</sup> Absence of correlation might also be because of the small number of dogs with IPF in which ET1 BALF concentrations were measured.

In human IPF, prognosis is established based on the results of pulmonary functions tests.<sup>41</sup> Blood gas analysis is the only test easily available in veterinary medicine and was used in the present study as a marker of the disease severity. To our knowledge, no study has reported that measurement of ET1 in human IPF is of prognostic value. In dogs, 1 study reported a negative correlation between plasma ET1 concentration and survival in cases of respiratory disorders.<sup>20</sup> However, in the present study, no correlation was found between serum ET1 concentration in dogs with IPF and the duration of clinical signs, partial pressure of arterial oxygen, or alveolar arterial oxygen gradient, which suggests that ET1 is not a valuable prognostic marker in dogs with IPF.

A limitation of the study was that the control group of WHWT, considered healthy at the time of the sampling, might have included dogs that already had IPF lesions that were not detected by clinical examination, BALF, and blood gas analysis or by HRCT. Further longitudinal follow-up studies on healthy dogs of predisposed



breeds are necessary in order to identify whether serum and BALF ET1 concentrations increase before the onset of clinical signs and might be used to identify susceptible animals.

Serum ET1 concentration is known to increase in overt heart failure in dogs<sup>18</sup> and has been used as a biomarker to discriminate between respiratory and cardiac causes of dyspnea.<sup>20,21</sup> In the present study, thoracic radiographs and echocardiography allowed exclusion of concomitant overt heart disease. However, for dogs with both a respiratory disease other than IPF and heart failure, having increased ET1 concentrations might be identified as false positive for IPF. These cases would therefore decrease the specificity of serum ET1 concentration as a means of discriminating IPF from other respiratory diseases.

In humans<sup>42</sup> and in dogs,<sup>43</sup> pulmonary arterial hypertension is a known complication of IPF. Pulmonary arterial hypertension is accompanied by an increase in plasma ET1 concentration.<sup>44</sup> In dogs, a positive correlation has been reported between plasma ET1 concentration and the extent of systolic pulmonary hypertension,<sup>20</sup> and most studies in human patients report the greatest increase in serum ET1 concentration when the respiratory disease is complicated by pulmonary hypertension.<sup>37,45</sup> In the present study, we did not perform Doppler echocardiography to diagnose pulmonary arterial hypertension. It remains to be seen whether the increased serum ET1 concentration in dogs with IPF is related to the primary respiratory disorder, secondary pulmonary hypertension, or both. Right-sided cardiomegaly, septal flattening, and dilatation of pulmonary arteries led us to suspect the presence of severe pulmonary arterial hypertension in several dogs with IPF. However, no difference in serum ET1 concentration was found between dogs with IPF that had or did not have these echocardiographic abnormalities, and the highest serum ET concentrations were found in dogs with normal echocardiographic examination.

In conclusion, measurement of serum and BALF ET1 concentration is a useful additional diagnostic test that can detect dogs with IPF and differentiate them from dogs with CB or EBP. In the present study, any increase in serum ET1 concentration > 1.8 pg/mL was regarded as an indicator of IPF with a sensitivity of 100% and specificity of 81.2%, whereas coupling measurement of serum with BALF ET1 concentration helped to differentiate between IPF and CB. The potential role of ET1 in the pathogenesis of IPF, the use of ET1 receptor antagonists for therapeutic purposes, and the development of biomarker assays for diagnostic purposes should be assessed in future studies.

---

## Footnotes

<sup>a</sup> Endothelin-1 Assay kit, IBL, Gunma, Japan

<sup>b</sup> Waters Corporation, Milford, MA

<sup>c</sup> Statistical Analysis Systems Institute, Cary, NC

---

## Acknowledgement

The study was supported by “Fonds Spéciaux de la recherche” from the University of Liège.

## References

1. Raghu G, Weycker D, Edelsberg J, et al. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:810–816.
2. Wilson MS, Wynn TA. Pulmonary fibrosis: Pathogenesis, etiology and regulation. *Mucosal Immunol* 2009;2:103–121.
3. Gomer RH, Lupher ML Jr. Investigational approaches to therapies for idiopathic pulmonary fibrosis. *Expert Opin Investig Drugs* 2010;19:737–745.
4. Corcoran BM, Cobb M, Martin MW, et al. Chronic pulmonary disease in West Highland White Terriers. *Vet Rec* 1999;144:611–616.
5. Lobetti RG, Milner R, Lane E. Chronic idiopathic pulmonary fibrosis in five dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 2001;37:119–127.
6. Norris AJ, Naydan DK, Wilson DW. Interstitial lung disease in West Highland White Terriers. *Vet Pathol* 2005;42:35–41.
7. Heikkilä H, Lappalainen A, Day M, et al. Clinical, bronchoscopic, and histopathological findings, diagnostic imaging and arterial oxygenation in West Highland White Terriers with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Vet Intern Med* 2011;25:433–439.
8. Society ATSER. American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:277–304.
9. Boon K, Bailey NW, Yang J, et al. Molecular phenotypes distinguish patients with relatively stable from progressive idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). *PLoS One* 2009;4:e5134.
10. Prasse A, Muller-Quernheim J. Non-invasive biomarkers in pulmonary fibrosis. *Respirology* 2009;14:788–795.
11. Lynch DA, Godwin JD, Safrin S, et al. High-resolution computed tomography in idiopathic pulmonary fibrosis: Diagnosis and prognosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:488–493.
12. Rubanyi GM, Polokoff MA. Endothelins: Molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev* 1994;46:325–415.
13. Mutsaers SE, Foster ML, Chambers RC, et al. Increased endothelin-1 and its localization during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;18:611–619.
14. Hoehner B, Schwarz A, Fagan KA, et al. Pulmonary fibrosis and chronic lung inflammation in ET-1 transgenic mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;23:19–26.
15. Swigris JJ, Brown KK. The role of endothelin-1 in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *BioDrugs* 2010;24:49–54.
16. Ugucioni M, Pulsatelli L, Grigolo B, et al. Endothelin-1 in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Pathol* 1995;48:330–334.
17. Reichenberger F, Schauer J, Kellner K, et al. Different expression of endothelin in the bronchoalveolar lavage in patients with pulmonary diseases. *Lung* 2001;179:163–174.
18. Prosek R, Sisson DD, Oyama MA, et al. Plasma endothelin-1 immunoreactivity in normal dogs and dogs with acquired heart disease. *J Vet Intern Med* 2004;18:840–844.
19. Uchida T, Saida K. Elevated endothelin-1 expression in dogs with heartworm disease. *J Vet Med Sci* 2005;67:1155–1161.
20. Tessier-Vetzel D, Tissier R, Chetboul V, et al. Diagnostic and prognostic value of endothelin-1 plasma concentrations in dogs with heart and respiratory disorders. *Vet Rec* 2006;158:783–788.

21. Prosek R, Sisson DD, Oyama MA, et al. Distinguishing cardiac and noncardiac dyspnea in 48 dogs using plasma atrial natriuretic factor, B-type natriuretic factor, endothelin, and cardiac troponin-I. *J Vet Intern Med* 2007;21:238–242.
22. Kuehn NF. Chronic bronchitis in dogs. In: King LG, ed. *Textbook of Respiratory Diseases in Dogs and Cats*. St Louis, MO: Saunders; 2004:379–387.
23. Clercx C, Peeters D, Snaps F, et al. Eosinophilic bronchopneumopathy in dogs. *J Vet Intern Med* 2000;14:282–291.
24. Rajamäki MM, Jarvinen AK, Sorsa T, et al. Clinical findings, bronchoalveolar lavage fluid cytology and matrix metalloproteinase-2 and -9 in canine pulmonary eosinophilia. *Vet J* 2002;163:168–181.
25. Peeters DP, McKiernan BC, Weisiger RM, et al. Quantitative bacterial cultures and cytological examination of bronchoalveolar lavage specimens in dogs. *J Vet Intern Med* 2000;14:534–541.
26. Schellenberg S, Grenacher B, Kaufmann K, et al. Analytical validation of commercial immunoassays for the measurement of cardiovascular peptides in the dog. *Vet J* 2008;178:85–90.
27. Johnson VS, Corcoran BM, Wotton PR, et al. Thoracic high-resolution computed tomographic findings in dogs with canine idiopathic pulmonary fibrosis. *J Small Anim Pract* 2005;46:381–388.
28. Teder P, Noble PW. A cytokine reborn? Endothelin-1 in pulmonary inflammation and fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;23:7–10.
29. Komatsumoto S, Nara M. Changes in the level of endothelin-1 with aging. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi* 1995;32:664–669.
30. Battistelli S, Gori S, Borgogni T, et al. Variation in the plasma endothelin levels in relation to age. *Minerva Cardioangiol* 1996;44:111–114.
31. Marini M, Carpi S, Bellini A, et al. Endothelin-1 induces increased fibronectin expression in human bronchial epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;220:896–899.
32. Gawlik R, Jastrzebski D, Ziora D, et al. Concentration of endothelin in plasma and BALF fluid from asthmatic patients. *J Physiol Pharmacol* 2006;57(Suppl 4):103–110.
33. Chalmers GW, Macleod KJ, Sriram S, et al. Sputum endothelin-1 is increased in cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 1999;13:1288–1292.
34. Fujii T, Otsuka T, Tanaka S, et al. Plasma endothelin-1 level in chronic obstructive pulmonary disease: Relationship with natriuretic peptide. *Respiration* 1999;66:212–219.
35. Bacakoglu F, Atasever A, Ozhan MH, et al. Plasma and bronchoalveolar lavage fluid levels of endothelin-1 in patients with chronic obstructive pulmonary disease and pulmonary hypertension. *Respiration* 2003;70:594–599.
36. Nikolaou E, Trakada G, Prodromakis E, et al. Evaluation of arterial endothelin-1 levels, before and during a sleep study, in patients with bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration* 2003;70:606–610.
37. Carratu P, Scoditti C, Maniscalco M, et al. Exhaled and arterial levels of endothelin-1 are increased and correlate with pulmonary systolic pressure in COPD with pulmonary hypertension. *BMC Pulm Med* 2008;8:20 doi:10.1186/1471-2466-8-20.
38. Clercx C, Peeters D. Canine eosinophilic bronchopneumopathy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2007;37:917–935, vi.
39. Costa LR, Eades SC, Venugopal CS, et al. Plasma and pulmonary fluid endothelin in horses with seasonal recurrent airway obstruction. *J Vet Intern Med* 2009;23:1239–1246.
40. Jain R, Shaul PW, Borok Z, et al. Endothelin-1 induces alveolar epithelial-mesenchymal transition through endothelin type A receptor-mediated production of TGF-beta1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007;37:38–47.
41. Martinez FJ, Flaherty K. Pulmonary function testing in idiopathic interstitial pneumonias. *Proc Am Thorac Soc* 2006;3:315–321.
42. Noth I, Martinez FJ. Recent advances in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 2007;132:637–650.
43. Schober KE, Baade H. Doppler echocardiographic prediction of pulmonary hypertension in West Highland White Terriers with chronic pulmonary disease. *J Vet Intern Med* 2006;20:912–920.
44. Stewart DJ, Levy RD, Cernacek P, et al. Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: Marker or mediator of disease? *Ann Intern Med* 1991;114:464–469.
45. Trakada G, Nikolaou E, Pouli A, et al. Endothelin-1 levels in interstitial lung disease patients during sleep. *Sleep Breath* 2003;7:111–118.

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

---

Le premier objectif de cette étude était d'améliorer nos connaissances sur la pathogénie de la FPIc en combinant une approche globale sans à priori et une étude ciblée de certaines voies de signalisation, d'activation ou de stockage de molécules potentiellement impliquées dans la pathogénie. L'analyse du transcriptome par la technique des microdamiers a mis en évidence que le poumon fibrotique était actif avec une surexpression de nombreux gènes, à l'inverse d'une image simpliste d'un organe au stade terminal. Nous avons ainsi identifié différentes fonctions biologiques altérées dont la croissance et la prolifération cellulaires, le développement et le fonctionnement du système musculo-squelettique, le mouvement cellulaire, le développement cellulaire, le développement embryonnaire, la signalisation et les interactions intercellulaires et la présentation antigénique. Nous avons ensuite confirmé par qRT-PCR la surexpression de certaines cytokines : CCL2, CCL7, CXCL14, IL8 et la FAP et une sous-expression de la PLUNC.

L'analyse de nos données supportent l'hypothèse que la dysrégulation de la croissance, la prolifération et de l'apoptose cellulaires est également retrouvée chez le chien atteint de FPIc. Chez l'homme, l'altération de ces fonctions biologiques a notamment été impliquée dans le défaut de réparation de l'épithélium alvéolaire, avec des cellules épithéliales qui connaissent une apoptose excessive (Wilson et Wynn, 2009; Coward *et al.*, 2010) et dans la persistance des fibroblastes lors du processus de cicatrisation, les fibroblastes proliférant de manière excessive et résistant à l'apoptose (Maeyama *et al.*, 2001; Moodley *et al.*, 2003a; Moodley *et al.*, 2003b; Moodley *et al.*, 2004; Buhling *et al.*, 2005). La FPI chez l'homme est également associée à la présence d'une réponse immunitaire aberrante et d'une inflammation chronique (Strieter, 2008). Dans notre étude, l'analyse du transcriptome a également mis en avant différentes catégories fonctionnelles en lien avec l'inflammation et la réponse immunitaire. Nous avons observé une régulation positive de l'expression de plusieurs cytokines pro-inflammatoires telles que CCL2, CCL7, CCL17, IL8 et CXCL14 mais aussi de l'actinine alpha-3 et de l'amyloïde sérique A1, telle qu'observée chez l'homme (Carre *et al.*, 1991; Antoniadou *et al.*, 1992; Sekiya *et al.*, 2000; Kurth *et al.*, 2001; Starnes *et al.*, 2006); nous avons par ailleurs mis en évidence la présence d'une concentration sérique élevée en CCL2 chez les chiens atteints. En plus de leur implication dans la réponse inflammatoire, certaines de ces cytokines, telles que CXCL14 (Augsten *et al.*, 2009) ou CCL2 (Gharaee-Kermani *et al.*, 1996) ont également des propriétés profibrotiques. L'analyse par microdamier a également mis en avant la PLUNC, comme un des gènes les plus sous-exprimés, résultat confirmé par qRT-PCR. Son rôle exact est encore peu connu mais la PLUNC pourrait être impliquée dans la réponse inflammatoire aux substances irritantes et dans l'immunité innée (Gakhar *et al.*, 2010; Bartlett *et al.*, 2011) et son implication dans la FPIc mérite plus d'attention.

Certaines des fonctions biologiques altérées d'après nos données étaient associées avec les voies du développement. Comme indiqué précédemment, une activation aberrante des voies du développement a été évoquée dans la pathogénie de la FPI chez l'homme (Selman *et al.*, 2008). Nos résultats suggèrent que les gènes impliqués dans la morphogénèse et la différenciation ont également un rôle dans la FPIc. Parmi ces gènes, nous avons confirmé par qRT-PCR une surexpression de la FAP, qui est normalement exprimée dans les zones de remodelage tissulaire lors du développement embryonnaire (Niedermeyer *et al.*, 2001). La FAP est exprimée de manière sélective par certains fibroblastes dans les zones lésionnelles lors de FPI chez l'homme et pourrait être un marqueur d'activité de la maladie (Acharya *et al.*, 2006). Ces rôles sont encore peu connus et elle constitue une piste de recherche intéressante dans la FPIc.

L'analyse du transcriptome a ainsi fourni une image globale de la maladie mais également des pistes de recherche futures. Nous avons obtenu un volume de données très conséquent, difficile

à interpréter, en particulier d'un point de vue synthétique. L'utilisation d'outils informatiques a facilité cette interprétation, notamment en regroupant les gènes par fonctions ou systèmes biologiques. Néanmoins, une interprétation exhaustive reste difficile et il est probable que d'autres informations pertinentes n'aient pas été mises en avant lors de notre analyse. Les résultats obtenus peuvent constituer une large base de données qui pourrait être réinterprétée à la lumière de nouvelles informations ou de nouvelles approches, tel qu'effectué en médecine humaine (Kaminski et Rosas, 2006; Studer et Kaminski, 2007).

Nous avons ensuite étudié le TGF $\beta$ 1 et ses voies de stockage, d'activation et de signalisation dans la FPIc. Notre étude constitue tout d'abord l'une des premières descriptions (Peeters *et al.*, 2005; Lilja-Maula *et al.*, 2013a) des voies du TGF $\beta$ 1 au niveau pulmonaire chez le chien sain. Nous avons ainsi mis en évidence que le gène du TGF $\beta$ 1 est exprimé dans le poumon ; la protéine correspondante étant présente notamment en région péribronchique avec un marquage immunohistochimique important dans la couche de tissu conjonctif fibreux entourant les bronches et les bronchioles et plus faible dans les muscles lisses bronchiques, bronchiolaires et vasculaires. À l'inverse, les cellules épithéliales et endothéliales ne présentaient aucun marquage ou un marquage très faible. Au niveau de l'interstitium, le marquage était variable selon les champs avec des zones sans marquage et des zones avec faible marquage. Chez le chien sain, les cellules épithéliales bronchiques et bronchiolaires présentaient un marquage net en région apicale pour le TGF $\beta$ 1 alors qu'aucun marquage n'était retrouvé pour ce récepteur au niveau alvéolaire. Quelques cellules épithéliales bronchiques et alvéolaires présentaient un marquage positif pour l'anticorps anti-Smad2/3, résultat indiquant une activité basale du TGF $\beta$ 1. Il ressort de ces données qu'un signal actif du TGF $\beta$ 1 existe dans le poumon sain chez le chien et qu'il concerne notamment les régions bronchiques et bronchiolaires alors que le stockage et la signalisation du TGF $\beta$ 1 est plus faible au niveau alvéolaire. Les trois LTBP (1, 3 et 4) impliquées entre autre dans le stockage du TGF $\beta$ 1 étaient exprimées dans le poumon sain, ainsi que les intégrines  $\alpha\beta$ 6 et 8 et la THBS1 intervenant dans l'activation des complexes latents du TGF $\beta$ 1.

Chez les chiens atteints, les mêmes résultats ont été retrouvés en région bronchique. À l'inverse, différentes observations étaient en faveur d'une activation plus importante des voies du TGF $\beta$ 1 au niveau de l'épithélium lésionnel. Ainsi, le marquage important retrouvé dans la matrice fibreuse en région alvéolaire suggère la présence d'une quantité élevée de TGF $\beta$ 1 dans les zones fibrotiques avec une augmentation du stockage extracellulaire. De même, un marquage intense a été observé pour l'anticorps anti-Smad2/3 au niveau des cellules épithéliales alvéolaires. Subjectivement, ce marquage concernait une part plus importante des cellules épithéliales par rapport aux chiens sains, impression confirmée de manière semi-quantitative dans une autre étude (Lilja-Maula *et al.*, 2013a). Certaines cellules épithéliales alvéolaires, en particulier les pneumocytes hypertrophiques, présentaient un marquage intense pour le TGF $\beta$ 1. Ces résultats confirment l'hypothèse d'une augmentation du « signal TGF $\beta$ 1 » au niveau des cellules épithéliales pathologiques et suggèrent que les pneumocytes hypertrophiques sont une cible importante pour le TGF $\beta$ 1 lors de FPIc.

Au-delà de la présence d'une quantité plus importante de TGF $\beta$ 1 stocké dans la matrice extracellulaire, nos résultats suggèrent une altération des voies de stockage du TGF $\beta$ 1 lors de FPIc avec une diminution de l'expression de la LTPB4. Une autre étude (Lilja-Maula *et al.*, 2013a) a évalué l'expression de la LTBP1 et a mis en évidence une augmentation de l'immunoréactivité pour cette protéine en région alvéolaire, péribronchique et périvasculaire chez les WHWT avec FPIc en comparaison des contrôles. Dans cette étude (Lilja-Maula *et al.*, 2013a), la fibrilline-2, également composant de la matrice extracellulaire, a été détectée en région alvéolaire chez les chiens atteints de FPIc. Néanmoins, aucune différence n'était mise en évidence par rapport aux

chiens contrôles. Le rôle des composants de la matrice extracellulaire, dont les LTBP (Lepparanta *et al.*, 2012), fait l'objet d'un intérêt croissant lors de FPI chez l'homme et il a été suggéré que cette altération de l'homéostasie de la matrice extracellulaire pourrait influencer le stockage et l'activation du TGFB1 (Tatler et Jenkins, 2012). Le rôle des LTBPs et d'une manière générale des composants de la matrice extracellulaire est une piste qui reste à explorer dans la pathogénie de la FPIc.

Concernant les voies d'activation du TGFB1, il ressort de ce travail que leur expression est altérée lors de FPIc avec une régulation négative de l'expression de l' $\alpha v\beta 8$  et une surexpression de la THBS1. L'expression de l'intégrine  $\alpha v\beta 6$  n'était pas modifiée de manière significative dans notre étude. Néanmoins, l'expression de cette intégrine étant strictement limitée à l'épithélium (Goodwin et Jenkins, 2009), une étude à l'échelle cellulaire (immunomarquage, microdissection) serait plus adaptée pour conclure.

Nous avons également mis en évidence que le TGFB1 circulait en concentration plus élevée dans le sérum de chiens de races prédisposées à la FPIc en comparaison de chiens non prédisposés. Une première hypothèse pour expliquer ce résultat était l'existence d'une synthèse accrue de TGFB1 par le poumon chez ces chiens. Néanmoins, il semble à minima que la transcription du gène du TGFB1 ne soit pas profondément modifiée au niveau pulmonaire chez les chiens atteints. A l'inverse, il est possible que les concentrations sériques élevées en TGFB1 ne soient pas une conséquence du développement de la fibrose mais plutôt précèderaient le développement de la fibrose, des taux élevés étant retrouvés chez des chiens sains de races prédisposées. La présence de taux circulants élevés pourrait alors être reliée voire expliquer au moins en partie la prédisposition de ces chiens à développer une FPIc, avec une réponse inappropriée suite à des lésions de l'épithélium alvéolaire. D'autres études sont toutefois nécessaires pour évaluer cette hypothèse. Il est d'abord important de déterminer si le TGFB1 présent dans le sérum de ces chiens est sous forme latente ou active. En effet, la méthode de dosage utilisée dans notre étude comporte une première étape d'acidification, tout le TGFB1 sérique sous forme latente est ainsi activé, et on mesure l'ensemble du TGFB1 présent dans l'échantillon. Par ailleurs, il serait intéressant de déterminer la provenance de ce TGFB1 sérique, les différentes hypothèses (Grainger *et al.*, 2000) étant une synthèse exagérée dans un autre organe que le poumon, une synthèse par les plaquettes, ou une production globalement plus élevée dans l'ensemble de l'organisme chez des chiens prédisposés et ce sous déterminisme génétique, tel que suggéré chez l'homme (Grainger *et al.*, 1999).

Nos résultats indiquent une altération de certaines voies du TGFB1 dans la FPIc, supportant l'hypothèse d'une implication de cette cytokine dans la pathogénie. Il s'agit ici d'une analyse partielle et il serait intéressant de compléter cette étude par une exploration des voies non canoniques de signalisation intracellulaire. Par ailleurs, au-delà de la mise en évidence d'un signal Smad actif en intracellulaire, l'expression des gènes situés en aval du TGFB1 doit également être évaluée afin de déterminer quelles sont les conséquences moléculaires d'une augmentation du « signal TGFB1 » dans les poumons des chiens atteints de FPIc.

Cette étude a permis d'identifier le TGFB1 comme un gène d'intérêt pour de futures analyses génétiques. En effet chez l'homme, différents polymorphismes ont été associés au développement ou à la sévérité de la FPI et les taux circulants en TGFB1 sont en partie sous déterminisme génétique. La présence d'une concentration sérique en TGFB1 variable selon la race chez le chien et d'une nette prédisposition du WHWT pour la FPIc suggère un lien potentiel entre le gène du TGFB1 et l'apparition d'une FPIc. Une première étape par la suite pourrait être l'étude des polymorphismes dans le gène du TGFB1 (en particulier le promoteur) en fonction de la race, de la concentration sérique en TGFB1 et de la présence ou non d'une FPIc.

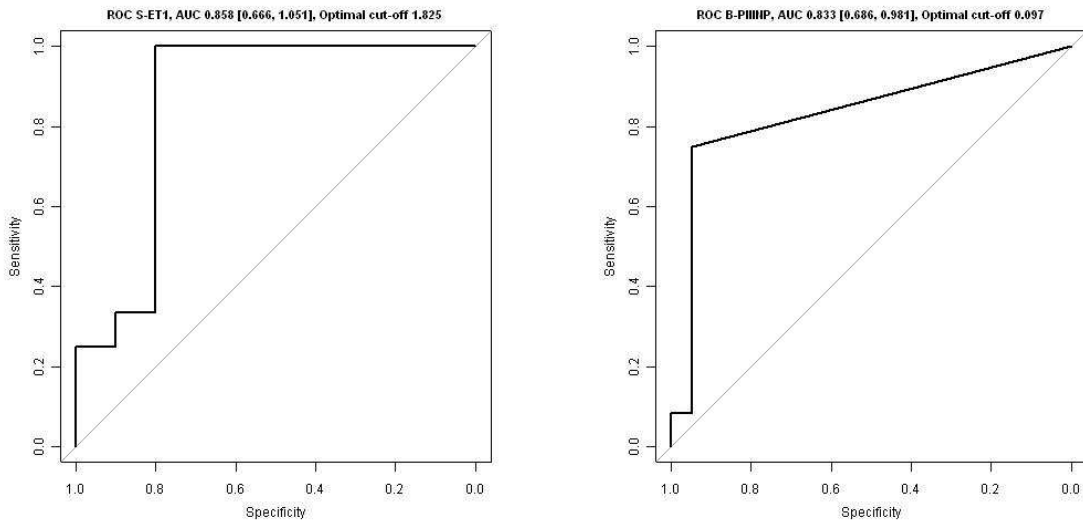
Nos premiers résultats sur la sérotonine ne sont pas en faveur d'une altération importante de la sérotonine et de ses voies dans la pathogénie de la FPIc. Toutefois il s'agit d'une étude préliminaire, qui devrait être complétée, par exemple en quantifiant la quantité de sérotonine présente localement dans le tissu pulmonaire, par Western Blot ou immunohistochimie. L'expression de la tryptophane hydroxylase 1, enzyme limitante intervenant dans la synthèse de la sérotonine, pourrait également être évaluée localement.

L'ET1 a ici été évaluée en tant que biomarqueur potentiel dans la FPIc, néanmoins elle pourrait également avoir un rôle dans la pathogénie. En effet, cette molécule a également des propriétés profibrotiques et a été impliquée dans la pathogénie de la FPI chez l'homme. Des études *in vitro* ont démontré que l'ET1 influence la production et la dégradation de la matrice en stimulant la production de collagène de type I et III, en inhibant l'expression de la métalloprotéinase de la matrice de type 1 et en stimulant le remodelage de la matrice. L'ET1 stimule également la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes (Swigris et Brown, 2010) et peut initier une TEM par l'intermédiaire du TGFB1 (Jain *et al.*, 2007). Une surexpression de l'ET1 a été mise en évidence chez les patients atteints de FPI avec une quantité augmentée d'ARNm (Saleh *et al.*, 1997), et d'immunoréactivité en ET1 par immunohistochimie dans le tissu pulmonaire (Giaid *et al.*, 1993; Ugucioni *et al.*, 1995). Des résultats comparables ont été obtenus dans des modèles animaux de fibrose pulmonaire (fibrose induite par l'inhalation de bléomycine chez le rat) (Park *et al.*, 1997; Mutsaers *et al.*, 1998a). Cette surexpression de l'ET1 ne semble pas être qu'une conséquence de l'installation de la fibrose lors de FPI. En effet, dans le modèle de fibrose pulmonaire induit par instillation de bléomycine, la surexpression de l'ET1 précède l'accumulation de collagène dans le tissu pulmonaire et donc l'installation de la fibrose (Mutsaers *et al.*, 1998a). Les souris transgéniques surexprimant l'ET1 développent une accumulation progressive de protéines de la matrice extracellulaire en région périvasculaire et péribronchique, ainsi que de cellules inflammatoires (Hochoer *et al.*, 2000). Notre étude a mis en évidence une concentration en ET1 élevée dans le sérum et le LLBA chez les animaux atteints. Une étude à l'échelle tissulaire par immunohistomarquage permettrait de compléter cette analyse par l'identification des sources cellulaires d'ET1 ainsi que par la cartographie en récepteurs au sein des lésions de FPIc. A l'inverse, lors de l'analyse du transcriptome, l'ARNm codant pour l'ET1 ou pour ses récepteurs n'a pas été retrouvé en quantité augmentée. Il peut s'agir d'un faux négatif du microdamier ou d'une véritable absence de surexpression. Il est possible que l'ET1 soit synthétisée dans une partie du poumon, notamment au niveau des vaisseaux. Or l'analyse microdamier a été effectuée à partir de tissu prélevé en périphérie des poumons (zones les plus sévèrement atteintes lors de FPIc). Toutefois, si l'ET1 est réellement essentiellement exprimée au niveau vasculaire, la présence de taux élevés dans le sérum et le LLBA devrait alors être davantage associée au développement d'une hypertension pulmonaire qu'à celui de la fibrose.

Le second objectif de cette étude était d'identifier des biomarqueurs diagnostiques de la FPIc, toujours avec cette double approche de screening et d'études ciblées de molécules candidates. Parmi ces molécules candidates, sélectionnées d'après les données de la littérature chez l'homme, certaines n'ont pas été retenues. Pour le TGFB1, la présence d'un effet race significatif exclut son utilisation comme biomarqueur ; et pour la sérotonine, aucune différence significative n'a été observée entre chiens sains et chiens atteints. A l'inverse, l'ET1 et le CCL2 semblent présenter un potentiel certain. Pour ces molécules, aucun effet de l'âge et de la race n'a été observé et l'analyse

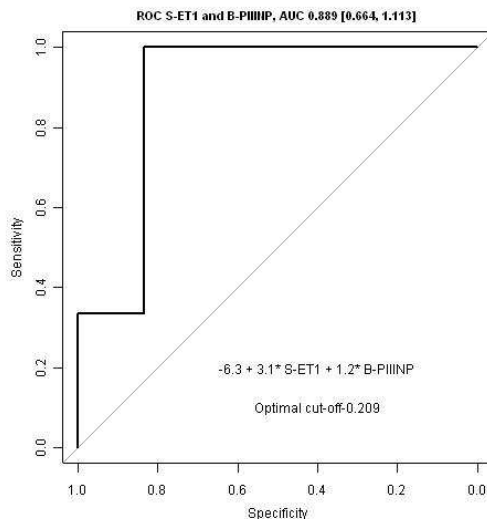
des courbes ROC a mis en évidence de très bonnes performances diagnostiques, en particulier pour l'ET1. Ces performances semblent d'ailleurs supérieures à celles publiées pour le PIIINP, autre biomarqueur évalué dans la FPIc.

**Figure 21 : Courbe ROC : performance du test à différencier une FPIc d'une BC en fonction du seuil choisi pour la concentration sérique en ET1 et pour la concentration en PIIINP dans le liquide lavage bronchoalvéolaire**



Comme observé dans la FPI chez l'homme, il est probable que la combinaison de plusieurs biomarqueurs permette d'améliorer les performances diagnostiques. L'ET1 et le PIIINP ayant été mesurés dans la même population, il nous a été possible de tester les performances de l'association de ces biomarqueurs.

**Figure 22 : Courbe ROC : performance de l'association concentration sérique en ET1 et concentration en PIIINP dans le liquide lavage bronchoalvéolaire à différencier une FPIc d'une BC**



L'aire sous la courbe (0,889) est supérieure pour l'association ET1- PIIINP que pour l'ET1 seule (0,858), néanmoins la combinaison de ces deux biomarqueurs n'améliore que peu les performances diagnostiques. La combinaison de l'ET1 et du CCL2 semble plus intéressante, les performances intrinsèques de ces biomarqueurs étant supérieures. Néanmoins, il n'a pas été

possible de tester leur association, ces deux molécules n'ayant été mesurées chez les mêmes animaux que pour quelques chiens avec FPIc.

D'autres biomarqueurs potentiels ont été identifiés par l'analyse du transcriptome et doivent encore être évalués. Etant donné les limites de l'analyse par microdamier, une étape intermédiaire pourrait être de vérifier par qRT-PCR que la quantité d'ARNm est effectivement différente au niveau pulmonaire entre les chiens atteints et les chiens contrôles. Ces molécules candidates, ainsi que celles que nous avons déjà confirmées précédemment comme la FAP ou l'IL8, devront ensuite être mesurées dans le sérum et/ou le LLBA dans différents groupes tels qu'effectués pour le CCL2. Leurs performances diagnostiques intrinsèques et l'intérêt de leur association pourront ainsi être évalués.

La perspective à plus long terme est d'utiliser ces biomarqueurs dans la démarche diagnostique lors de suspicion de FPIc. Plusieurs étapes restent toutefois à franchir. Tout d'abord, des tests rapides doivent encore être rendus disponibles pour permettre leur utilisation en clinique. Par ailleurs, les résultats obtenus pour l'ET1 et le CCL2 doivent être validés dans une deuxième cohorte d'animaux atteints et d'animaux contrôles (sains et atteints de bronchite chronique, principal diagnostic différentiel de la FPIc) pour confirmer leurs performances diagnostiques. En effet, bien que les résultats que nous avons obtenus soient particulièrement « satisfaisants », l'excellente spécificité obtenue, en particulier pour l'ET1, est un peu étonnante au regard des données obtenues chez l'homme. En effet, en médecine humaine et tel qu'évoquée précédemment, l'ET1 est incriminée dans de nombreuses affections respiratoires et ainsi retrouvée en concentration augmentée dans le sang ou le LLBA de manière peu spécifique.

Les différents examens réalisés sur les chiens (examen clinique, bilan sanguin...) nous ont permis d'exclure la présence de différentes affections intercurrentes qui auraient pu avoir une répercussion sur les taux circulants des différentes molécules analysées (en particulier une insuffisance rénale pour les biomarqueurs avec clairance rénale). Néanmoins le rôle d'autres facteurs confondants devrait être mieux évalué. L'hypertension pulmonaire a déjà été évoquée dans le cadre de l'étude de l'ET1 et devra faire l'objet d'une évaluation plus poussée par la suite. D'autres affections, même sans rapport direct avec la présence d'une FPIc, devraient également être recherchées chez les chiens atteints et les contrôles car elles pourraient avoir un impact sur les concentrations en différentes molécules au niveau sérique notamment. Nous pouvons par exemple citer la présence d'une atopie (Marsella *et al.*, 2012), affection pour laquelle le WHWT est également prédisposé.

Les limites majeures de notre travail sont principalement liées à la constitution des groupes utilisés lors des différentes études. Afin de s'assurer que les modifications observées sont liées à la présence d'une FPIc, il est nécessaire d'éliminer ou de tester l'implication potentielle de facteurs confondants. La FPIc touchant majoritairement des chiens d'âge moyen à âgés et de certaines races, l'âge et la race sont des facteurs confondants évidents. Nous avons donc cherché à recruter comme animaux contrôles des chiens de même âge et race. Malheureusement, ces conditions idéales n'ont pas pu être respectées, notamment pour les analyses portant sur des tissus pulmonaires. Plusieurs explications peuvent être apportées. D'une part, les WHWT sont relativement peu représentés en Belgique. Ensuite, les animaux âgés sont souvent atteints de diverses pathologies avec possible répercussion pulmonaire empêchant leur utilisation comme contrôle. De plus, les tissus destinés à des analyses par RT-PCR doivent être rapidement prélevés après le décès de l'animal et adéquatement traités et conservés et les propriétaires peuvent être réfractaires à la réalisation de



prélèvements. Il est donc possible que les modifications que nous avons observées chez les chiens atteints soient en partie liées à la race et à l'âge et non pas uniquement à la présence d'une FPIc. A l'inverse, ces facteurs confondants ont pu être bien mieux pris en compte pour les analyses réalisées sur échantillons sériques, l'obtention d'échantillons sanguins étant nettement moins difficile.

De plus, les groupes de chiens atteints de FPIc peuvent sembler de taille limitée. Dans ce cas, les limites du recrutement étaient notamment liées à la faible prévalence de la maladie et la difficulté de confirmer le diagnostic pour les animaux pour lesquels du tissu pulmonaire n'était pas disponible pour analyse histologique (animaux encore vivants dont le sérum et le LLBA auraient pu être utilisés). La taille des groupes reste toutefois comparable à celle des autres études publiées pour cette affection et acceptable dans le cadre d'une maladie spontanée peu fréquente.

Par ailleurs, pour certaines études, le groupe atteint, bien que constitué majoritairement de WHWT, comportait également des chiens d'autres races. Or, tel qu'évoqué précédemment, il n'est pas encore certain qu'il s'agisse exactement de la même affection dans les différentes races. Pour l'étude portant sur le TGFB1, réalisée plus récemment, des échantillons provenant d'un nombre plus élevé de WHWT atteints étaient disponibles et le questionnement autour d'une différence entre les WHWT et les autres races grandissant, nous avons choisi de n'inclure que des WHWT dans le groupe FPIc.

L'objectif à terme de l'étude de la FPIc est l'identification d'une thérapie efficace. Cette recherche nécessite de mieux connaître les mécanismes conduisant à l'apparition de la fibrose et ainsi d'identifier des cibles thérapeutiques. De potentielles implications thérapeutiques peuvent être évoquées à partir de nos résultats.

Le TGFB1 jouant un rôle clé dans le processus de fibrose, il constitue une cible thérapeutique logique dans la FPI chez l'homme. Chaque étape intervenant dans la synthèse, l'activation et la signalisation du TGFB1 représente un mécanisme potentiel de régulation et différentes molécules « anti-TGFB1 » ont fait l'objet d'essais thérapeutiques (Fernandez et Eickelberg, 2012). Bien que le mode d'action de la pirféridone, traitement ayant récemment obtenu une autorisation de mise sur le marché pour le traitement de la FPI au Japon et en Europe, soit relativement méconnu ; il a été prouvé qu'elle avait notamment des effets anti-inflammatoires et antifibrotiques en atténuant la production et l'action du TGFB1 (Oku *et al.*, 2008; Hisatomi *et al.*, 2012). Toutefois, le TGFB1 intervenant dans de nombreux processus physiologiques, un blocage complet de son action pourrait être associé à de nombreux effets indésirables et la recherche se tourne actuellement vers des molécules permettant un blocage ciblé (Nishimura, 2009). Un anticorps monoclonal anti  $\alpha\beta6$  est ainsi évalué et pourrait empêcher localement l'activation des complexes latents du TGFB1, au niveau des lésions épithéliales (Fernandez et Eickelberg, 2012). Nos résultats suggèrent que le blocage du TGFB1 représente également une cible thérapeutique intéressante chez le chien. Même si l'utilisation d'anticorps anti-intégrine semble moins intéressante, l'inhibition de l'activation par la THBS1 est à envisager.

Au-delà de son intérêt en tant que biomarqueur, le CCL2 a également un rôle dans la pathogénie de la FPI chez l'homme et des thérapies anti-CCL2 sont envisagées notamment pour limiter le recrutement des fibrocytes et des monocytes (Loomis-King *et al.*, 2013). Une surexpression du CCL2 au niveau pulmonaire et des taux circulants élevés en CCL2 ayant été mis en évidence chez les chiens atteints de FPIc, un blocage du CCL2 pourrait également se révéler une piste intéressante.

Bien que des antagonistes des récepteurs de l'ET1 soient utilisés dans le traitement de l'hypertension pulmonaire chez l'homme, des résultats contradictoires ont été obtenus dans le

modèle expérimental de fibrose induite par l'administration de bléomycine et chez des patients atteints de FPI. Dans une étude, le bosentan, antagoniste non sélectif, réduisait le développement de la fibrose et améliorait la tolérance à l'exercice dans le modèle bléomycine (Park *et al.*, 1997), alors que dans une autre étude (Mutsaers *et al.*, 1998b), l'administration continue d'un antagoniste, qu'il soit sélectif pour ETA ou non sélectif, n'a pas prévenu l'accumulation de collagène. Les différents essais thérapeutiques réalisés chez l'homme n'ont pas non plus mis en évidence d'effet bénéfique. Au vu de nos résultats et de la présence fréquente d'une hypertension artérielle pulmonaire lors de FPIc, le blocage de l'ET1 est une autre piste thérapeutique potentielle. Le bosentan pourrait être utilisé chez le chien plus spécifiquement dans le traitement de l'hypertension pulmonaire. Néanmoins, aucune étude ne rapporte son efficacité seule ou en comparaison du sildénafil chez des chiens avec une hypertension pulmonaire spontanée et son coût prohibitif est un frein à son utilisation.

Une part importante de la recherche consacrée à la FPI humaine s'est basée sur des modèles expérimentaux murins et ce afin d'identifier des mécanismes pathogéniques et de tester l'efficacité de potentiels traitements. Le modèle le plus utilisé repose sur l'administration par voie intrapéritonéale ou intratrachéale de bléomycine, le plus souvent chez la souris (Moore et Hogaboam, 2008). Néanmoins de nombreux auteurs remettent en question la pertinence de ces modèles (Gauldie et Kolb, 2008; Moeller *et al.*, 2008). En particulier, la quasi-totalité des molécules avec un effet antifibrotique démontré chez la souris se sont révélées sans efficacité chez l'homme. Différentes hypothèses ont été avancées pour expliquer cette discordance : possible résolution spontanée des lésions, développement rapide des lésions (quelques jours chez la souris contre plusieurs années chez l'homme), traitement le plus souvent instauré en même temps que l'administration de l'agent fibrotique (l'intérêt préventif plus que curatif de la molécule est alors en fait testé)(Chua *et al.*, 2005; Moeller *et al.*, 2008), hypothèses toutes reliées au fait d'utiliser un modèle expérimental. Même si certains modèles ont été modifiés (administrations répétées de bléomycine au lieu d'une administration unique (Degryse *et al.*, 2010), suivi à plus long terme après une administration unique (Limjunyawong *et al.*, 2014)) pour se rapprocher du mode de développement des lésions chez l'homme (probables « attaques » répétées de l'épithélium avec développement très progressif des lésions) ; l'intérêt se porte également vers la recherche de nouveaux modèles (Roman *et al.*, 2013). Une affection spontanée, dans une espèce à durée de vie plus longue, pourrait être un candidat intéressant et la FPIc a été évoquée dans ce contexte. Elle présente en effet de nombreuses similitudes avec la FPI humaine, notamment d'un point de vue des signes cliniques et de son évolution. Par ailleurs, tel qu'évoqué précédemment, l'espèce canine est particulièrement intéressante pour les études génétiques d'association. Différentes études récentes (Heikkila *et al.*, 2011; Syrja *et al.*, 2013) ont mis en évidence que les chiens atteints présentaient des images tomodensitométriques et histologiques comparables mais non identiques à celles rencontrées chez l'homme lors de FPI ; certains images étant en effet plus proches de celles retrouvées lors de pneumonie interstitielle non spécifique. Il ressort de notre étude que la FPIc partage également certains mécanismes moléculaires avec la FPI chez l'homme, que ce soit de grandes fonctions biologiques altérées identifiées par l'analyse du transcriptome ou des voies plus spécifiques comme celle du TGFB1. Même si les modifications rencontrées chez le chien ne sont pas exactement les mêmes que celles identifiées chez l'homme, les similitudes mises en évidence appuient l'intérêt de la FPIc en tant que modèle. Bien entendu, la FPIc ne serait pas non plus un modèle parfait, la principale limite étant la faible prévalence de cette affection, gênant le recrutement des cas, en particulier pour tester l'efficacité de nouvelles molécules.

En conclusion, ce travail nous a tout d'abord permis d'améliorer nos connaissances sur la pathogénie de la FPIc. Par l'analyse du transcriptome au niveau pulmonaire chez les chiens atteints en comparaison de chiens contrôles, nous avons identifié une altération de différentes fonctions biologiques lors de FPIc, incluant la croissance et la prolifération cellulaires, le développement et le fonctionnement du système musculo-squelettique, le mouvement cellulaire, le développement cellulaire, le développement embryonnaire, la signalisation et les interactions intercellulaires et la présentation antigénique. Différentes catégories fonctionnelles en lien avec l'inflammation et la réponse immunitaire ont été mises en avant lors de cette analyse et une dysrégulation de l'expression de plusieurs cytokines pro-inflammatoires (CCL2, CCL7, CCL17, IL8 et CXCL14) et de la PLUNC a été confirmée par qRT-PCR. L'analyse du transcriptome suggère également une altération des voies du développement, avec en particulier une surexpression de la FAP.

Cette étude a également permis de démontrer qu'une signalisation active en TGFB1 existait au sein des poumons atteints de FPIc, notamment au niveau de l'épithélium pathologique, telle que démontrée par la présence d'un immunomarquage positif pour la Smad 2/3 phosphorylée et pour le récepteur de type 1 au sein des cellules épithéliales. Même si le gène du TGFB1 ne semblait pas surexprimé, une quantité augmentée de la protéine TGFB1 a été observée au sein des poumons atteints, avec un marquage intense au niveau de l'épithélium. Les résultats suggèrent également que les voies de stockage et d'activation du TGFB1 sont altérées lors de FPIc avec une diminution de l'expression de la LTBP4 et de la sous-unité intégrine  $\beta$ 8 et une augmentation de l'expression de la THBS1. Des taux élevés de TGFB1 circulant ont été retrouvés dans les races prédisposées, ce qui pourrait au moins partiellement expliquer leur susceptibilité à la FPIc. Au regard des propriétés profibrotiques du TGFB1 et des résultats de cette étude, nous pouvons suggérer que le TGFB1 est probablement impliqué dans la pathogénie de la FPIc et que la modulation de son stockage, de son activation ou de sa signalisation intracellulaire représente des cibles thérapeutiques potentielles.

Le deuxième objectif de ce travail était d'identifier des biomarqueurs qui pourront à terme être intégrés dans la démarche diagnostique d'une FPIc. Les mesures sériques réalisées lors de l'étude du TGFB1 et de la sérotonine indiquent que ces derniers n'ont pas d'intérêt en tant que biomarqueurs diagnostiques dans la FPIc, à cause d'une absence de différence entre chiens atteints et chiens sains pour les deux molécules et d'un effet race significatif pour le TGFB1. A l'inverse, l'ET1 est un très bon candidat. Sa concentration sérique n'est pas influencée de manière significative par les facteurs race et âge, elle est significativement augmentée lors de FPIc en comparaison de chiens sains et de chiens atteints d'autres affections respiratoires chroniques; et l'ET1 semble détectable dans le LLBA uniquement chez les chiens atteints de FPIc. Ses bonnes performances diagnostiques (sensibilité, spécificité) retrouvées dans notre étude doivent toutefois encore être validées dans une autre cohorte avant d'intégrer la mesure de l'ET1 dans la démarche diagnostique de la FPIc. L'analyse du transcriptome a également permis d'identifier plusieurs biomarqueurs potentiels dans le sérum et/ou le LLBA. Parmi ces biomarqueurs, le CCL2 a été étudié plus spécifiquement. Bien que ses performances semblent moindres que pour l'ET1, le CCL2 semble également avoir un intérêt en tant que biomarqueur diagnostique. Comme l'ET1, ces résultats doivent être validés sur une population indépendante et il serait également intéressant de combiner plusieurs biomarqueurs pour améliorer la sensibilité et la spécificité globales.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- ABRAHAM D.J., VANCHEESWARAN R., DASHWOOD M.R., RAJKUMAR V.S., PANTELIDES P., XU S.W., DU BOIS R.M., BLACK C.M. Increased levels of endothelin-1 and differential endothelin type A and B receptor expression in scleroderma-associated fibrotic lung disease. *Am J Pathol*, 1997, **151**, 831-841.
- ACHARYA P.S., ZUKAS A., CHANDAN V., KATZENSTEIN A.L., PURE E. Fibroblast activation protein: a serine protease expressed at the remodeling interface in idiopathic pulmonary fibrosis. *Hum Pathol*, 2006, **37**, 352-360.
- AHUJA S.S., PALIOGIANNI F., YAMADA H., BALOW J.E., BOUMPAS D.T. Effect of transforming growth factor-beta on early and late activation events in human T cells. *J Immunol*, 1993, **150**, 3109-3118.
- AKHMETSHINA A., PALUMBO K., DEES C., BERGMANN C., VENALIS P., ZERR P., HORN A., KIREVA T., BEYER C., ZWERINA J., SCHNEIDER H., SADOWSKI A., RIENER M.O., MACDOUGALD O.A., DISTLER O., SCHETT G., DISTLER J.H. Activation of canonical Wnt signalling is required for TGF-beta-mediated fibrosis. *Nature communications*, 2012, **3**, 735.
- AKHURST R.J., HATA A. Targeting the TGF[beta] signalling pathway in disease. *Nat Rev Drug Discov*, 2012, **11**, 790-811.
- ALDER J.K., CHEN J.J., LANCASTER L., DANOFF S., SU S.C., COGAN J.D., VULTO I., XIE M., QI X., TUDER R.M., PHILLIPS J.A., 3RD, LANSDORP P.M., LOYD J.E., ARMANIOS M.Y. Short telomeres are a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, **105**, 13051-13056.
- ALLAM J.S., LIMPER A.H. Idiopathic pulmonary fibrosis: is it a familial disease? *Curr Opin Pulm Med*, 2006, **12**, 312-317.
- AMBROSINI V., CANCELLIERI A., CHILOSI M., ZOMPATORI M., TRISOLINI R., SARAGONI L., POLETTI V. Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: report of a series. *Eur Respir J*, 2003, **22**, 821-826.
- ANDERSSON-SJOLAND A., DE ALBA C.G., NIHLBERG K., BECERRIL C., RAMIREZ R., PARDO A., WESTERGREN-THORSSON G., SELMAN M. Fibrocytes are a potential source of lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, **40**, 2129-2140.
- ANDO M., MIYAZAKI E., ITO T., HIROSHIGE S., NUREKI S.I., UENO T., TAKENAKA R., FUKAMI T., KUMAMOTO T. Significance of Serum Vascular Endothelial Growth Factor Level in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Lung*, 2010.
- ANNES J.P., RIFKIN D.B., MUNGER J.S. The integrin alphaVbeta6 binds and activates latent TGFbeta3. *FEBS Lett*, 2002, **511**, 65-68.
- ANNES J.P., MUNGER J.S., RIFKIN D.B. Making sense of latent TGFbeta activation. *Journal of cell science*, 2003, **116**, 217-224.
- ANNES J.P., CHEN Y., MUNGER J.S., RIFKIN D.B. Integrin alphaVbeta6-mediated activation of latent TGF-beta requires the latent TGF-beta binding protein-1. *The Journal of cell biology*, 2004, **165**, 723-734.
- ANSCHER M.S., PETERS W.P., REISENBICHLER H., PETROS W.P., JIRTLE R.L. Transforming growth factor beta as a predictor of liver and lung fibrosis after autologous bone marrow transplantation for advanced breast cancer. *N Engl J Med*, 1993, **328**, 1592-1598.
- ANTONIADES H.N., NEVILLE-GOLDEN J., GALANOPOULOS T., KRADIN R.L., VALENTE A.J., GRAVES D.T. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 mRNA in human idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, **89**, 5371-5375.

- AOYAGI-IKEDA K., MAENO T., MATSUI H., UENO M., HARA K., AOKI Y., AOKI F., SHIMIZU T., DOI H., KAWAI-KOWASE K., ISO T., SUGA T., ARAI M., KURABAYASHI M. Notch induces myofibroblast differentiation of alveolar epithelial cells via transforming growth factor-beta-Smad3 pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011, **45**, 136-144.
- ARAI T., ABE K., MATSUOKA H., YOSHIDA M., MORI M., GOYA S., KIDA H., NISHINO K., OSAKI T., TACHIBANA I., KANEDA Y., HAYASHI S. Introduction of the interleukin-10 gene into mice inhibited bleomycin-induced lung injury in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000, **278**, L914-922.
- ARASE Y., IKEDA K., TSUBOTA A., SAITOH S., SUZUKI Y., KOBAYASHI M., SUZUKI F., SOMEYA T., AKUTA N., HOSAKA T., KUMADA H. Usefulness of serum KL-6 for early diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis in patients with hepatitis C virus. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*, 2003, **27**, 89-94.
- ARAYA J., CAMBIER S., MORRIS A., FINKBEINER W., NISHIMURA S.L. Integrin-mediated transforming growth factor-beta activation regulates homeostasis of the pulmonary epithelial-mesenchymal trophic unit. *Am J Pathol*, 2006, **169**, 405-415.
- ARAYA J., CAMBIER S., MARKOVICS J.A., WOLTERS P., JABLONS D., HILL A., FINKBEINER W., JONES K., BROADDUS V.C., SHEPPARD D., BARZCAK A., XIAO Y., ERLE D.J., NISHIMURA S.L. Squamous metaplasia amplifies pathologic epithelial-mesenchymal interactions in COPD patients. *J Clin Invest*, 2007, **117**, 3551-3562.
- ARAYA J., NISHIMURA S.L. Fibrogenic reactions in lung disease. *Annu Rev Pathol*, 2010, **5**, 77-98.
- 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, LANSDORP P.M., GREIDER C.W., LOYD J.E. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*, 2007, **356**, 1317-1326.
- ARNDT J.W., REYNOLDS C.A., SINGLETARY G.E., CONNOLLY J.M., LEVY R.J., OYAMA M.A. Serum serotonin concentrations in dogs with degenerative mitral valve disease. *J Vet Intern Med*, 2009, **23**, 1208-1213.
- ASAKURA S., COLBY T.V., LIMPER A.H. Tissue localization of transforming growth factor-beta1 in pulmonary eosinophilic granuloma. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996, **154**, 1525-1530.
- AUGSTEN M., HAGGLOF C., OLSSON E., STOLZ C., TSAGOZIS P., LEVCHENKO T., FREDERICK M.J., BORG A., MICKE P., EGEVAD L., OSTMAN A. CXCL14 is an autocrine growth factor for fibroblasts and acts as a multi-modal stimulator of prostate tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, **106**, 3414-3419.
- AWAD M.R., EL-GAMEL A., HASLETON P., TURNER D.M., SINNOTT P.J., HUTCHINSON I.V. Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene: association with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. *Transplantation*, 1998, **66**, 1014-1020.
- AZUMA A., NUKIWA T., TSUBOI E., SUGA M., ABE S., NAKATA K., TAGUCHI Y., NAGAI S., ITOH H., OHI M., SATO A., KUDOH S. Double-blind, placebo-controlled trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005, **171**, 1040-1047.
- BACAKOGLU F., ATASEVER A., OZHAN M.H., GURGUN C., OZKILIC H., GUZELANT A. Plasma and bronchoalveolar lavage fluid levels of endothelin-1 in patients with chronic obstructive pulmonary disease and pulmonary hypertension. *Respiration*, 2003, **70**, 594-599.
- BACH J.F., ROZANSKI E.A., MACGREGOR J., BETKOWSKI J.M., RUSH J.E. Retrospective evaluation of sildenafil citrate as a therapy for pulmonary hypertension in dogs. *J Vet Intern Med*, 2006, **20**, 1132-1135.

- BALAKRISHNAN A., KING L.G. Updates on Pulmonary Function Testing in Small Animals. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 2014, **44**, 1-18.
- BANDOH S., FUJITA J., OHTSUKI Y., UEDA Y., HOJO S., TOKUDA M., DOBASHI H., KURATA N., YOSHINOUCHI T., KOHNO N., TAKAHARA J. Sequential changes of KL-6 in sera of patients with interstitial pneumonia associated with polymyositis/dermatomyositis. *Annals of the rheumatic diseases*, 2000, **59**, 257-262.
- BARAN C.P., OPALEK J.M., MCMACKEN S., NEWLAND C.A., O'BRIEN J.M., JR., HUNTER M.G., BRINGARDNER B.D., MONICK M.M., BRIGSTOCK D.R., STROMBERG P.C., HUNNINGHAKE G.W., MARSH C.B. Important roles for macrophage colony-stimulating factor, CC chemokine ligand 2, and mononuclear phagocytes in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, **176**, 78-89.
- BARCELLOS-HOFF M.H., DERYNCK R., TSANG M.L., WEATHERBEE J.A. Transforming growth factor-beta activation in irradiated murine mammary gland. *J Clin Invest*, 1994, **93**, 892-899.
- BARCELLOS-HOFF M.H., DIX T.A. Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-beta 1. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 1996, **10**, 1077-1083.
- BARGAGLI E., PRASSE A., OLIVIERI C., MULLER-QUERNHEIM J., ROTTOLI P. Macrophage-derived biomarkers of idiopathic pulmonary fibrosis. *Pulm Med*, 2011, **2011**, 717130.
- BARTLETT J.A., GAKHAR L., PENTERMAN J., SINGH P.K., MALLAMPALLI R.K., PORTER E., MCCRAY P.B., JR. PLUNC: a multifunctional surfactant of the airways. *Biochem Soc Trans*, 2011, **39**, 1012-1016.
- BARTRAM U., SPEER C.P. The role of transforming growth factor beta in lung development and disease. *Chest*, 2004, **125**, 754-765.
- BAUMGARTNER K.B., SAMET J.M., STIDLEY C.A., COLBY T.V., WALDRON J.A. Cigarette smoking: a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997, **155**, 242-248.
- BERGERON A., SOLER P., KAMBOUCHNER M., LOISEAU P., MILLERON B., VALEYRE D., HANCE A.J., TAZI A. Cytokine profiles in idiopathic pulmonary fibrosis suggest an important role for TGF-beta and IL-10. *Eur Respir J*, 2003, **22**, 69-76.
- BEST A.C., MENG J., LYNCH A.M., BOZIC C.M., MILLER D., GRUNWALD G.K., LYNCH D.A. Idiopathic pulmonary fibrosis: physiologic tests, quantitative CT indexes, and CT visual scores as predictors of mortality. *Radiology*, 2008, **246**, 935-940.
- BIONDO A.W., WIEDMEYER C.E., SISSON D.D., SOLTER P.F. Comparative sequences of canine and feline endothelin-1. *Vet Clin Pathol*, 2003, **32**, 188-194.
- BITTERMAN P.B., ADELBERG S., CRYSTAL R.G. Mechanisms of pulmonary fibrosis. Spontaneous release of the alveolar macrophage-derived growth factor in the interstitial lung disorders. *J Clin Invest*, 1983, **72**, 1801-1813.
- BITTERMAN P.B., RENNARD S.I., KEOGH B.A., WEWERS M.D., ADELBERG S., CRYSTAL R.G. Familial idiopathic pulmonary fibrosis. Evidence of lung inflammation in unaffected family members. *N Engl J Med*, 1986, **314**, 1343-1347.
- BJORAKER J.A., RYU J.H., EDWIN M.K., MYERS J.L., TAZELAAR H.D., SCHROEDER D.R., OFFORD K.P. Prognostic significance of histopathologic subsets in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, **157**, 199-203.
- BODDY K.N., ROCHE B.M., SCHWARTZ D.S., NAKAYAMA T., HAMLIN R.L. Evaluation of the six-minute walk test in dogs. *Am J Vet Res*, 2004, **65**, 311-313.

- BOGATKEVICH G.S., TOURKINA E., SILVER R.M., LUDWICKA-BRADLEY A. Thrombin differentiates normal lung fibroblasts to a myofibroblast phenotype via the proteolytically activated receptor-1 and a protein kinase C-dependent pathway. *J Biol Chem*, 2001, **276**, 45184-45192.
- BOIVIN G.P., O'TOOLE B.A., ORSMBY I.E., DIEBOLD R.J., EIS M.J., DOETSCHMAN T., KIER A.B. Onset and progression of pathological lesions in transforming growth factor-beta 1-deficient mice. *Am J Pathol*, 1995, **146**, 276-288.
- BONNER J.C., BADGETT A., LINDROOS P.M., OSORNIO-VARGAS A.R. Transforming growth factor beta 1 downregulates the platelet-derived growth factor alpha-receptor subtype on human lung fibroblasts in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1995, **13**, 496-505.
- BONNIAUD P., KOLB M., GALT T., ROBERTSON J., ROBBINS C., STAMPFLI M., LAVERY C., MARGETTS P.J., ROBERTS A.B., GAULDIE J. Smad3 null mice develop airspace enlargement and are resistant to TGF-beta-mediated pulmonary fibrosis. *J Immunol*, 2004, **173**, 2099-2108.
- BONNIAUD P., MARGETTS P.J., ASK K., FLANDERS K., GAULDIE J., KOLB M. TGF-beta and Smad3 signaling link inflammation to chronic fibrogenesis. *J Immunol*, 2005a, **175**, 5390-5395.
- BONNIAUD P., MARGETTS P.J., KOLB M., SCHROEDER J.A., KAPOUN A.M., DAMM D., MURPHY A., CHAKRAVARTY S., DUGAR S., HIGGINS L., PROTTER A.A., GAULDIE J. Progressive transforming growth factor beta1-induced lung fibrosis is blocked by an orally active ALK5 kinase inhibitor. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005b, **171**, 889-898.
- BOON K., BAILEY N.W., YANG J., STEEL M.P., GROSHONG S., KERVITSKY D., BROWN K.K., SCHWARZ M.I., SCHWARTZ D.A. Molecular phenotypes distinguish patients with relatively stable from progressive idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). *PLoS One*, 2009, **4**, e5134.
- BOOTH A.J., HADLEY R., CORNETT A.M., DREFFS A.A., MATTHES S.A., TSUI J.L., WEISS K., HOROWITZ J.C., FIORE V.F., BARKER T.H., MOORE B.B., MARTINEZ F.J., NIKLASON L.E., WHITE E.S. Acellular normal and fibrotic human lung matrices as a culture system for in vitro investigation. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012, **186**, 866-876.
- BORDER W.A., RUOSLAHTI E. Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair. *J Clin Invest*, 1992, **90**, 1-7.
- BORENSZTAJN K., PEPPELENBOSCH M.P., SPEK C.A. Factor Xa: at the crossroads between coagulation and signaling in physiology and disease. *Trends in molecular medicine*, 2008, **14**, 429-440.
- BRENNER B., HARNEY J.T., AHMED B.A., JEFFUS B.C., UNAL R., MEHTA J.L., KILIC F. Plasma serotonin levels and the platelet serotonin transporter. *Journal of neurochemistry*, 2007, **102**, 206-215.
- BREUSS J.M., GILLET N., LU L., SHEPPARD D., PYTELA R. Restricted distribution of integrin beta 6 mRNA in primate epithelial tissues. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 1993, **41**, 1521-1527.
- BREUSS J.M., GALLO J., DELISSER H.M., KLIMANSKAYA I.V., FOLKESSON H.G., PITTET J.F., NISHIMURA S.L., ALDAPE K., LANDERS D.V., CARPENTER W., ET AL. Expression of the beta 6 integrin subunit in development, neoplasia and tissue repair suggests a role in epithelial remodeling. *Journal of cell science*, 1995, **108 ( Pt 6)**, 2241-2251.
- BRIDGES J.P., XU Y., NA C.L., WONG H.R., WEAVER T.E. Adaptation and increased susceptibility to infection associated with constitutive expression of misfolded SP-C. *The Journal of cell biology*, 2006, **172**, 395-407.
- BRINGARDNER B.D., BARAN C.P., EUBANK T.D., MARSH C.B. The role of inflammation in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Antioxidants & redox signaling*, 2008, **10**, 287-301.

- BRODY A.R., WARSHAMANA G.S., JING Y., POCIASK D.A. Expression of transforming growth factor-beta induces fibroproliferative pulmonary disease in fibrosis-resistant mice. *Chest*, 2001, **120**, 48S-49S.
- BROEKELMANN T.J., LIMPER A.H., COLBY T.V., MCDONALD J.A. Transforming growth factor beta 1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, **88**, 6642-6646.
- BROWN A.J., DAVISON E., SLEEPER M.M. Clinical efficacy of sildenafil in treatment of pulmonary arterial hypertension in dogs. *J Vet Intern Med*, 2010, **24**, 850-854.
- BRUSS M.L., MARGOLIN S.B., GIRI S.N. Pharmacokinetics of orally administered pirfenidone in male and female beagles. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 2004, **27**, 361-367.
- BUCALA R., SPIEGEL L.A., CHESNEY J., HOGAN M., CERAMI A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 1994, **1**, 71-81.
- BUHLING F., WILLE A., ROCKEN C., WIESNER O., BAIER A., MEINECKE I., WELTE T., PAP T. Altered expression of membrane-bound and soluble CD95/Fas contributes to the resistance of fibrotic lung fibroblasts to FasL induced apoptosis. *Respir Res*, 2005, **6**, 37.
- CAMBIER S., MU D.Z., O'CONNELL D., BOYLEN K., TRAVIS W., LIU W.H., BROADDUS V.C., NISHIMURA S.L. A role for the integrin alphavbeta8 in the negative regulation of epithelial cell growth. *Cancer research*, 2000, **60**, 7084-7093.
- CAMPISI J., D'ADDA DI FAGAGNA F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2007, **8**, 729-740.
- CANFIELD P.J., ROTHWELL T.L., PAPADIMITRIOU J.M., MOORE J.D. Siliceous pneumoconiosis in two dogs. *J Comp Pathol*, 1989, **100**, 199-202.
- CANTIN A.M., NORTH S.L., FELS G.A., HUBBARD R.C., CRYSTAL R.G. Oxidant-mediated epithelial cell injury in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest*, 1987, **79**, 1665-1673.
- CAO B., GUO Z., ZHU Y., XU W. The potential role of PDGF, IGF-1, TGF-beta expression in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chinese medical journal*, 2000, **113**, 776-782.
- CAR B.D., MELONI F., LUISETTI M., SEMENZATO G., GIALDRONI-GRASSI G., WALZ A. Elevated IL-8 and MCP-1 in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 1994, **149**, 655-659.
- CARRE P.C., MORTENSON R.L., KING T.E., JR., NOBLE P.W., SABLE C.L., RICHES D.W. Increased expression of the interleukin-8 gene by alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis. A potential mechanism for the recruitment and activation of neutrophils in lung fibrosis. *J Clin Invest*, 1991, **88**, 1802-1810.
- CHA S.I., RYERSON C.J., LEE J.S., KUKREJA J., BARRY S.S., JONES K.D., ELICKER B.M., KIM D.S., PAPA F.R., COLLARD H.R., WOLTERS P.J. Cleaved cytokeratin-18 is a mechanistically informative biomarker in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res*, 2012, **13**, 105.
- CHARPIN J.M., VALCKE J., KETTANEH L., EPARDEAU B., STERN M., ISRAEL-BIET D. Peaks of transforming growth factor-beta mRNA in alveolar cells of lung transplant recipients as an early marker of chronic rejection. *Transplantation*, 1998, **65**, 752-755.
- CHECA M., RUIZ V., MONTANO M., VELAZQUEZ-CRUZ R., SELMAN M., PARDO A. MMP-1 polymorphisms and the risk of idiopathic pulmonary fibrosis. *Human genetics*, 2008, **124**, 465-472.



- CHOI E.S., JAKUBZICK C., CARPENTER K.J., KUNKEL S.L., EVANOFF H., MARTINEZ F.J., FLAHERTY K.R., TOEWS G.B., COLBY T.V., KAZEROONI E.A., GROSS B.H., TRAVIS W.D., HOGABOAM C.M. Enhanced monocyte chemoattractant protein-3/CC chemokine ligand-7 in usual interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004, **170**, 508-515.
- CHRISTENSEN B.C., HOUSEMAN E.A., MARSIT C.J., ZHENG S., WRENSCH M.R., WIEMELS J.L., NELSON H.H., KARAGAS M.R., PADBURY J.F., BUENO R., SUGARBAKER D.J., YEH R.F., WIENCKE J.K., KELSEY K.T. Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CpG island context. *PLoS genetics*, 2009, **5**, e1000602.
- CHUA F., GAULDIE J., LAURENT G.J. Pulmonary fibrosis: searching for model answers. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005, **33**, 9-13.
- CISNEROS J., HAGOOD J., CHECA M., ORTIZ-QUINTERO B., NEGREROS M., HERRERA I., RAMOS C., PARDO A., SELMAN M. Hypermethylation-mediated silencing of p14(ARF) in fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012, **303**, L295-303.
- CLERCX C., PEETERS D., SNAPS F., HANSEN P., MCENTEE K., DETILLEUX J., HENROTEAUX M., DAY M.J. Eosinophilic bronchopneumopathy in dogs. *J Vet Intern Med*, 2000, **14**, 282-291.
- COKER R.K., LAURENT G.J., SHAHZEIDI S., HERNANDEZ-RODRIGUEZ N.A., PANTELIDIS P., DU BOIS R.M., JEFFERY P.K., MCANULTY R.J. Diverse cellular TGF-beta 1 and TGF-beta 3 gene expression in normal human and murine lung. *Eur Respir J*, 1996, **9**, 2501-2507.
- COKER R.K., LAURENT G.J., SHAHZEIDI S., LYMPANY P.A., DU BOIS R.M., JEFFERY P.K., MCANULTY R.J. Transforming growth factors-beta 1, -beta 2, and -beta 3 stimulate fibroblast procollagen production in vitro but are differentially expressed during bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Pathol*, 1997, **150**, 981-991.
- COKER R.K., LAURENT G.J., JEFFERY P.K., DU BOIS R.M., BLACK C.M., MCANULTY R.J. Localisation of transforming growth factor beta1 and beta3 mRNA transcripts in normal and fibrotic human lung. *Thorax*, 2001, **56**, 549-556.
- COLLARD H.R., RYU J.H., DOUGLAS W.W., SCHWARZ M.I., CURRAN-EVERETT D., KING T.E., JR., BROWN K.K. Combined corticosteroid and cyclophosphamide therapy does not alter survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*, 2004, **125**, 2169-2174.
- COLLARD H.R., MOORE B.B., FLAHERTY K.R., BROWN K.K., KANER R.J., KING T.E., JR., LASKY J.A., LOYD J.E., NOTH I., OLMAN M.A., RAGHU G., ROMAN J., RYU J.H., ZISMAN D.A., HUNNINGHAKE G.W., COLBY T.V., EGAN J.J., HANSELL D.M., JOHKOH T., KAMINSKI N., KIM D.S., KONDOH Y., LYNCH D.A., MULLER-QUERNHEIM J., MYERS J.L., NICHOLSON A.G., SELMAN M., TOEWS G.B., WELLS A.U., MARTINEZ F.J. Acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, **176**, 636-643.
- CORCORAN B.M., COBB M., MARTIN M.W., DUKES-MCEWAN J., FRENCH A., FUENTES V.L., BOSWOOD A., RHIND S. Chronic pulmonary disease in West Highland white terriers. *Vet Rec*, 1999a, **144**, 611-616.
- CORCORAN B.M., DUKES-MCEWAN J., RHIND S., FRENCH A. Idiopathic pulmonary fibrosis in a Staffordshire bull terrier with hypothyroidism. *J Small Anim Pract*, 1999b, **40**, 185-188.
- CORCORAN B.M., KING L.G., SCHWARZ T., HAMMOND G., SULLIVAN M. Further characterisation of the clinical features of chronic pulmonary disease in West Highland white terriers. *Vet Rec*, 2011, **168**, 355.

- CORRIN B., BUTCHER D., MCANULTY B.J., DUBOIS R.M., BLACK C.M., LAURENT G.J., HARRISON N.K. Immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta 1 in the lungs of patients with systemic sclerosis, cryptogenic fibrosing alveolitis and other lung disorders. *Histopathology*, 1994, **24**, 145-150.
- COSGROVE G.P., SCHWARZ M.I., GERACI M.W., BROWN K.K., WORTHEN G.S. Overexpression of Matrix Metalloproteinase-7 in Pulmonary Fibrosis. *Chest*, 2002, **121**, 25S-26S.
- COSGROVE G.P., BROWN K.K., SCHIEMANN W.P., SERLS A.E., PARR J.E., GERACI M.W., SCHWARZ M.I., COOL C.D., WORTHEN G.S. Pigment epithelium-derived factor in idiopathic pulmonary fibrosis: a role in aberrant angiogenesis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004, **170**, 242-251.
- COTTIN V., NUNES H., BRILLET P.Y., DELAVAL P., DEVOUASSOUX G., TILLIE-LEBLOND I., ISRAEL-BIET D., COURT-FORTUNE I., VALEYRE D., CORDIER J.F. Combined pulmonary fibrosis and emphysema: a distinct underrecognised entity. *Eur Respir J*, 2005, **26**, 586-593.
- COTTIN V., LE PAVEC J., PREVOT G., MAL H., HUMBERT M., SIMONNEAU G., CORDIER J.F. Pulmonary hypertension in patients with combined pulmonary fibrosis and emphysema syndrome. *Eur Respir J*, 2010, **35**, 105-111.
- COULTAS D.B., ZUMWALT R.E., BLACK W.C., SOBONYA R.E. The epidemiology of interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med*, 1994, **150**, 967-972.
- COWARD W.R., SAINI G., JENKINS G. The pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Therapeutic advances in respiratory disease*, 2010, **4**, 367-388.
- CRAWFORD S.E., STELLMACH V., MURPHY-ULLRICH J.E., RIBEIRO S.M., LAWLER J., HYNES R.O., BOIVIN G.P., BOUCK N. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell*, 1998, **93**, 1159-1170.
- CRONKHITE J.T., XING C., RAGHU G., CHIN K.M., TORRES F., ROSENBLATT R.L., GARCIA C.K. Telomere shortening in familial and sporadic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, **178**, 729-737.
- CUMMINGS A.C., SPAULDING K.A., SCOTT K.D., EDWARDS J.F. IMAGING DIAGNOSIS-PULMONARY ALVEOLAR PROTEINOSIS IN A DOG. *Vet Radiol Ultrasound*, 2013.
- CUTRONEO K.R., WHITE S.L., PHAN S.H., EHRLICH H.P. Therapies for bleomycin induced lung fibrosis through regulation of TGF-beta1 induced collagen gene expression. *Journal of cellular physiology*, 2007, **211**, 585-589.
- D'OIDIO F., SINGER L.G., HADJILIADIS D., PIERRE A., WADDELL T.K., DE PERROT M., HUTCHEON M., MILLER L., DARLING G., KESHAVJEE S. Prevalence of gastroesophageal reflux in end-stage lung disease candidates for lung transplant. *The Annals of thoracic surgery*, 2005, **80**, 1254-1260.
- DABOVIC B., CHEN Y., COLAROSSO C., OBATA H., ZAMBUTO L., PERLE M.A., RIFKIN D.B. Bone abnormalities in latent TGF-[beta] binding protein (Ltbp)-3-null mice indicate a role for Ltbp-3 in modulating TGF-[beta] bioavailability. *The Journal of cell biology*, 2002, **156**, 227-232.
- DALLAS S.L., MIYAZONO K., SKERRY T.M., MUNDY G.R., BONEWALD L.F. Dual role for the latent transforming growth factor-beta binding protein in storage of latent TGF-beta in the extracellular matrix and as a structural matrix protein. *The Journal of cell biology*, 1995, **131**, 539-549.
- DANCER R.C., WOOD A.M., THICKETT D.R. Metalloproteinases in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*, 2011, **38**, 1461-1467.
- DANIEL C., TAKABATAKE Y., MIZUI M., ISAKA Y., KAWASHI H., RUPPRECHT H., IMAI E., HUGO C. Antisense oligonucleotides against thrombospondin-1 inhibit activation of tgf-beta in fibrotic renal disease in the rat in vivo. *Am J Pathol*, 2003, **163**, 1185-1192.

- DANIIL Z.D., PAPAGEORGIOU E., KOUTSOKERA A., KOSTIKAS K., KIROPOULOS T., PAPAIOANNOU A.I., GOURGOULIANIS K.I. Serum levels of oxidative stress as a marker of disease severity in idiopathic pulmonary fibrosis. *Pulm Pharmacol Ther*, 2008, **21**, 26-31.
- DASARI A., BARTHOLOMEW J.N., VOLONTE D., GALBIATI F. Oxidative stress induces premature senescence by stimulating caveolin-1 gene transcription through p38 mitogen-activated protein kinase/Sp1-mediated activation of two GC-rich promoter elements. *Cancer research*, 2006, **66**, 10805-10814.
- DATTA A., SCOTTON C.J., CHAMBERS R.C. Novel therapeutic approaches for pulmonary fibrosis. *Br J Pharmacol*, 2011, **163**, 141-172.
- DE BOER W.I., VAN SCHADEWIJK A., SONT J.K., SHARMA H.S., STOLK J., HIEMSTRA P.S., VAN KRIEKEN J.H. Transforming growth factor beta1 and recruitment of macrophages and mast cells in airways in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, **158**, 1951-1957.
- DEGRYSE A.L., TANJORE H., XU X.C., POLOSUKHIN V.V., JONES B.R., MCMAHON F.B., GLEAVES L.A., BLACKWELL T.S., LAWSON W.E. Repetitive intratracheal bleomycin models several features of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010, **299**, L442-452.
- DEGUCHI Y. Spontaneous increase of transforming growth factor beta production by bronchoalveolar mononuclear cells of patients with systemic autoimmune diseases affecting the lung. *Annals of the rheumatic diseases*, 1992, **51**, 362-365.
- DEMLING N., EHRHARDT C., KASPER M., LAUE M., KNELS L., RIEBER E.P. Promotion of cell adherence and spreading: a novel function of RAGE, the highly selective differentiation marker of human alveolar epithelial type I cells. *Cell and tissue research*, 2006, **323**, 475-488.
- DENNLER S., ITOH S., VIVIEN D., TEN DIJKE P., HUET S., GAUTHIER J.M. Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J*, 1998, **17**, 3091-3100.
- DERYNCK R., ZHANG Y.E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*, 2003, **425**, 577-584.
- DING Q., LUCKHARDT T., HECKER L., ZHOU Y., LIU G., ANTONY V.B., DEANDRADE J., THANNICKAL V.J. New insights into the pathogenesis and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Drugs*, 2011, **71**, 981-1001.
- DISATIAN S., ORTON E.C. Autocrine serotonin and transforming growth factor beta 1 signaling mediates spontaneous myxomatous mitral valve disease. *The Journal of heart valve disease*, 2009, **18**, 44-51.
- DOUGLAS W.W., RYU J.H., SCHROEDER D.R. Idiopathic pulmonary fibrosis: Impact of oxygen and colchicine, prednisone, or no therapy on survival. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, **161**, 1172-1178.
- DREWS F., KNOBEL S., MOSER M., MUHLACK K.G., MOHREN S., STOLL C., BOSIO A., GRESSNER A.M., WEISKIRCHEN R. Disruption of the latent transforming growth factor-beta binding protein-1 gene causes alteration in facial structure and influences TGF-beta bioavailability. *Biochimica et biophysica acta*, 2008, **1783**, 34-48.
- DUBAYBO B.A., THET L.A. Effect of transforming growth factor beta on synthesis of glycosaminoglycans by human lung fibroblasts. *Exp Lung Res*, 1990, **16**, 389-403.
- EATON T., YOUNG P., MILNE D., WELLS A.U. Six-minute walk, maximal exercise tests: reproducibility in fibrotic interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005, **171**, 1150-1157.

- EBINA M., SHIMIZUKAWA M., SHIBATA N., KIMURA Y., SUZUKI T., ENDO M., SASANO H., KONDO T., NUKIWA T. Heterogeneous increase in CD34-positive alveolar capillaries in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004, **169**, 1203-1208.
- EDWARDS D.R., MURPHY G., REYNOLDS J.J., WHITHAM S.E., DOCHERTY A.J., ANGEL P., HEATH J.K. Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J*, 1987, **6**, 1899-1904.
- EGAN J.J., STEWART J.P., HASLETON P.S., ARRAND J.R., CARROLL K.B., WOODCOCK A.A. Epstein-Barr virus replication within pulmonary epithelial cells in cryptogenic fibrosing alveolitis. *Thorax*, 1995, **50**, 1234-1239.
- EKERT J.E., MURRAY L.A., DAS A.M., SHENG H., GILES-KOMAR J., RYCYZYN M.A. Chemokine (C-C motif) ligand 2 mediates direct and indirect fibrotic responses in human and murine cultured fibrocytes. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2011, **4**, 23.
- EL-GAMEL A., AWAD M.R., HASLETON P.S., YONAN N.A., HUTCHINSON J.A., CAMPBELL C.S., RAHMAN A.H., DEIRANIYA A.K., SINNOTT P.J., HUTCHINSON I.V. Transforming growth factor-beta (TGF-beta1) genotype and lung allograft fibrosis. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, 1999, **18**, 517-523.
- ELSSNER A., JAUMANN F., DOBMANN S., BEHR J., SCHWAIBLMAIR M., REICHENSPURNER H., FURST H., BRIEGEL J., VOGELMEIER C. Elevated levels of interleukin-8 and transforming growth factor-beta in bronchoalveolar lavage fluid from patients with bronchiolitis obliterans syndrome: proinflammatory role of bronchial epithelial cells. Munich Lung Transplant Group. *Transplantation*, 2000, **70**, 362-367.
- ENOMOTO N., SUDA T., KATO M., KAIDA Y., NAKAMURA Y., IMOKAWA S., IDA M., CHIDA K. Quantitative analysis of fibroblastic foci in usual interstitial pneumonia. *Chest*, 2006, **130**, 22-29.
- ENRIGHT P.L. The six-minute walk test. *Respiratory care*, 2003, **48**, 783-785.
- ERIKSSON M., VON EULER H., EKMAN E., NORDLING K., HAGGSTROM J., JOHANSSON J. Surfactant protein C in canine pulmonary fibrosis. *J Vet Intern Med*, 2009, **23**, 1170-1174.
- FALFAN-VALENCIA R., CAMARENA A., JUAREZ A., BECERRIL C., MONTANO M., CISNEROS J., MENDOZA F., GRANADOS J., PARDO A., SELMAN M. Major histocompatibility complex and alveolar epithelial apoptosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Human genetics*, 2005, **118**, 235-244.
- FEHRENBACH H., KASPER M., TSCHERNIG T., SHEARMAN M.S., SCHUH D., MULLER M. Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) exhibits highly differential cellular and subcellular localisation in rat and human lung. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 1998, **44**, 1147-1157.
- FERNANDEZ I.E., EICKELBERG O. The impact of TGF-beta on lung fibrosis: from targeting to biomarkers. *Proc Am Thorac Soc*, 2012, **9**, 111-116.
- FINE A., GOLDSTEIN R.H. The effect of transforming growth factor-beta on cell proliferation and collagen formation by lung fibroblasts. *J Biol Chem*, 1987, **262**, 3897-3902.
- FINGERLIN T.E., MURPHY E., ZHANG W., PELJTO A.L., BROWN K.K., STEELE M.P., LOYD J.E., COSGROVE G.P., LYNCH D., GROSHONG S., COLLARD H.R., WOLTERS P.J., BRADFORD W.Z., KOSSEN K., SEIWERT S.D., DU BOIS R.M., GARCIA C.K., DEVINE M.S., GUDMUNDSSON G., ISAKSSON H.J., KAMINSKI N., ZHANG Y., GIBSON K.F., LANCASTER L.H., COGAN J.D., MASON W.R., MAHER T.M., MOLYNEAUX P.L., WELLS A.U., MOFFATT M.F., SELMAN M., PARDO A., KIM D.S., CRAPO J.D., MAKE B.J., REGAN E.A., WALEK D.S., DANIEL J.J., KAMATANI Y., ZELENKA D., SMITH K., MCKEAN D., PEDERSEN B.S., TALBERT J., KIDD R.N., MARKIN C.R., BECKMAN K.B., LATHROP M.,

- SCHWARZ M.I., SCHWARTZ D.A. Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for pulmonary fibrosis. *Nat Genet*, 2013, **45**, 613-620.
- FLAHERTY K.R., TOEWS G.B., TRAVIS W.D., COLBY T.V., KAZEROONI E.A., GROSS B.H., JAIN A., STRAWDERMAN R.L., 3RD, PAINE R., FLINT A., LYNCH J.P., 3RD, MARTINEZ F.J. Clinical significance of histological classification of idiopathic interstitial pneumonia. *Eur Respir J*, 2002, **19**, 275-283.
- FLAHERTY K.R., COLBY T.V., TRAVIS W.D., TOEWS G.B., MUMFORD J., MURRAY S., THANNICKAL V.J., KAZEROONI E.A., GROSS B.H., LYNCH J.P., 3RD, MARTINEZ F.J. Fibroblastic foci in usual interstitial pneumonia: idiopathic versus collagen vascular disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003a, **167**, 1410-1415.
- FLAHERTY K.R., THWAITE E.L., KAZEROONI E.A., GROSS B.H., TOEWS G.B., COLBY T.V., TRAVIS W.D., MUMFORD J.A., MURRAY S., FLINT A., LYNCH J.P., 3RD, MARTINEZ F.J. Radiological versus histological diagnosis in UIP and NSIP: survival implications. *Thorax*, 2003b, **58**, 143-148.
- FLAHERTY K.R., KING T.E., JR., RAGHU G., LYNCH J.P., 3RD, COLBY T.V., TRAVIS W.D., GROSS B.H., KAZEROONI E.A., TOEWS G.B., LONG Q., MURRAY S., LAMA V.N., GAY S.E., MARTINEZ F.J. Idiopathic interstitial pneumonia: what is the effect of a multidisciplinary approach to diagnosis? *Am J Respir Crit Care Med*, 2004, **170**, 904-910.
- FLAHERTY K.R., ANDREI A.C., KING T.E., JR., RAGHU G., COLBY T.V., WELLS A., BASSILY N., BROWN K., DU BOIS R., FLINT A., GAY S.E., GROSS B.H., KAZEROONI E.A., KNAPP R., LOUVAR E., LYNCH D., NICHOLSON A.G., QUICK J., THANNICKAL V.J., TRAVIS W.D., VYSKOCIL J., WADENSTORER F.A., WILT J., TOEWS G.B., MURRAY S., MARTINEZ F.J. Idiopathic interstitial pneumonia: do community and academic physicians agree on diagnosis? *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, **175**, 1054-1060.
- FLAUMENHAFT R., ABE M., SATO Y., MIYAZONO K., HARPEL J., HELDIN C.H., RIFKIN D.B. Role of the latent TGF-beta binding protein in the activation of latent TGF-beta by co-cultures of endothelial and smooth muscle cells. *The Journal of cell biology*, 1993, **120**, 995-1002.
- FONTANA L., CHEN Y., PRIJATELJ P., SAKAI T., FASSLER R., SAKAI L.Y., RIFKIN D.B. Fibronectin is required for integrin alphavbeta6-mediated activation of latent TGF-beta complexes containing LTBP-1. *FASEB J*, 2005, **19**, 1798-1808.
- FORTUNATO G.A., MACHADO M.M., ANDRADE C.F., FELICETTI J.C., CAMARGO JDE J., CARDOSO P.F. Prevalence of gastroesophageal reflux in lung transplant candidates with advanced lung disease. *Jornal brasileiro de pneumologia : publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia*, 2008, **34**, 772-778.
- FOX D.J., KHATTAR R.S. Carcinoid heart disease: presentation, diagnosis, and management. *Heart*, 2004, **90**, 1224-1228.
- FRAZIER W.A. Thrombospondins. *Current opinion in cell biology*, 1991, **3**, 792-799.
- FREEBURN R.W., KENDALL H., DOBSON L., EGAN J., SIMLER N.J., MILLAR A.B. The 3' untranslated region of tumor necrosis factor-alpha is highly conserved in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). *European cytokine network*, 2001, **12**, 33-38.
- FRIEDLAND J.S. Chemokines in viral disease. *Research in virology*, 1996, **147**, 131-138.
- FRISHMAN W.H., GREWALL P. Serotonin and the heart. *Annals of medicine*, 2000, **32**, 195-209.
- FUJII T., OTSUKA T., TANAKA S., KANAZAWA H., HIRATA K., KOHNO M., KURIHARA N., YOSHIKAWA J. Plasma endothelin-1 level in chronic obstructive pulmonary disease: relationship with natriuretic peptide. *Respiration*, 1999, **66**, 212-219.
- FUJISHIMA S., SHIOMI T., YAMASHITA S., YOGO Y., NAKANO Y., INOUE T., NAKAMURA M., TASAKA S., HASEGAWA N., AIKAWA N., ISHIZAKA A., OKADA Y.

Production and activation of matrix metalloproteinase 7 (matrilysin 1) in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Arch Pathol Lab Med*, 2010, **134**, 1136-1142.

GAKHAR L., BARTLETT J.A., PENTERMAN J., MIZRACHI D., SINGH P.K., MALLAMPALLI R.K., RAMASWAMY S., MCCRAY P.B., JR. PLUNC is a novel airway surfactant protein with anti-biofilm activity. *PLoS One*, 2010, **5**, e9098.

GAULDIE J., KOLB M. Animal models of pulmonary fibrosis: how far from effective reality? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, **294**, L151.

GAWLIK R., JASTRZEBSKI D., ZIORA D., JARZAB J. Concentration of endothelin in plasma and BALF fluid from asthmatic patients. *J Physiol Pharmacol*, 2006, **57 Suppl 4**, 103-110.

GEDDES D.M., WEBLEY M., BREWERTON D.A., TURTON C.W., TURNER-WARWICK M., MURPHY A.H., WARD A.M. alpha 1-antitrypsin phenotypes in fibrosing alveolitis and rheumatoid arthritis. *Lancet*, 1977, **2**, 1049-1051.

GHARAEI-KERMANI M., DENHOLM E.M., PHAN S.H. Costimulation of fibroblast collagen and transforming growth factor beta1 gene expression by monocyte chemoattractant protein-1 via specific receptors. *J Biol Chem*, 1996, **271**, 17779-17784.

GIAID A., MICHEL R.P., STEWART D.J., SHEPPARD M., CORRIN B., HAMID Q. Expression of endothelin-1 in lungs of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis. *Lancet*, 1993, **341**, 1550-1554.

GIRI S.N., HYDE D.M., HOLLINGER M.A. Effect of antibody to transforming growth factor beta on bleomycin induced accumulation of lung collagen in mice. *Thorax*, 1993, **48**, 959-966.

GOERKE J. Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. *Biochimica et biophysica acta*, 1998, **1408**, 79-89.

GOODWIN A., JENKINS G. Role of integrin-mediated TGFbeta activation in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Biochem Soc Trans*, 2009, **37**, 849-854.

GRAINGER D.J., HEATHCOTE K., CHIANO M., SNIEDER H., KEMP P.R., METCALFE J.C., CARTER N.D., SPECTOR T.D. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1. *Human molecular genetics*, 1999, **8**, 93-97.

GRAINGER D.J., MOSEDALE D.E., METCALFE J.C. TGF-beta in blood: a complex problem. *Cytokine & growth factor reviews*, 2000, **11**, 133-145.

GRANDE J.P. Role of transforming growth factor-beta in tissue injury and repair. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 1997, **214**, 27-40.

GREENE K.E., KING T.E., JR., KUROKI Y., BUCHER-BARTELSON B., HUNNINGHAKE G.W., NEWMAN L.S., NAGAE H., MASON R.J. Serum surfactant proteins-A and -D as biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*, 2002, **19**, 439-446.

GRENIER P., VALEYRE D., CLUZEL P., BRAUNER M.W., LENOIR S., CHASTANG C. Chronic diffuse interstitial lung disease: diagnostic value of chest radiography and high-resolution CT. *Radiology*, 1991, **179**, 123-132.

GREWAL J.S., MUKHIN Y.V., GARNOVSKAYA M.N., RAYMOND J.R., GREENE E.L. Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor induces TGF-beta1 expression in mesangial cells via ERK: proliferative and fibrotic signals. *The American journal of physiology*, 1999, **276**, F922-930.

GRIBBIN J., HUBBARD R.B., LE JEUNE I., SMITH C.J., WEST J., TATA L.J. Incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis in the UK. *Thorax*, 2006, **61**, 980-985.

GRIBBIN J., HUBBARD R., SMITH C. Role of diabetes mellitus and gastro-oesophageal reflux in the aetiology of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med*, 2009, **103**, 927-931.

- GUALANDRIS A., ANNES J.P., ARESE M., NOGUERA I., JURUKOVSKI V., RIFKIN D.B. The latent transforming growth factor-beta-binding protein-1 promotes in vitro differentiation of embryonic stem cells into endothelium. *Molecular biology of the cell*, 2000, **11**, 4295-4308.
- GUSTAFSON T., DAHLMAN-HOGLUND A., NILSSON K., STROM K., TORNLING G., TOREN K. Occupational exposure and severe pulmonary fibrosis. *Respir Med*, 2007, **101**, 2207-2212.
- HAGIMOTO N., KUWANO K., INOSHIMA I., YOSHIMI M., NAKAMURA N., FUJITA M., MAEYAMA T., HARA N. TGF-beta 1 as an enhancer of Fas-mediated apoptosis of lung epithelial cells. *J Immunol*, 2002, **168**, 6470-6478.
- HAHM K., LUKASHEV M.E., LUO Y., YANG W.J., DOLINSKI B.M., WEINREB P.H., SIMON K.J., CHUN WANG L., LEONE D.R., LOBB R.R., MCCRANN D.J., ALLAIRE N.E., HORAN G.S., FOGO A., KALLURI R., SHIELD C.F., 3RD, SHEPPARD D., GARDNER H.A., VIOLETTE S.M. Alpha6 integrin regulates renal fibrosis and inflammation in Alport mouse. *Am J Pathol*, 2007, **170**, 110-125.
- HAIDER Y., MALIZIA A.P., KEATING D.T., BIRCH M., TOMLINSON A., MARTIN G., FERGUSON M.W., DORAN P.P., EGAN J.J. Host predisposition by endogenous Transforming Growth Factor-beta1 overexpression promotes pulmonary fibrosis following bleomycin injury. *J Inflamm (Lond)*, 2007, **4**, 18.
- HAKKINEN L., KOIVISTO L., GARDNER H., SAARIALHO-KERE U., CARROLL J.M., LAKSO M., RAUVALA H., LAATO M., HEINO J., LARJAVA H. Increased expression of beta6-integrin in skin leads to spontaneous development of chronic wounds. *Am J Pathol*, 2004, **164**, 229-242.
- HALLSTRAND T.S., BOITANO L.J., JOHNSON W.C., SPADA C.A., HAYES J.G., RAGHU G. The timed walk test as a measure of severity and survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*, 2005, **25**, 96-103.
- HANAK V., RYU J.H., DE CARVALHO E., LIMPER A.H., HARTMAN T.E., DECKER P.A., MYERS J.L. Profusion of fibroblast foci in patients with idiopathic pulmonary fibrosis does not predict outcome. *Respir Med*, 2008, **102**, 852-856.
- HANSELL D.M., BANKIER A.A., MACMAHON H., MCLLOUD T.C., MULLER N.L., REMY J. Fleischner Society: glossary of terms for thoracic imaging. *Radiology*, 2008, **246**, 697-722.
- HARA A., SAKAMOTO N., ISHIMATSU Y., KAKUGAWA T., NAKASHIMA S., HARA S., ADACHI M., FUJITA H., MUKAE H., KOHNO S. S100A9 in BALF is a candidate biomarker of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med*, 2012, **106**, 571-580.
- HASHIMOTO N., PHAN S.H., IMAIZUMI K., MATSUO M., NAKASHIMA H., KAWABE T., SHIMOKATA K., HASEGAWA Y. Endothelial-mesenchymal transition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2010, **43**, 161-172.
- HECKER L., VITTAL R., JONES T., JAGIRDAR R., LUCKHARDT T.R., HOROWITZ J.C., PENNATHUR S., MARTINEZ F.J., THANNICKAL V.J. NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury. *Nature medicine*, 2009, **15**, 1077-1081.
- HEIKKILA-LAURILA H.P., RAJAMAKI M.M. Idiopathic pulmonary fibrosis in west highland white terriers. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 2014, **44**, 129-142.
- HEIKKILA H.P., LAPPALAINEN A.K., DAY M.J., CLERCX C., RAJAMAKI M.M. Clinical, bronchoscopic, histopathologic, diagnostic imaging, and arterial oxygenation findings in West Highland White Terriers with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Vet Intern Med*, 2011, **25**, 433-439.
- HEIKKILA H.P., KRAFFT E., JESPER S., MCENTEE K., RAJAMAKI M.M., CLERCX C. Procollagen type III amino terminal propeptide concentrations in dogs with idiopathic pulmonary

- fibrosis compared with chronic bronchitis and eosinophilic bronchopneumopathy. *Vet J*, 2013, **196**, 52-56.
- HEINO J., IGNOTZ R.A., HEMLER M.E., CROUSE C., MASSAGUE J. Regulation of cell adhesion receptors by transforming growth factor-beta. Concomitant regulation of integrins that share a common beta 1 subunit. *J Biol Chem*, 1989, **264**, 380-388.
- HELDIN C.H., MIYAZONO K., TEN DIJKE P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, 1997, **390**, 465-471.
- HETZEL M., BACHEM M., ANDERS D., TRISCHLER G., FAEHLING M. Different effects of growth factors on proliferation and matrix production of normal and fibrotic human lung fibroblasts. *Lung*, 2005, **183**, 225-237.
- HILL D.J., STRAIN A.J., ELSTOW S.F., SWENNE I., MILNER R.D. Bi-functional action of transforming growth factor-beta on DNA synthesis in early passage human fetal fibroblasts. *Journal of cellular physiology*, 1986, **128**, 322-328.
- HINZ B., PHAN S.H., THANNICKAL V.J., GALLI A., BOCHATON-PIALLAT M.L., GABBIANI G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol*, 2007, **170**, 1807-1816.
- HISATOMI K., MUKAE H., SAKAMOTO N., ISHIMATSU Y., KAKUGAWA T., HARA S., FUJITA H., NAKAMICHI S., OKU H., URATA Y., KUBOTA H., NAGATA K., KOHNO S. Pirfenidone inhibits TGF-beta1-induced over-expression of collagen type I and heat shock protein 47 in A549 cells. *BMC Pulm Med*, 2012, **12**, 24.
- HIWATARI N., SHIMURA S., TAKISHIMA T., SHIRATO K. Bronchoalveolar lavage as a possible cause of acute exacerbation in idiopathic pulmonary fibrosis patients. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 1994, **174**, 379-386.
- HIWATARI N., SHIMURA S., YAMAUCHI K., NARA M., HIDA W., SHIRATO K. Significance of elevated procollagen-III-peptide and transforming growth factor-beta levels of bronchoalveolar lavage fluids from idiopathic pulmonary fibrosis patients. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 1997, **181**, 285-295.
- HOCHER B., SCHWARZ A., FAGAN K.A., THONE-REINEKE C., EL-HAG K., KUSSEROW H., ELITOK S., BAUER C., NEUMAYER H.H., RODMAN D.M., THEURING F. Pulmonary fibrosis and chronic lung inflammation in ET-1 transgenic mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2000, **23**, 19-26.
- HODGSON U., LAITINEN T., TUKIAINEN P. Nationwide prevalence of sporadic and familial idiopathic pulmonary fibrosis: evidence of founder effect among multiplex families in Finland. *Thorax*, 2002, **57**, 338-342.
- HOFER M. Advanced chronic lung disease: need for an active interdisciplinary approach. *Swiss medical weekly*, 2007, **137**, 593-601.
- HOGG P.J., STENFLO J., MOSHER D.F. Thrombospondin is a slow tight-binding inhibitor of plasmin. *Biochemistry*, 1992, **31**, 265-269.
- HONG K.M., BELPERIO J.A., KEANE M.P., BURDICK M.D., STRIETER R.M. Differentiation of human circulating fibrocytes as mediated by transforming growth factor-beta and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem*, 2007, **282**, 22910-22920.
- HORAN G.S., WOOD S., ONA V., LI D.J., LUKASHEV M.E., WEINREB P.H., SIMON K.J., HAHM K., ALLAIRE N.E., RINALDI N.J., GOYAL J., FEGHALI-BOSTWICK C.A., MATTESON E.L., O'HARA C., LAFYATIS R., DAVIS G.S., HUANG X., SHEPPARD D., VIOLETTE S.M. Partial inhibition of integrin alpha(v)beta6 prevents pulmonary fibrosis without exacerbating inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, **177**, 56-65.
- HOYER D., HANNON J.P., MARTIN G.R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 2002, **71**, 533-554.



- HOYT D.G., LAZO J.S. Alterations in pulmonary mRNA encoding procollagens, fibronectin and transforming growth factor-beta precede bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 1988, **246**, 765-771.
- HOYT D.G., LAZO J.S. Early increases in pulmonary mRNA encoding procollagens and transforming growth factor-beta in mice sensitive to cyclophosphamide-induced pulmonary fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther*, 1989, **249**, 38-43.
- HUANG F., CHEN Y.G. Regulation of TGF-beta receptor activity. *Cell & bioscience*, 2012, **2**, 9.
- HUANG X., WU J., SPONG S., SHEPPARD D. The integrin alphavbeta6 is critical for keratinocyte migration on both its known ligand, fibronectin, and on vitronectin. *Journal of cell science*, 1998a, **111** ( Pt 15), 2189-2195.
- HUANG X., WU J., ZHU W., PYTELA R., SHEPPARD D. Expression of the human integrin beta6 subunit in alveolar type II cells and bronchiolar epithelial cells reverses lung inflammation in beta6 knockout mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1998b, **19**, 636-642.
- HUBBARD R., BAKOU Y., KALSHEKER N., BRITTON J., JOHNSTON I. Alpha1-antitrypsin phenotypes in patients with cryptogenic fibrosing alveolitis: a case-control study. *Eur Respir J*, 1997, **10**, 2881-2883.
- HUBBARD R., COOPER M., ANTONIAK M., VENN A., KHAN S., JOHNSTON I., LEWIS S., BRITTON J. Risk of cryptogenic fibrosing alveolitis in metal workers. *Lancet*, 2000, **355**, 466-467.
- HUBBARD R. Occupational dust exposure and the aetiology of cryptogenic fibrosing alveolitis. *The European respiratory journal. Supplement*, 2001, **32**, 119s-121s.
- HUGO C., PICHLER R., MEEK R., GORDON K., KYRIAKIDES T., FLOEGE J., BORNSTEIN P., COUSER W.G., JOHNSON R.J. Thrombospondin 1 is expressed by proliferating mesangial cells and is up-regulated by PDGF and bFGF in vivo. *Kidney international*, 1995, **48**, 1846-1856.
- HUGO C., KANG D.H., JOHNSON R.J. Sustained expression of thrombospondin-1 is associated with the development of glomerular and tubulointerstitial fibrosis in the remnant kidney model. *Nephron*, 2002, **90**, 460-470.
- HUH J.W., KIM D.S., OH Y.M., SHIM T.S., LIM C.M., LEE S.D., KOH Y., KIM W.S., KIM W.D., KIM K.R. Is metalloproteinase-7 specific for idiopathic pulmonary fibrosis? *Chest*, 2008, **133**, 1101-1106.
- HULSMANN M., STANEK B., FREY B., STURM B., PUTZ D., KOS T., BERGER R., WOLOSZCZUK W., MAURER G., PACHER R. Value of cardiopulmonary exercise testing and big endothelin plasma levels to predict short-term prognosis of patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 1998, **32**, 1695-1700.
- HUNNINGHAKE G.W., ZIMMERMAN M.B., SCHWARTZ D.A., KING T.E., JR., LYNCH J., HEGELE R., WALDRON J., COLBY T., MULLER N., LYNCH D., GALVIN J., GROSS B., HOGG J., TOEWS G., HELMERS R., COOPER J.A., JR., BAUGHMAN R., STRANGE C., MILLARD M. Utility of a lung biopsy for the diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, **164**, 193-196.
- HUTYROVA B., PANTELIDIS P., DRABEK J., ZURKOVA M., KOLEK V., LENHART K., WELSH K.I., DU BOIS R.M., PETREK M. Interleukin-1 gene cluster polymorphisms in sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, **165**, 148-151.
- HWANG J.H., MISUMI S., SAHIN H., BROWN K.K., NEWELL J.D., LYNCH D.A. Computed tomographic features of idiopathic fibrosing interstitial pneumonia: comparison with pulmonary fibrosis related to collagen vascular disease. *Journal of computer assisted tomography*, 2009, **33**, 410-415.

- HYTTIAINEN M., PENTTINEN C., KESKI-OJA J. Latent TGF-beta binding proteins: extracellular matrix association and roles in TGF-beta activation. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 2004, **41**, 233-264.
- HYZY R., HUANG S., MYERS J., FLAHERTY K., MARTINEZ F. Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*, 2007, **132**, 1652-1658.
- IDE M., ISHII H., MUKAE H., IWATA A., SAKAMOTO N., KADOTA J., KOHNO S. High serum levels of thrombospondin-1 in patients with idiopathic interstitial pneumonia. *Respir Med*, 2008, **102**, 1625-1630.
- IDILMAN R., CETINKAYA H., SAVAS I., ASLAN N., SAK S.D., BASTEMIR M., SARIOGLU M., SOYKAN I., BOZDAYI M., COLANTONI A., AYDINTUG O., BAHAR K., UZUNALIMOGLU O., VAN THIEL D.H., NUMANOGLU N., DOKMECI A. Bronchoalveolar lavage fluid analysis in individuals with chronic hepatitis C. *Journal of medical virology*, 2002, **66**, 34-39.
- IGNOTZ R.A., MASSAGUE J. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem*, 1986, **261**, 4337-4345.
- IGNOTZ R.A., MASSAGUE J. Cell adhesion protein receptors as targets for transforming growth factor-beta action. *Cell*, 1987, **51**, 189-197.
- IMAMURA T., TAKASE M., NISHIHARA A., OEDA E., HANAI J., KAWABATA M., MIYAZONO K. Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature*, 1997, **389**, 622-626.
- IRUELA-ARISPE M.L., LISKA D.J., SAGE E.H., BORNSTEIN P. Differential expression of thrombospondin 1, 2, and 3 during murine development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 1993, **197**, 40-56.
- IRVING W.L., DAY S., JOHNSTON I.D. Idiopathic pulmonary fibrosis and hepatitis C virus infection. *Am Rev Respir Dis*, 1993, **148**, 1683-1684.
- ISHII H., MUKAE H., KADOTA J., KAIDA H., NAGATA T., ABE K., MATSUKURA S., KOHNO S. High serum concentrations of surfactant protein A in usual interstitial pneumonia compared with non-specific interstitial pneumonia. *Thorax*, 2003, **58**, 52-57.
- ISHIKAWA N., HATTORI N., YOKOYAMA A., KOHNO N. Utility of KL-6/MUC1 in the clinical management of interstitial lung diseases. *Respiratory investigation*, 2012, **50**, 3-13.
- ISHIOKA K., SUZUKI Y., TAJIMA K., OHTAKI S., MIYABE M., TAKASAKI M., MORI A., MOMOTA Y., AZAKAMI D., SAKO T. Monocyte chemoattractant protein-1 in dogs affected with neoplasia or inflammation. *J Vet Med Sci*, 2013, **75**, 173-177.
- IWAI K., MORI T., YAMADA N., YAMAGUCHI M., HOSODA Y. Idiopathic pulmonary fibrosis. Epidemiologic approaches to occupational exposure. *Am J Respir Crit Care Med*, 1994, **150**, 670-675.
- JACK C.I., JACKSON M.J., JOHNSTON I.D., HIND C.R. Serum indicators of free radical activity in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996, **153**, 1918-1923.
- JAGIRDAR J., LEE T.C., REIBMAN J., GOLD L.I., ASTON C., BEGIN R., ROM W.N. Immunohistochemical localization of transforming growth factor beta isoforms in asbestos-related diseases. *Environmental health perspectives*, 1997, **105 Suppl 5**, 1197-1203.
- JAIN R., SHAUL P.W., BOROK Z., WILLIS B.C. Endothelin-1 induces alveolar epithelial-mesenchymal transition through endothelin type A receptor-mediated production of TGF-beta1. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007, **37**, 38-47.
- JEFFERIES A.R., DUNN J.K., DENNIS R. Pulmonary alveolar proteinosis (phospholipoproteinosis) in a dog. *Journal of Small Animal Practice*, 1987, **28**, 203-214.

JEGAL Y., KIM D.S., SHIM T.S., LIM C.M., DO LEE S., KOH Y., KIM W.S., KIM W.D., LEE J.S., TRAVIS W.D., KITAICHI M., COLBY T.V. Physiology is a stronger predictor of survival than pathology in fibrotic interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005, **171**, 639-644.

JENKINS R.G., SU X., SU G., SCOTTON C.J., CAMERER E., LAURENT G.J., DAVIS G.E., CHAMBERS R.C., MATTHAY M.A., SHEPPARD D. Ligation of protease-activated receptor 1 enhances alpha(v)beta6 integrin-dependent TGF-beta activation and promotes acute lung injury. *J Clin Invest*, 2006, **116**, 1606-1614.

JEONG Y.J., LEE K.S., MULLER N.L., CHUNG M.P., CHUNG M.J., HAN J., COLBY T.V., KIM S. Usual interstitial pneumonia and non-specific interstitial pneumonia: serial thin-section CT findings correlated with pulmonary function. *Korean journal of radiology : official journal of the Korean Radiological Society*, 2005, **6**, 143-152.

JOHKOH T., MULLER N.L., CARTIER Y., KAVANAGH P.V., HARTMAN T.E., AKIRA M., ICHIKADO K., ANDO M., NAKAMURA H. Idiopathic interstitial pneumonias: diagnostic accuracy of thin-section CT in 129 patients. *Radiology*, 1999, **211**, 555-560.

JOHNSON V.S., CORCORAN B.M., WOTTON P.R., SCHWARZ T., SULLIVAN M. Thoracic high-resolution computed tomographic findings in dogs with canine idiopathic pulmonary fibrosis. *J Small Anim Pract*, 2005, **46**, 381-388.

KAARTINEN V., VONCKEN J.W., SHULER C., WARBURTON D., BU D., HEISTERKAMP N., GROFFEN J. Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat Genet*, 1995, **11**, 415-421.

KAGE H., BOROK Z. EMT and interstitial lung disease: a mysterious relationship. *Curr Opin Pulm Med*, 2012, **18**, 517-523.

KALLURI R., NEILSON E.G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest*, 2003, **112**, 1776-1784.

KAMINSKI N., ALLARD J.D., PITTET J.F., ZUO F., GRIFFITHS M.J., MORRIS D., HUANG X., SHEPPARD D., HELLER R.A. Global analysis of gene expression in pulmonary fibrosis reveals distinct programs regulating lung inflammation and fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, **97**, 1778-1783.

KAMINSKI N., FRIEDMAN N. Practical approaches to analyzing results of microarray experiments. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002, **27**, 125-132.

KAMINSKI N., ROSAS I.O. Gene expression profiling as a window into idiopathic pulmonary fibrosis pathogenesis: can we identify the right target genes? *Proc Am Thorac Soc*, 2006, **3**, 339-344.

KANG Y., PRENTICE M.A., MARIANO J.M., DAVARYA S., LINNOILA R.I., MOODY T.W., WAKEFIELD L.M., JAKOWLEW S.B. Transforming growth factor-beta 1 and its receptors in human lung cancer and mouse lung carcinogenesis. *Exp Lung Res*, 2000, **26**, 685-707.

KEHRL J.H., ROBERTS A.B., WAKEFIELD L.M., JAKOWLEW S., SPORN M.B., FAUCI A.S. Transforming growth factor beta is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes. *J Immunol*, 1986, **137**, 3855-3860.

KELLIHAN H.B., STEPIEN R.L. Pulmonary hypertension in dogs: diagnosis and therapy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 2010, **40**, 623-641.

KELLUM H.B., STEPIEN R.L. Sildenafil citrate therapy in 22 dogs with pulmonary hypertension. *J Vet Intern Med*, 2007, **21**, 1258-1264.

KELLY B.G., LOK S.S., HASLETON P.S., EGAN J.J., STEWART J.P. A rearranged form of Epstein-Barr virus DNA is associated with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, **166**, 510-513.

- KELLY M.M., LEIGH R., GILPIN S.E., CHENG E., MARTIN G.E., RADFORD K., COX G., GAULDIE J. Cell-specific gene expression in patients with usual interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006, **174**, 557-565.
- KENYON N.J., WARD R.W., MCGREW G., LAST J.A. TGF-beta1 causes airway fibrosis and increased collagen I and III mRNA in mice. *Thorax*, 2003, **58**, 772-777.
- KESKI-OJA J., RAGHOW R., SAWDEY M., LOSKUTOFF D.J., POSTLETHWAITE A.E., KANG A.H., MOSES H.L. Regulation of mRNAs for type-1 plasminogen activator inhibitor, fibronectin, and type I procollagen by transforming growth factor-beta. Divergent responses in lung fibroblasts and carcinoma cells. *J Biol Chem*, 1988, **263**, 3111-3115.
- KESKI-OJA J., KOLI K., VON MELCHNER H. TGF-beta activation by traction? *Trends in cell biology*, 2004, **14**, 657-659.
- KHALIL N., O'CONNOR R., UNRUH H., WARREN P., KEMP A., GREENBERG A. Enhanced expression and immunohistochemical distribution of transforming growth factor-beta in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*, 1991a, **99**, 65S-66S.
- KHALIL N., O'CONNOR R.N., UNRUH H.W., WARREN P.W., FLANDERS K.C., KEMP A., BEREZNYAY O.H., GREENBERG A.H. Increased production and immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1991b, **5**, 155-162.
- KHALIL N., O'CONNOR R.N., FLANDERS K.C., SHING W., WHITMAN C.I. Regulation of type II alveolar epithelial cell proliferation by TGF-beta during bleomycin-induced lung injury in rats. *The American journal of physiology*, 1994, **267**, L498-507.
- KHALIL N., O'CONNOR R.N., FLANDERS K.C., UNRUH H. TGF-beta 1, but not TGF-beta 2 or TGF-beta 3, is differentially present in epithelial cells of advanced pulmonary fibrosis: an immunohistochemical study. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1996, **14**, 131-138.
- KHALIL N., O'CONNOR R., GOLD L.I., PAREKH T., RAGHU G. Biological effects of transforming growth factor-beta(1) in idiopathic pulmonary fibrosis may be regulated by the activation of latent transforming growth factor-beta(1) and the differential expression of transforming growth factor-beta receptors. *Chest*, 2001a, **120**, 48S.
- KHALIL N., PAREKH T.V., O'CONNOR R., ANTMAN N., KEPRON W., YEHAULAESHET T., XU Y.D., GOLD L.I. Regulation of the effects of TGF-beta 1 by activation of latent TGF-beta 1 and differential expression of TGF-beta receptors (T beta R-I and T beta R-II) in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax*, 2001b, **56**, 907-915.
- KIM D.S., COLLARD H.R., KING T.E., JR. Classification and natural history of the idiopathic interstitial pneumonias. *Proc Am Thorac Soc*, 2006a, **3**, 285-292.
- KIM D.S., PARK J.H., PARK B.K., LEE J.S., NICHOLSON A.G., COLBY T. Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: frequency and clinical features. *Eur Respir J*, 2006b, **27**, 143-150.
- KIM K.K., KUGLER M.C., WOLTERS P.J., ROBILLARD L., GALVEZ M.G., BRUMWELL A.N., SHEPPARD D., CHAPMAN H.A. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006c, **103**, 13180-13185.
- KINDER B.W., BROWN K.K., MCCORMACK F.X., IX J.H., KERVITSKY A., SCHWARZ M.I., KING T.E., JR. Serum surfactant protein-A is a strong predictor of early mortality in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*, 2009, **135**, 1557-1563.
- KING JR T.E., ALBERA C., BRADFORD W.Z., COSTABEL U., HORMEL P., LANCASTER L., NOBLE P.W., SAHN S.A., SZWARCBERG J., THOMEER M., VALEYRE D., DU BOIS R.M. Effect of interferon gamma-1b on survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (INSPIRE): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *The Lancet*, 2009, **374**, 222-228.

- KING T.E., JR., SCHWARZ M.I., BROWN K., TOOZE J.A., COLBY T.V., WALDRON J.A., JR., FLINT A., THURLBECK W., CHERNIACK R.M. Idiopathic pulmonary fibrosis: relationship between histopathologic features and mortality. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001a, **164**, 1025-1032.
- KING T.E., JR., TOOZE J.A., SCHWARZ M.I., BROWN K.R., CHERNIACK R.M. Predicting survival in idiopathic pulmonary fibrosis: scoring system and survival model. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001b, **164**, 1171-1181.
- KING T.E., JR., BEHR J., BROWN K.K., DU BOIS R.M., LANCASTER L., DE ANDRADE J.A., STAHLER G., LECONTE I., ROUX S., RAGHU G. BUILD-1: a randomized placebo-controlled trial of bosentan in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, **177**, 75-81.
- KING T.E., JR., PARDO A., SELMAN M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet*, 2011, **378**, 1949-1961.
- KING T.E., JR., BRADFORD W.Z., CASTRO-BERNARDINI S., FAGAN E.A., GLASPOLE I., GLASSBERG M.K., GORINA E., HOPKINS P.M., KARDATZKE D., LANCASTER L., LEDERER D.J., NATHAN S.D., PEREIRA C.A., SAHN S.A., SUSSMAN R., SWIGRIS J.J., NOBLE P.W. A phase 3 trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*, 2014, **370**, 2083-2092.
- KINNULA V.L., FATTMAN C.L., TAN R.J., OURY T.D. Oxidative stress in pulmonary fibrosis: a possible role for redox modulatory therapy. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005, **172**, 417-422.
- 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. Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors. *Molecular immunology*, 2006, **43**, 1293-1315.
- KITAMURA H., ICHINOSE S., HOSOYA T., ANDO T., IKUSHIMA S., ORITSU M., TAKEMURA T. Inhalation of inorganic particles as a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis--elemental microanalysis of pulmonary lymph nodes obtained at autopsy cases. *Pathol Res Pract*, 2007, **203**, 575-585.
- KLINGBERG F., HINZ B., WHITE E.S. The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis. *J Pathol*, 2013, **229**, 298-309.
- KLOPFLEISCH R., SCHÜTZE M., GRUBER A.D. Downregulation of transforming growth factor [beta] (TGF[beta]) and latent TGF[beta] binding protein (LTBP)-4 expression in late stage canine mammary tumours. *The Veterinary Journal*, 2010, **186**, 379-384.
- KOLI K., WEMPE F., STERNER-KOCK A., KANTOLA A., KOMOR M., HOFMANN W.K., VON MELCHNER H., KESKI-OJA J. Disruption of LTBP-4 function reduces TGF-beta activation and enhances BMP-4 signaling in the lung. *The Journal of cell biology*, 2004, **167**, 123-133.
- KOLI K., HYYTIAINEN M., RYYNANEN M.J., KESKI-OJA J. Sequential deposition of latent TGF-beta binding proteins (LTBPs) during formation of the extracellular matrix in human lung fibroblasts. *Experimental cell research*, 2005, **310**, 370-382.
- KONDOH Y., TANIGUCHI H., KITAICHI M., YOKOI T., JOHKOH T., OISHI T., KIMURA T., NISHIYAMA O., KATO K., DU BOIS R.M. Acute exacerbation of interstitial pneumonia following surgical lung biopsy. *Respir Med*, 2006, **100**, 1753-1759.
- KONDOU H., MUSHIAKE S., ETANI Y., MIYOSHI Y., MICHIGAMI T., OZONO K. A blocking peptide for transforming growth factor-beta1 activation prevents hepatic fibrosis in vivo. *Journal of hepatology*, 2003, **39**, 742-748.
- KONIGSHOFF M., DUMITRASCU R., UDALOV S., AMARIE O.V., REITER R., GRIMMINGER F., SEEGER W., SCHERMULY R.T., EICKELBERG O. Increased expression of

5-hydroxytryptamine<sub>2A/B</sub> receptors in idiopathic pulmonary fibrosis: a rationale for therapeutic intervention. *Thorax*, 2010, **65**, 949-955.

KONISHI K., GIBSON K.F., LINDELL K.O., RICHARDS T.J., ZHANG Y., DHIR R., BISCEGLIA M., GILBERT S., YOUSEM S.A., SONG J.W., KIM D.S., KAMINSKI N. Gene expression profiles of acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, **180**, 167-175.

KORFEI M., RUPPERT C., MAHAVADI P., HENNEKE I., MARKART P., KOCH M., LANG G., FINK L., BOHLE R.M., SEEGER W., WEAVER T.E., GUENTHER A. Epithelial endoplasmic reticulum stress and apoptosis in sporadic idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, **178**, 838-846.

KORFEI M., SCHMITT S., RUPPERT C., HENNEKE I., MARKART P., LOEH B., MAHAVADI P., WYGRECKA M., KLEPETKO W., FINK L., BONNIAUD P., PREISSNER K.T., LOCHNIT G., SCHAEFER L., SEEGER W., GUENTHER A. Comparative proteomic analysis of lung tissue from patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and lung transplant donor lungs. *Journal of proteome research*, 2011, **10**, 2185-2205.

KORFEI M., VON DER BECK D., HENNEKE I., MARKART P., RUPPERT C., MAHAVADI P., GHANIM B., KLEPETKO W., FINK L., MEINERS S., KRAMER O.H., SEEGER W., VANCHERI C., GUENTHER A. Comparative proteome analysis of lung tissue from patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), non-specific interstitial pneumonia (NSIP) and organ donors. *Journal of proteomics*, 2013, **85**, 109-128.

KOYAMA S., SATO E., HANIUDA M., NUMANAMI H., NAGAI S., IZUMI T. Decreased level of vascular endothelial growth factor in bronchoalveolar lavage fluid of normal smokers and patients with pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, **166**, 382-385.

KRAFFT E., LAURILA H.P., PETERS I.R., BUREAU F., PEETERS D., DAY M.J., RAJAMAKI M.M., CLERCX C. Analysis of gene expression in canine idiopathic pulmonary fibrosis. *Vet J*, 2013, **198**, 479-486.

KROPSKI J.A., LAWSON W.E., BLACKWELL T.S. Right place, right time: the evolving role of herpesvirus infection as a "second hit" in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012, **302**, L441-444.

KUHN C., MASON R.J. Immunolocalization of SPARC, tenascin, and thrombospondin in pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*, 1995, **147**, 1759-1769.

KULASEKARAN P., SCAVONE C.A., ROGERS D.S., ARENBERG D.A., THANNICKAL V.J., HOROWITZ J.C. Endothelin-1 and transforming growth factor-beta1 independently induce fibroblast resistance to apoptosis via AKT activation. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2009, **41**, 484-493.

KULKARNI A.B., HUH C.G., BECKER D., GEISER A., LYGHT M., FLANDERS K.C., ROBERTS A.B., SPORN M.B., WARD J.M., KARLSSON S. Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, **90**, 770-774.

KUMAR P., GOLDSTRAW P., YAMADA K., NICHOLSON A.G., WELLS A.U., HANSELL D.M., DUBOIS R.M., LADAS G. Pulmonary fibrosis and lung cancer: risk and benefit analysis of pulmonary resection. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 2003, **125**, 1321-1327.

KUMAR R.K., O'GRADY R., MARONESE S.E., WILSON M.R. Epithelial cell-derived transforming growth factor-beta in bleomycin-induced pulmonary injury. *International journal of experimental pathology*, 1996, **77**, 99-107.

KURTH I., WILLIMANN K., SCHAEERLI P., HUNZIKER T., CLARK-LEWIS I., MOSER B. Monocyte selectivity and tissue localization suggests a role for breast and kidney-expressed chemokine (BRAC) in macrophage development. *J Exp Med*, 2001, **194**, 855-861.

- KUWANO K., KUNITAKE R., KAWASAKI M., NOMOTO Y., HAGIMOTO N., NAKANISHI Y., HARA N. P21Waf1/Cip1/Sdi1 and p53 expression in association with DNA strand breaks in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996, **154**, 477-483.
- KUWANO K., NOMOTO Y., KUNITAKE R., HAGIMOTO N., MATSUBA T., NAKANISHI Y., HARA N. Detection of adenovirus E1A DNA in pulmonary fibrosis using nested polymerase chain reaction. *Eur Respir J*, 1997, **10**, 1445-1449.
- KUWANO K., NAKASHIMA N., INOSHIMA I., HAGIMOTO N., FUJITA M., YOSHIMI M., MAEYAMA T., HAMADA N., WATANABE K., HARA N. Oxidative stress in lung epithelial cells from patients with idiopathic interstitial pneumonias. *Eur Respir J*, 2003, **21**, 232-240.
- LAIHO M., SAKSELA O., ANDREASEN P.A., KESKI-OJA J. Enhanced production and extracellular deposition of the endothelial-type plasminogen activator inhibitor in cultured human lung fibroblasts by transforming growth factor-beta. *The Journal of cell biology*, 1986, **103**, 2403-2410.
- LAMA V.N., FLAHERTY K.R., TOEWS G.B., COLBY T.V., TRAVIS W.D., LONG Q., MURRAY S., KAZEROONI E.A., GROSS B.H., LYNCH J.P., 3RD, MARTINEZ F.J. Prognostic value of desaturation during a 6-minute walk test in idiopathic interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, **168**, 1084-1090.
- LAMBETH J.D. Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy. *Free radical biology & medicine*, 2007, **43**, 332-347.
- LAMMI L., RYHANEN L., LAKARI E., RISTELI J., PAAKKO P., KAHLOS K., LAHDE S., KINNULA V. Type III and type I procollagen markers in fibrosing alveolitis. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999, **159**, 818-823.
- LANCETA J., PROUGH R.A., LIANG R., WANG E. MicroRNA group disorganization in aging. *Exp Gerontol*, 2010, **45**, 269-278.
- LARIOS J.M., BUDHIRAJA R., FANBURG B.L., THANNICKAL V.J. Oxidative protein cross-linking reactions involving L-tyrosine in transforming growth factor-beta1-stimulated fibroblasts. *J Biol Chem*, 2001, **276**, 17437-17441.
- LATSI P., PANTELIDIS P., VASSILAKIS D., SATO H., WELSH K.I., DU BOIS R.M. Analysis of IL-12 p40 subunit gene and IFN-gamma G5644A polymorphisms in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Respir Res*, 2003, **4**, 6.
- LAUNAY J.M., DEL PINO M., CHIRONI G., CALLEBERT J., PEOC'H K., MEGNIEN J.L., MALLETT J., SIMON A., RENDU F. Smoking induces long-lasting effects through a monoamine-oxidase epigenetic regulation. *PLoS One*, 2009, **4**, e7959.
- LAWSON W.E., GRANT S.W., AMBROSINI V., WOMBLE K.E., DAWSON E.P., LANE K.B., MARKIN C., RENZONI E., LYMPANY P., THOMAS A.Q., ROLDAN J., SCOTT T.A., BLACKWELL T.S., PHILLIPS J.A., 3RD, LOYD J.E., DU BOIS R.M. Genetic mutations in surfactant protein C are a rare cause of sporadic cases of IPF. *Thorax*, 2004, **59**, 977-980.
- LAWSON W.E., CROSSNO P.F., POLOSUKHIN V.V., ROLDAN J., CHENG D.S., LANE K.B., BLACKWELL T.R., XU C., MARKIN C., WARE L.B., MILLER G.G., LOYD J.E., BLACKWELL T.S. Endoplasmic reticulum stress in alveolar epithelial cells is prominent in IPF: association with altered surfactant protein processing and herpesvirus infection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, **294**, L1119-1126.
- LAWSON W.E., CHENG D.S., DEGRYSE A.L., TANJORE H., POLOSUKHIN V.V., XU X.C., NEWCOMB D.C., JONES B.R., ROLDAN J., LANE K.B., MORRISEY E.E., BEERS M.F., YULL F.E., BLACKWELL T.S. Endoplasmic reticulum stress enhances fibrotic remodeling in the lungs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, **108**, 10562-10567.
- LEDERER D.J., ARCASOY S.M., BARR R.G., WILT J.S., BAGIELLA E., D'OVIDIO F., SONETT J.R., KAWUT S.M. Racial and ethnic disparities in idiopathic pulmonary fibrosis: A

- UNOS/OPTN database analysis. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 2006, **6**, 2436-2442.
- LEE H.L., RYU J.H., WITTMER M.H., HARTMAN T.E., LYMP J.F., TAZELAAR H.D., LIMPER A.H. Familial idiopathic pulmonary fibrosis: clinical features and outcome. *Chest*, 2005, **127**, 2034-2041.
- LEE J.S., COLLARD H.R., RAGHU G., SWEET M.P., HAYS S.R., CAMPOS G.M., GOLDEN J.A., KING JR T.E. Does Chronic Microaspiration Cause Idiopathic Pulmonary Fibrosis? *The American Journal of Medicine*, 2010, **123**, 304-311.
- LEE J.S., KIM E.J., LYNCH K.L., ELICKER B., RYERSON C.J., KATSUMOTO T.R., SHUM A.K., WOLTERS P.J., CERRI S., RICHELDI L., JONES K.D., KING T.E., JR., COLLARD H.R. Prevalence and clinical significance of circulating autoantibodies in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med*, 2013, **107**, 249-255.
- LEE K.S., PRIMACK S.L., STAPLES C.A., MAYO J.R., ALDRICH J.E., MULLER N.L. Chronic infiltrative lung disease: comparison of diagnostic accuracies of radiography and low- and conventional-dose thin-section CT. *Radiology*, 1994, **191**, 669-673.
- LEOF E.B., PROPER J.A., GOUSTIN A.S., SHIPLEY G.D., DICORLETO P.E., MOSES H.L. Induction of c-sis mRNA and activity similar to platelet-derived growth factor by transforming growth factor beta: a proposed model for indirect mitogenesis involving autocrine activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986, **83**, 2453-2457.
- LEPPARANTA O., SENS C., SALMENKIVI K., KINNULA V.L., KESKI-OJA J., MYLLARNIEMI M., KOLI K. Regulation of TGF-beta storage and activation in the human idiopathic pulmonary fibrosis lung. *Cell and tissue research*, 2012, **348**, 491-503.
- LEQUARRE A.S., ANDERSSON L., ANDRE C., FREDHOLM M., HITTE C., LEEB T., LOHI H., LINDBLAD-TOH K., GEORGES M. LUPA: a European initiative taking advantage of the canine genome architecture for unravelling complex disorders in both human and dogs. *Vet J*, 2011, **189**, 155-159.
- LETTIERI C.J., NATHAN S.D., BARNETT S.D., AHMAD S., SHORR A.F. Prevalence and outcomes of pulmonary arterial hypertension in advanced idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*, 2006, **129**, 746-752.
- LI C.M., KHOSLA J., PAGAN I., HOYLE P., SANNES P.L. TGF-beta1 and fibroblast growth factor-1 modify fibroblast growth factor-2 production in type II cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000, **279**, L1038-1046.
- LI M., KRISHNAVENI M.S., LI C., ZHOU B., XING Y., BANFALVI A., LI A., LOMBARDI V., AKBARI O., BOROK Z., MINOO P. Epithelium-specific deletion of TGF-beta receptor type II protects mice from bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Clin Invest*, 2011a, **121**, 277-287.
- LI X., BOTTS S., MORTON D., KNICKERBOCKER M.J., ADLER R. Oleic acid-associated bronchiolitis obliterans-organizing pneumonia in beagle dogs. *Vet Pathol*, 2006, **43**, 183-185.
- LI X.X., LI N., BAN C.J., ZHU M., XIAO B., DAI H.P. Idiopathic pulmonary fibrosis in relation to gene polymorphisms of transforming growth factor-beta1 and plasminogen activator inhibitor 1. *Chinese medical journal*, 2011b, **124**, 1923-1927.
- LI Y., JIANG D., LIANG J., MELTZER E.B., GRAY A., MIURA R., WOGENSEN L., YAMAGUCHI Y., NOBLE P.W. Severe lung fibrosis requires an invasive fibroblast phenotype regulated by hyaluronan and CD44. *J Exp Med*, 2011c, **208**, 1459-1471.
- LI Z., XIA S., HOU X. [Changes of the activities of ET-1 in the serum and BALF of ILD patients and their clinical significance]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*, 1999, **22**, 411-413.
- LILJA-MAULA L., SYRJA P., LAURILA H.P., SUTINEN E., RONTY M., KOLI K., RAJAMAKI M.M., MYLLARNIEMI M. Comparative Study of Transforming Growth Factor-beta



Signalling and Regulatory Molecules in Human and Canine Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *J Comp Pathol*, 2013a.

LILJA-MAULA L.I., PALVIAINEN M.J., HEIKKILA H.P., RAEKALLIO M.R., RAJAMAKI M.M. Proteomic analysis of bronchoalveolar lavage fluid samples obtained from West Highland White Terriers with idiopathic pulmonary fibrosis, dogs with chronic bronchitis, and healthy dogs. *Am J Vet Res*, 2013b, **74**, 148-154.

LILJA-MAULA L.I.O., LAURILA H.P., SYRJÄ P., LAPPALAINEN A.K., KRAFFT E., CLERCX C., RAJAMÄKI M.M. Long-Term Outcome and Use of 6-Minute Walk Test in West Highland White Terriers with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2014, n/a-n/a.

LIMJUNYAWONG N., MITZNER W., HORTON M.R. A mouse model of chronic idiopathic pulmonary fibrosis. *Physiological reports*, 2014, **2**, e00249.

LIMPER A.H., BROEKELMANN T.J., COLBY T.V., MALIZIA G., MCDONALD J.A. Analysis of local mRNA expression for extracellular matrix proteins and growth factors using in situ hybridization in fibroproliferative lung disorders. *Chest*, 1991, **99**, 55S-56S.

LIMPER A.H., COLBY T.V., SANDERS M.S., ASAKURA S., ROCHE P.C., DEREMEE R.A. Immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta 1 in the nonnecrotizing granulomas of pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 1994, **149**, 197-204.

LINDBLAD-TOH K., WADE C.M., MIKKELSEN T.S., KARLSSON E.K., JAFFE D.B., KAMAL M., CLAMP M., CHANG J.L., KULBOKAS E.J., 3RD, ZODY M.C., MAUCELI E., XIE X., BREEN M., WAYNE R.K., OSTRANDER E.A., PONTING C.P., GALIBERT F., SMITH D.R., DEJONG P.J., KIRKNESS E., ALVAREZ P., BIAGI T., BROCKMAN W., BUTLER J., CHIN C.W., COOK A., CUFF J., DALY M.J., DECAPRIO D., GNERRE S., GRABHERR M., KELLIS M., KLEBER M., BARDELEBEN C., GOODSTADT L., HEGER A., HITTE C., KIM L., KOEPFLI K.P., PARKER H.G., POLLINGER J.P., SEARLE S.M., SUTTER N.B., THOMAS R., WEBBER C., BALDWIN J., ABEBE A., ABOUELLEIL A., AFTUCK L., AIT-ZAHRA M., ALDREDGE T., ALLEN N., AN P., ANDERSON S., ANTOINE C., ARACHCHI H., ASLAM A., AYOTTE L., BACHANTSANG P., BARRY A., BAYUL T., BENAMARA M., BERLIN A., BESSETTE D., BLITSHTEYN B., BLOOM T., BLYE J., BOGUSLAVSKIY L., BONNET C., BOUKHGALTER B., BROWN A., CAHILL P., CALIXTE N., CAMARATA J., CHESHATSANG Y., CHU J., CITROEN M., COLLYMORE A., COOKE P., DAWOE T., DAZA R., DECKTOR K., DEGRAY S., DHARGAY N., DOOLEY K., DORJE P., DORJEE K., DORRIS L., DUFFEY N., DUPES A., EGBIREMOLEN O., ELONG R., FALK J., FARINA A., FARO S., FERGUSON D., FERREIRA P., FISHER S., FITZGERALD M., FOLEY K., FOLEY C., FRANKE A., FRIEDRICH D., GAGE D., GARBER M., GEARIN G., GIANNOUKOS G., GOODE T., GOYETTE A., GRAHAM J., GRANDBOIS E., GYALTSSEN K., HAFEZ N., HAGOPIAN D., HAGOS B., HALL J., HEALY C., HEGARTY R., HONAN T., HORN A., HOUDE N., HUGHES L., HUNNICUTT L., HUSBY M., JESTER B., JONES C., KAMAT A., KANGA B., KELLS C., KHAZANOVICH D., KIEU A.C., KISNER P., KUMAR M., LANCE K., LANDERS T., LARA M., LEE W., LEGER J.P., LENNON N., LEUPER L., LEVINE S., LIU J., LIU X., LOKYITSANG Y., LOKYITSANG T., LUI A., MACDONALD J., MAJOR J., MARABELLA R., MARU K., MATTHEWS C., MCDONOUGH S., MEHTA T., MELDRIM J., MELNIKOV A., MENEUS L., MIHALEV A., MIHOVA T., MILLER K., MITTELMAN R., MLENGA V., MULRAIN L., MUNSON G., NAVIDI A., NAYLOR J., NGUYEN T., NGUYEN N., NGUYEN C., NICOL R., NORBU N., NORBU C., NOVOD N., NYIMA T., OLANDT P., O'NEILL B., O'NEILL K., OSMAN S., OYONO L., PATTI C., PERRIN D., PHUNKHANG P., PIERRE F., PRIEST M., RACHUPKA A., RAGHURAMAN S., RAMEAU R., RAY V., RAYMOND C., REGE F., RISE C., ROGERS J., ROGOV P., SAHALIE J., SETTIPALLI S., SHARPE T., SHEA T., SHEEHAN M., SHERPA N., SHI J., SHIH D., SLOAN J., SMITH C., SPARROW T., STALKER J., STANGE-THOMANN N., STAVROPOULOS S., STONE C., STONE S., SYKES S., TCHUINGA P., TENZING P., TESHAYE S., THOULUTSANG D., THOULUTSANG Y., TOPHAM K., TOPPING I., TSAMLA

- T., VASSILIEV H., VENKATARAMAN V., VO A., WANGCHUK T., WANGDI T., WEIAND M., WILKINSON J., WILSON A., YADAV S., YANG S., YANG X., YOUNG G., YU Q., ZAINOUN J., ZEMBEK L., ZIMMER A., LANDER E.S. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*, 2005, **438**, 803-819.
- LIU D.H., CUI W., CHEN Q., HUANG C.M. Can circulating interleukin-18 differentiate between sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis? *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, 2011, **71**, 593-597.
- LIU F., KILLIAN J.K., YANG M., WALKER R.L., HONG J.A., ZHANG M., DAVIS S., ZHANG Y., HUSSAIN M., XI S., RAO M., MELTZER P.A., SCHRUMP D.S. Epigenomic alterations and gene expression profiles in respiratory epithelia exposed to cigarette smoke condensate. *Oncogene*, 2010a, **29**, 3650-3664.
- LIU F., MIH J.D., SHEA B.S., KHO A.T., SHARIF A.S., TAGER A.M., TSCHUMPERLIN D.J. Feedback amplification of fibrosis through matrix stiffening and COX-2 suppression. *The Journal of cell biology*, 2010b, **190**, 693-706.
- LIU G., FRIGGERI A., YANG Y., MILOSEVIC J., DING Q., THANNICKAL V.J., KAMINSKI N., ABRAHAM E. miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis. *J Exp Med*, 2010c, **207**, 1589-1597.
- LIU J.Y., SIME P.J., WU T., WARSHAMANA G.S., POCIASK D., TSAI S.Y., BRODY A.R. Transforming growth factor-beta(1) overexpression in tumor necrosis factor-alpha receptor knockout mice induces fibroproliferative lung disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001, **25**, 3-7.
- LIU T., DHANASEKARAN S.M., JIN H., HU B., TOMLINS S.A., CHINNAIYAN A.M., PHAN S.H. FIZZ1 stimulation of myofibroblast differentiation. *Am J Pathol*, 2004, **164**, 1315-1326.
- LIU X., HE B., SU L. [The effect of transforming growth factor-beta on collagen expression by human embryonic fibroblasts]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*, 1995, **18**, 287-289, 317-288.
- LJUNGVALL I., HOGLUND K., LILLIEHOOK I., OYAMA M.A., TIDHOLM A., TVEDTEN H., HAGGSTROM J. Serum Serotonin Concentration Is Associated with Severity of Myxomatous Mitral Valve Disease in Dogs. *J Vet Intern Med*, 2013.
- LOBETTI R.G., MILNER R., LANE E. Chronic idiopathic pulmonary fibrosis in five dogs. *J Am Anim Hosp Assoc*, 2001, **37**, 119-127.
- LOK S.S., STEWART J.P., KELLY B.G., HASLETON P.S., EGAN J.J. Epstein-Barr virus and wild p53 in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med*, 2001, **95**, 787-791.
- LOMAS N.J., WATTS K.L., AKRAM K.M., FORSYTH N.R., SPITERI M.A. Idiopathic pulmonary fibrosis: immunohistochemical analysis provides fresh insights into lung tissue remodelling with implications for novel prognostic markers. *International journal of clinical and experimental pathology*, 2012, **5**, 58-71.
- LOOMIS-KING H., FLAHERTY K.R., MOORE B.B. Pathogenesis, current treatments and future directions for idiopathic pulmonary fibrosis. *Current opinion in pharmacology*, 2013, **13**, 377-385.
- LUDLOW A., YEE K.O., LIPMAN R., BRONSON R., WEINREB P., HUANG X., SHEPPARD D., LAWLER J. Characterization of integrin beta6 and thrombospondin-1 double-null mice. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2005, **9**, 421-437.
- LUDWICKA A., OHBA T., TROJANOWSKA M., YAMAKAGE A., STRANGE C., SMITH E.A., LEROY E.C., SUTHERLAND S., SILVER R.M. Elevated levels of platelet derived growth factor and transforming growth factor-beta 1 in bronchoalveolar lavage fluid from patients with scleroderma. *The Journal of rheumatology*, 1995, **22**, 1876-1883.
- LUND L.R., RICCIO A., ANDREASEN P.A., NIELSEN L.S., KRISTENSEN P., LAIHO M., SAKSELA O., BLASI F., DANO K. Transforming growth factor-beta is a strong and fast acting positive regulator of the level of type-1 plasminogen activator inhibitor mRNA in WI-38 human lung fibroblasts. *EMBO J*, 1987, **6**, 1281-1286.

- MACNEE W. Accelerated lung aging: a novel pathogenic mechanism of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Biochem Soc Trans*, 2009, **37**, 819-823.
- MAEDA A., ISHIOKA S., TAOOKA Y., HIYAMA K., YAMAKIDO M. Expression of transforming growth factor-beta1 and tumour necrosis factor-alpha in bronchoalveolar lavage cells in murine pulmonary fibrosis after intraperitoneal administration of bleomycin. *Respirology*, 1999, **4**, 359-363.
- MAEYAMA T., KUWANO K., KAWASAKI M., KUNITAKE R., HAGIMOTO N., MATSUBA T., YOSHIMI M., INOSHIMA I., YOSHIDA K., HARA N. Upregulation of Fas-signalling molecules in lung epithelial cells from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*, 2001, **17**, 180-189.
- MAGETO Y.N., RAGHU G. Genetic predisposition of idiopathic pulmonary fibrosis. *Curr Opin Pulm Med*, 1997, **3**, 336-340.
- MAGI B., BINI L., PERARI M.G., FOSSI A., SANCHEZ J.C., HOCHSTRASSER D., PAESANO S., RAGGIASCHI R., SANTUCCI A., PALLINI V., ROTTOLI P. Bronchoalveolar lavage fluid protein composition in patients with sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis: a two-dimensional electrophoretic study. *Electrophoresis*, 2002, **23**, 3434-3444.
- MAGNAN A., FRACHON I., RAIN B., PEUCHMAUR M., MONTI G., LENOT B., FATTAL M., SIMONNEAU G., GALANAUD P., EMILIE D. Transforming growth factor beta in normal human lung: preferential location in bronchial epithelial cells. *Thorax*, 1994, **49**, 789-792.
- MAGNAN A., MEGE J.L., ESCALLIER J.C., BRISSE J., CAPO C., REYNAUD M., THOMAS P., MERIC B., GARBE L., BADIER M., VIARD L., BONGRAND P., GIUDICELLI R., METRAS D., FUENTES P., VERVLOET D., NOIRCLERC M. Balance between alveolar macrophage IL-6 and TGF-beta in lung-transplant recipients. Marseille and Montreal Lung Transplantation Group. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996, **153**, 1431-1436.
- MAHARAJ S.S., BAROKE E., GAULDIE J., KOLB M.R. Fibrocytes in chronic lung disease--facts and controversies. *Pulm Pharmacol Ther*, 2012, **25**, 263-267.
- MAHER T.M., EVANS I.C., BOTTOMS S.E., MERCER P.F., THORLEY A.J., NICHOLSON A.G., LAURENT G.J., TETLEY T.D., CHAMBERS R.C., MCANULTY R.J. Diminished prostaglandin E2 contributes to the apoptosis paradox in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, **182**, 73-82.
- MAHER T.M. PROFILEing idiopathic pulmonary fibrosis: rethinking biomarker discovery. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society*, 2013, **22**, 148-152.
- MAITRA M., WANG Y., GERARD R.D., MENDELSON C.R., GARCIA C.K. Surfactant protein A2 mutations associated with pulmonary fibrosis lead to protein instability and endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem*, 2010, **285**, 22103-22113.
- MAJACK R.A., MILDBRANDT J., DIXIT V.M. Induction of thrombospondin messenger RNA levels occurs as an immediate primary response to platelet-derived growth factor. *J Biol Chem*, 1987, **262**, 8821-8825.
- MANISCALCO W.M., CAMPBELL M.H. Transforming growth factor-beta induces a chondroitin sulfate/dermatan sulfate proteoglycan in alveolar type II cells. *The American journal of physiology*, 1994, **266**, L672-680.
- MANISCALCO W.M., SINKIN R.A., WATKINS R.H., CAMPBELL M.H. Transforming growth factor-beta 1 modulates type II cell fibronectin and surfactant protein C expression. *The American journal of physiology*, 1994, **267**, L569-577.
- MANNINO D.M., ETZEL R.A., PARRISH R.G. Pulmonary fibrosis deaths in the United States, 1979-1991. An analysis of multiple-cause mortality data. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996, **153**, 1548-1552.

- MARINKOVIC A., LIU F., TSCHUMPERLIN D.J. Matrices of physiologic stiffness potentially inactivate idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013, **48**, 422-430.
- MARKART P., RUPPERT C., WYGRECKA M., SCHMIDT R., KORFEI M., HARBACH H., THERUVATH I., PISON U., SEEGER W., GUENTHER A., WITT H. Surfactant protein C mutations in sporadic forms of idiopathic interstitial pneumonias. *Eur Respir J*, 2007, **29**, 134-137.
- MARMAI C., SUTHERLAND R.E., KIM K.K., DOLGANOV G.M., FANG X., KIM S.S., JIANG S., GOLDEN J.A., HOOPES C.W., MATTHAY M.A., CHAPMAN H.A., WOLTERS P.J. Alveolar epithelial cells express mesenchymal proteins in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2011, **301**, L71-78.
- MARSELLA R., SOUSA C.A., GONZALES A.J., FADOK V.A. Current understanding of the pathophysiologic mechanisms of canine atopic dermatitis. *J Am Vet Med Assoc*, 2012, **241**, 194-207.
- MARSHALL R.P., MCANULTY R.J., LAURENT G.J. Angiotensin II is mitogenic for human lung fibroblasts via activation of the type 1 receptor. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000a, **161**, 1999-2004.
- MARSHALL R.P., PUDDICOMBE A., COOKSON W.O., LAURENT G.J. Adult familial cryptogenic fibrosing alveolitis in the United Kingdom. *Thorax*, 2000b, **55**, 143-146.
- MARTINEZ F.J., SAFRIN S., WEYCKER D., STARKO K.M., BRADFORD W.Z., KING T.E., JR., FLAHERTY K.R., SCHWARTZ D.A., NOBLE P.W., RAGHU G., BROWN K.K. The clinical course of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Ann Intern Med*, 2005, **142**, 963-967.
- MARTINEZ F.J., FLAHERTY K. Pulmonary function testing in idiopathic interstitial pneumonias. *Proc Am Thorac Soc*, 2006, **3**, 315-321.
- MARTINEZ F.J., DE ANDRADE J.A., ANSTROM K.J., KING T.E., JR., RAGHU G. Randomized trial of acetylcysteine in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*, 2014, **370**, 2093-2101.
- MASSAGUE J. TGF-beta signal transduction. *Annual review of biochemistry*, 1998, **67**, 753-791.
- MASSAGUE J., CHEN Y.G. Controlling TGF-beta signaling. *Genes & development*, 2000, **14**, 627-644.
- MASSAGUE J., WOTTON D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J*, 2000, **19**, 1745-1754.
- MASSAOUS J., HATA A. TGF-beta signalling through the Smad pathway. *Trends in cell biology*, 1997, **7**, 187-192.
- MATHIESON J.R., MAYO J.R., STAPLES C.A., MULLER N.L. Chronic diffuse infiltrative lung disease: comparison of diagnostic accuracy of CT and chest radiography. *Radiology*, 1989, **171**, 111-116.
- MCCORMACK F.X., KING T.E., JR., BUCHER B.L., NIELSEN L., MASON R.J. Surfactant protein A predicts survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995, **152**, 751-759.
- MEHRAD B., BURDICK M.D., ZISMAN D.A., KEANE M.P., BELPERIO J.A., STRIETER R.M. Circulating peripheral blood fibrocytes in human fibrotic interstitial lung disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, **353**, 104-108.
- MEJIA M., CARRILLO G., ROJAS-SERRANO J., ESTRADA A., SUAREZ T., ALONSO D., BARRIENTOS E., GAXIOLA M., NAVARRO C., SELMAN M. Idiopathic pulmonary fibrosis and emphysema: decreased survival associated with severe pulmonary arterial hypertension. *Chest*, 2009, **136**, 10-15.

- MELICONI R., ANDREONE P., FASANO L., GALLI S., PACILLI A., MINIERO R., FABBRI M., SOLFOROSI L., BERNARDI M. Incidence of hepatitis C virus infection in Italian patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax*, 1996, **51**, 315-317.
- MERCER P.F., JOHNS R.H., SCOTTON C.J., KRUPICZOJC M.A., KONIGSHOFF M., HOWELL D.C., MCANULTY R.J., DAS A., THORLEY A.J., TETLEY T.D., EICKELBERG O., CHAMBERS R.C. Pulmonary epithelium is a prominent source of proteinase-activated receptor-1-inducible CCL2 in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, **179**, 414-425.
- MERCIER E., BOLOGNIN M., HOFFMANN A.C., TUAL C., DAY M.J., CLERCX C. Influence of age on bronchoscopic findings in healthy beagle dogs. *The Veterinary Journal*, **127**, 225-228.
- MEYER K.C., CARDONI A., XIANG Z.Z. Vascular endothelial growth factor in bronchoalveolar lavage from normal subjects and patients with diffuse parenchymal lung disease. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 2000, **135**, 332-338.
- MILLER L.A., BARNETT N.L., SHEPPARD D., HYDE D.M. Expression of the beta6 integrin subunit is associated with sites of neutrophil influx in lung epithelium. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 2001, **49**, 41-48.
- MINSHALL E.M., LEUNG D.Y., MARTIN R.J., SONG Y.L., CAMERON L., ERNST P., HAMID Q. Eosinophil-associated TGF-beta1 mRNA expression and airways fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1997, **17**, 326-333.
- MIYAKE Y., SASAKI S., YOKOYAMA T., CHIDA K., AZUMA A., SUDA T., KUDOH S., SAKAMOTO N., OKAMOTO K., KOBASHI G., WASHIO M., INABA Y., TANAKA H. Occupational and environmental factors and idiopathic pulmonary fibrosis in Japan. *The Annals of occupational hygiene*, 2005, **49**, 259-265.
- MIYAZONO K., OLOFSSON A., COLOSETTI P., HELDIN C.H. A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1. *EMBO J*, 1991, **10**, 1091-1101.
- MOELLER A., ASK K., WARBURTON D., GAULDIE J., KOLB M. The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, **40**, 362-382.
- MOELLER A., GILPIN S.E., ASK K., COX G., COOK D., GAULDIE J., MARGETTS P.J., FARKAS L., DOBRANOWSKI J., BOYLAN C., O'BYRNE P.M., STRIETER R.M., KOLB M. Circulating fibrocytes are an indicator of poor prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, **179**, 588-594.
- MOLINA-MOLINA M., LARIO S., LUBURICH P., RAMIREZ J., CARRION M.T., XAUBET A. [Quantifying plasma levels of transforming growth factor beta1 in idiopathic pulmonary fibrosis]. *Archivos de bronconeumologia*, 2006, **42**, 380-383.
- MONACCI W.T., MERRILL M.J., OLDFIELD E.H. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in normal rat tissues. *The American journal of physiology*, 1993, **264**, C995-1002.
- MONTUSCHI P., CIABATTONI G., PAREDI P., PANTELIDIS P., DU BOIS R.M., KHARITONOV S.A., BARNES P.J. 8-Isoprostane as a biomarker of oxidative stress in interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, **158**, 1524-1527.
- MOODLEY Y.P., MISSO N.L., SCAFFIDI A.K., FOGEL-PETROVIC M., MCANULTY R.J., LAURENT G.J., THOMPSON P.J., KNIGHT D.A. Inverse effects of interleukin-6 on apoptosis of fibroblasts from pulmonary fibrosis and normal lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003a, **29**, 490-498.
- MOODLEY Y.P., SCAFFIDI A.K., MISSO N.L., KEERTHISINGAM C., MCANULTY R.J., LAURENT G.J., MUTSAERS S.E., THOMPSON P.J., KNIGHT D.A. Fibroblasts isolated from normal lungs and those with idiopathic pulmonary fibrosis differ in interleukin-6/gp130-mediated cell signaling and proliferation. *Am J Pathol*, 2003b, **163**, 345-354.

- MOODLEY Y.P., CATERINA P., SCAFFIDI A.K., MISSO N.L., PAPADIMITRIOU J.M., MCANULTY R.J., LAURENT G.J., THOMPSON P.J., KNIGHT D.A. Comparison of the morphological and biochemical changes in normal human lung fibroblasts and fibroblasts derived from lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis during FasL-induced apoptosis. *J Pathol*, 2004, **202**, 486-495.
- MOORE B.B., HOGABOAM C.M. Murine models of pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, **294**, L152-160.
- MORELLI S., FERRI C., POLETTINI E., BELLINI C., GUALDI G.F., PITTONI V., VALESINI G., SANTUCCI A. Plasma endothelin-1 levels, pulmonary hypertension, and lung fibrosis in patients with systemic sclerosis. *The American Journal of Medicine*, 1995, **99**, 255-260.
- MORRISON C.D., PAPP A.C., HEJMANOWSKI A.Q., ADDIS V.M., PRIOR T.W. Increased D allele frequency of the angiotensin-converting enzyme gene in pulmonary fibrosis. *Hum Pathol*, 2001, **32**, 521-528.
- MOSES H.L., YANG E.Y., PIETENPOL J.A. TGF-beta stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights. *Cell*, 1990, **63**, 245-247.
- MOSHER D.F., MISENHEIMER T.M., STENFLO J., HOGG P.J. Modulation of fibrinolysis by thrombospondin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1992, **667**, 64-69.
- MOUSTAKAS A., HELDIN C.H. Non-Smad TGF-beta signals. *Journal of cell science*, 2005, **118**, 3573-3584.
- MOUSTAKAS A., HELDIN C.H. Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer science*, 2007, **98**, 1512-1520.
- MU D., CAMBIER S., FJELLBIRKELAND L., BARON J.L., MUNGER J.S., KAWAKATSU H., SHEPPARD D., BROADDUS V.C., NISHIMURA S.L. The integrin alpha(v)beta8 mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF-beta1. *The Journal of cell biology*, 2002, **157**, 493-507.
- MUNGER J.S., HARPEL J.G., GLEIZES P.E., MAZZIERI R., NUNES I., RIFKIN D.B. Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation. *Kidney international*, 1997, **51**, 1376-1382.
- MUNGER J.S., HUANG X., KAWAKATSU H., GRIFFITHS M.J., DALTON S.L., WU J., PITTET J.F., KAMINSKI N., GARAT C., MATTHAY M.A., RIFKIN D.B., SHEPPARD D. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell*, 1999, **96**, 319-328.
- MURPHY-ULLRICH J.E., POCZATEK M. Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine & growth factor reviews*, 2000, **11**, 59-69.
- MUSHIRODA T., WATTANAPOKAYAKIT S., TAKAHASHI A., NUKIWA T., KUDOH S., OGIURA T., TANIGUCHI H., KUBO M., KAMATANI N., NAKAMURA Y. A genome-wide association study identifies an association of a common variant in TERT with susceptibility to idiopathic pulmonary fibrosis. *Journal of medical genetics*, 2008, **45**, 654-656.
- MUSK A.W., ZILKO P.J., MANNERS P., KAY P.H., KAMBOH M.I. Genetic studies in familial fibrosing alveolitis. Possible linkage with immunoglobulin allotypes (Gm). *Chest*, 1986, **89**, 206-210.
- MUTSAERS S.E., FOSTER M.L., CHAMBERS R.C., LAURENT G.J., MCANULTY R.J. Increased endothelin-1 and its localization during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1998a, **18**, 611-619.
- MUTSAERS S.E., MARSHALL R.P., GOLDSACK N.R., LAURENT G.J., MCANULTY R.J. Effect of Endothelin Receptor Antagonists (BQ-485, Ro 47-0203) on Collagen Deposition During the Development of Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Rats. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 1998b, **11**, 221-225.

- NADROUS H.F., PELLIKKA P.A., KROWKA M.J., SWANSON K.L., CHAOWALIT N., DECKER P.A., RYU J.H. The impact of pulmonary hypertension on survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*, 2005a, **128**, 616S-617S.
- NADROUS H.F., PELLIKKA P.A., KROWKA M.J., SWANSON K.L., CHAOWALIT N., DECKER P.A., RYU J.H. Pulmonary hypertension in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*, 2005b, **128**, 2393-2399.
- NAKAJIMA Y., MIYAZONO K., KATO M., TAKASE M., YAMAGISHI T., NAKAMURA H. Extracellular fibrillar structure of latent TGF beta binding protein-1: role in TGF beta-dependent endothelial-mesenchymal transformation during endocardial cushion tissue formation in mouse embryonic heart. *The Journal of cell biology*, 1997, **136**, 193-204.
- NAKAO A., AFRAKHTE M., MOREN A., NAKAYAMA T., CHRISTIAN J.L., HEUCHEL R., ITOH S., KAWABATA M., HELDIN N.E., HELDIN C.H., TEN DIJKE P. Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature*, 1997, **389**, 631-635.
- NALYSNYK L., CID-RUZAF A., ROTELLA P., ESSER D. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis: review of the literature. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society*, 2012, **21**, 355-361.
- NATARAJ D., ERNST A., KALLURI R. Idiopathic pulmonary fibrosis is associated with endothelial to mesenchymal transition. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2010, **43**, 129-130.
- NATHAN S.D., REFFETT T., BROWN A.W., FISCHER C.P., SHLOBIN O.A., AHMAD S., WEIR N., SHERIDAN M.J. The red cell distribution width as a prognostic indicator in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*, 2013, **143**, 1692-1698.
- NEUROHR C., NISHIMURA S.L., SHEPPARD D. Activation of transforming growth factor-beta by the integrin alphavbeta8 delays epithelial wound closure. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2006, **35**, 252-259.
- NI W., WATTS S.W. 5-hydroxytryptamine in the cardiovascular system: focus on the serotonin transporter (SERT). *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 2006, **33**, 575-583.
- NICHOLSON A.G., COLBY T.V., DU BOIS R.M., HANSELL D.M., WELLS A.U. The prognostic significance of the histologic pattern of interstitial pneumonia in patients presenting with the clinical entity of cryptogenic fibrosing alveolitis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, **162**, 2213-2217.
- NICHOLSON A.G., FULFORD L.G., COLBY T.V., DU BOIS R.M., HANSELL D.M., WELLS A.U. The relationship between individual histologic features and disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, **166**, 173-177.
- NIEDERMAYER J., GARIN-CHESA P., KRIZ M., HILBERG F., MUELLER E., BAMBERGER U., RETTIG W.J., SCHNAPP A. Expression of the fibroblast activation protein during mouse embryo development. *The International journal of developmental biology*, 2001, **45**, 445-447.
- NIKOLAOU E., TRAKADA G., PRODROMAKIS E., EFREMIDIS G., POULI A., KONIAVITOU A., SPIROPOULOS K. Evaluation of arterial endothelin-1 levels, before and during a sleep study, in patients with bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration*, 2003, **70**, 606-610.
- NISHIMURA K., KITAICHI M., IZUMI T., NAGAI S., KANAOKA M., ITOH H. Usual interstitial pneumonia: histologic correlation with high-resolution CT. *Radiology*, 1992, **182**, 337-342.
- NISHIMURA S.L., SHEPPARD D., PYTELA R. Integrin alpha v beta 8. Interaction with vitronectin and functional divergence of the beta 8 cytoplasmic domain. *J Biol Chem*, 1994, **269**, 28708-28715.
- NISHIMURA S.L. Integrin-mediated transforming growth factor-beta activation, a potential therapeutic target in fibrogenic disorders. *Am J Pathol*, 2009, **175**, 1362-1370.

- NOBLE P.W., BARKAUSKAS C.E., JIANG D. Pulmonary fibrosis: patterns and perpetrators. *J Clin Invest*, 2012, **122**, 2756-2762.
- NODA M., HIGASHIDA H., AOKI S., WADA K. Multiple signal transduction pathways mediated by 5-HT receptors. *Molecular neurobiology*, 2004, **29**, 31-39.
- NORRIS A.J., NAYDAN D.K., WILSON D.W. Interstitial lung disease in West Highland White Terriers. *Vet Pathol*, 2005, **42**, 35-41.
- NORRIS C.R., GRIFFEY S.M., WALSH P. Use of keyhole lung biopsy for diagnosis of interstitial lung diseases in dogs and cats: 13 cases (1998-2001). *J Am Vet Med Assoc*, 2002, **221**, 1453-1459.
- O'DONOGHUE L.E., PTITSYN A.A., KAMSTOCK D.A., SIEBERT J., THOMAS R.S., DUVAL D.L. Expression profiling in canine osteosarcoma: identification of biomarkers and pathways associated with outcome. *BMC Cancer*, 2010, **10**, 506.
- O'NEILL S., DROBATZ K., SATYARAJ E., HESS R. Evaluation of cytokines and hormones in dogs before and after treatment of diabetic ketoacidosis and in uncomplicated diabetes mellitus. *Vet Immunol Immunopathol*, 2012, **148**, 276-283.
- OHAD D.G., LENCHNER I., BDOLAH-ABRAM T., SEGEV G. A loud right-apical systolic murmur is associated with the diagnosis of secondary pulmonary arterial hypertension: Retrospective analysis of data from 201 consecutive client-owned dogs (2006-2007). *Vet J*, 2013, **198**, 690-695.
- OHNISHI H., YOKOYAMA A., KONDO K., HAMADA H., ABE M., NISHIMURA K., HIWADA K., KOHNO N. 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, **165**, 378-381.
- OIKONOMIDI S., KOSTIKAS K., TSILIONI I., TANOU K., GOURGOULIANIS K.I., KIROPOULOS T.S. Matrix metalloproteinases in respiratory diseases: from pathogenesis to potential clinical implications. *Curr Med Chem*, 2009, **16**, 1214-1228.
- OKU H., SHIMIZU T., KAWABATA T., NAGIRA M., HIKITA I., UYAMA A., MATSUSHIMA S., TORII M., ARIMURA A. Antifibrotic action of pirfenidone and prednisolone: different effects on pulmonary cytokines and growth factors in bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis. *European journal of pharmacology*, 2008, **590**, 400-408.
- ORTIZ L.A., LASKY J., HAMILTON R.F., JR., HOLIAN A., HOYLE G.W., BANKS W., PESCHON J.J., BRODY A.R., LUNGARELLA G., FRIEDMAN M. Expression of TNF and the necessity of TNF receptors in bleomycin-induced lung injury in mice. *Exp Lung Res*, 1998, **24**, 721-743.
- OSTRANDER E.A., KRUGLYAK L. Unleashing the canine genome. *Genome research*, 2000, **10**, 1271-1274.
- OVERALL C.M., WRANA J.L., SODEK J. Independent regulation of collagenase, 72-kDa progelatinase, and metalloendoproteinase inhibitor expression in human fibroblasts by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem*, 1989, **264**, 1860-1869.
- OYAMA M.A., CHITTUR S. Genomic expression patterns of cardiac tissues from dogs with dilated cardiomyopathy. *Am J Vet Res*, 2005, **66**, 1140-1155.
- OYAMA M.A., CHITTUR S.V. Genomic expression patterns of mitral valve tissues from dogs with degenerative mitral valve disease. *Am J Vet Res*, 2006, **67**, 1307-1318.
- OYAMA M.A., CHITTUR S.V., REYNOLDS C.A. Decreased triadin and increased calstabin2 expression in Great Danes with dilated cardiomyopathy. *J Vet Intern Med*, 2009, **23**, 1014-1019.
- PANDIT K.V., CORCORAN D., YOUSEF H., YARLAGADDA M., TZOUVELEKIS A., GIBSON K.F., KONISHI K., YOUSEM S.A., SINGH M., HANDLEY D., RICHARDS T.,



- SELMAN M., WATKINS S.C., PARDO A., BEN-YEHUDAH A., BOUROS D., EICKELBERG O., RAY P., BENOS P.V., KAMINSKI N. Inhibition and role of let-7d in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, **182**, 220-229.
- PANDIT K.V., MILOSEVIC J., KAMINSKI N. MicroRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis. *Transl Res*, 2011, **157**, 191-199.
- PANTELIDIS P., FANNING G.C., WELLS A.U., WELSH K.I., DU BOIS R.M. Analysis of tumor necrosis factor-alpha, lymphotoxin-alpha, tumor necrosis factor receptor II, and interleukin-6 polymorphisms in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, **163**, 1432-1436.
- PARDO A., GIBSON K., CISNEROS J., RICHARDS T.J., YANG Y., BECERRIL C., YOUSEM S., HERRERA I., RUIZ V., SELMAN M., KAMINSKI N. Up-Regulation and Profibrotic Role of Osteopontin in Human Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *PLoS Med*, 2005, **2**, e251.
- PARK S.H., SALEH D., GIAID A., MICHEL R.P. Increased endothelin-1 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis and the effect of an endothelin receptor antagonist. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997, **156**, 600-608.
- PATTI M.G., TEDESCO P., GOLDEN J., HAYS S., HOOPEES C., MENEGHETTI A., DAMANI T., WAY L.W. Idiopathic pulmonary fibrosis: how often is it really idiopathic? *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*, 2005, **9**, 1053-1056; discussion 1056-1058.
- PEETERS D., PETERS I.R., FARNIR F., CLERCX C., DAY M.J. Real-time RT-PCR quantification of mRNA encoding cytokines and chemokines in histologically normal canine nasal, bronchial and pulmonary tissue. *Vet Immunol Immunopathol*, 2005, **104**, 195-204.
- PELTON R.W., JOHNSON M.D., PERKETT E.A., GOLD L.I., MOSES H.L. Expression of transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 mRNA and protein in the murine lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1991, **5**, 522-530.
- PERRY J.A., THAMM D.H., EICKHOFF J., AVERY A.C., DOW S.W. Increased monocyte chemotactic protein-1 concentration and monocyte count independently associate with a poor prognosis in dogs with lymphoma. *Veterinary and comparative oncology*, 2011, **9**, 55-64.
- PHAN S.H., GHARAEE-KERMANI M., WOLBER F., RYAN U.S. Stimulation of rat endothelial cell transforming growth factor-beta production by bleomycin. *J Clin Invest*, 1991, **87**, 148-154.
- PHILLIPS S., BARR S., DYKES N., SCRIVANI P., KRAUS M., RISHNIW M., VALENTINE B. Bronchiolitis obliterans with organizing pneumonia in a dog. *J Vet Intern Med*, 2000, **14**, 204-207.
- PIANTEDOSI D., CORTESE L., DI LORIA A., BRIGNOLA G., PRISCO M., PERSECHINO A., CIARAMELLA P. Plasma atrial natriuretic peptide (proANP 31-67), B-type natriuretic peptide (Nt-proBNP) and endothelin-1 (ET-1) concentrations in dogs with chronic degenerative valvular disease (CDVD). *Veterinary Research Communications*, 2009, **33**, 197-200.
- PITTET J.F., GRIFFITHS M.J., GEISER T., KAMINSKI N., DALTON S.L., HUANG X., BROWN L.A., GOTWALS P.J., KOTELIANSKY V.E., MATTHAY M.A., SHEPPARD D. TGF-beta is a critical mediator of acute lung injury. *J Clin Invest*, 2001, **107**, 1537-1544.
- POSTLETHWAITE A.E., KESKI-OJA J., MOSES H.L., KANG A.H. Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor beta. *J Exp Med*, 1987, **165**, 251-256.
- POUSSET F., ISNARD R., LECHAT P., KALOTKA H., CARAYON A., MAISTRE G., ESCOLANO S., THOMAS D., KOMAJDA M. Prognostic value of plasma endothelin-1 in patients with chronic heart failure. *Eur Heart J*, 1997, **18**, 254-258.
- PRASSE A., MULLER-QUERNHEIM J. Non-invasive biomarkers in pulmonary fibrosis. *Respirology*, 2009, **14**, 788-795.

- PRASSE A., PROBST C., BARGAGLI E., ZISSEL G., TOEWS G.B., FLAHERTY K.R., OLSCHIEWSKI M., ROTTOLI P., MULLER-QUERNHEIM J. Serum CC-chemokine ligand 18 concentration predicts outcome in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, **179**, 717-723.
- PRIETO A.L., EDELMAN G.M., CROSSIN K.L. Multiple integrins mediate cell attachment to cytotactin/tenascin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, **90**, 10154-10158.
- PROCKOP D.J., KIVIRIKKO K.I., TUDERMAN L., GUZMAN N.A. The biosynthesis of collagen and its disorders (first of two parts). *N Engl J Med*, 1979, **301**, 13-23.
- PROCOP G.W., KOHN D.J., JOHNSON J.E., LI H.J., LOYD J.E., YEN-LIEBERMAN B., TANG Y.W. BK and JC polyomaviruses are not associated with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Microbiol*, 2005, **43**, 1385-1386.
- PROSEK R., SISSON D.D., OYAMA M.A., BIONDO A.W., SOLTER P.F. Plasma endothelin-1 immunoreactivity in normal dogs and dogs with acquired heart disease. *J Vet Intern Med*, 2004, **18**, 840-844.
- PROSEK R., SISSON D.D., OYAMA M.A., SOLTER P.F. Distinguishing cardiac and noncardiac dyspnea in 48 dogs using plasma atrial natriuretic factor, B-type natriuretic factor, endothelin, and cardiac troponin-I. *J Vet Intern Med*, 2007, **21**, 238-242.
- PSATHAKIS K., MERMIGKIS D., PAPTAEODOROU G., LOUKIDES S., PANAGOUE P., POLYCHRONOPOULOS V., SIAFAKAS N.M., BOUROS D. Exhaled markers of oxidative stress in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur J Clin Invest*, 2006, **36**, 362-367.
- PUTHAWALA K., HADJIANGELIS N., JACOBY S.C., BAYONGAN E., ZHAO Z., YANG Z., DEVITT M.L., HORAN G.S., WEINREB P.H., LUKASHEV M.E., VIOLETTE S.M., GRANT K.S., COLAROSSO C., FORMENTI S.C., MUNGER J.S. Inhibition of integrin alpha(v)beta6, an activator of latent transforming growth factor-beta, prevents radiation-induced lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, **177**, 82-90.
- QUADRELLI S., MOLINARI L., CIALLELLA L., SPINA J.C., SOBRINO E., CHERTCOFF J. Radiological versus histopathological diagnosis of usual interstitial pneumonia in the clinical practice: does it have any survival difference? *Respiration*, 2010, **79**, 32-37.
- RABINOVICH E.I., KAPETANAKI M.G., STEINFELD I., GIBSON K.F., PANDIT K.V., YU G., YAKHINI Z., KAMINSKI N. Global methylation patterns in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One*, 2012a, **7**, e33770.
- RABINOVICH E.I., SELMAN M., KAMINSKI N. Epigenomics of idiopathic pulmonary fibrosis: evaluating the first steps. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012b, **186**, 473-475.
- RAFII R., JUAREZ M.M., ALBERTSON T.E., CHAN A.L. A review of current and novel therapies for idiopathic pulmonary fibrosis. *Journal of thoracic disease*, 2013, **5**, 48-73.
- RAGHU G., STRIKER L.J., HUDSON L.D., STRIKER G.E. Extracellular matrix in normal and fibrotic human lungs. *Am Rev Respir Dis*, 1985, **131**, 281-289.
- RAGHU G. Idiopathic pulmonary fibrosis. A rational clinical approach. *Chest*, 1987, **92**, 148-154.
- RAGHU G., MASTA S., MEYERS D., NARAYANAN A.S. Collagen synthesis by normal and fibrotic human lung fibroblasts and the effect of transforming growth factor-beta. *Am Rev Respir Dis*, 1989, **140**, 95-100.
- RAGHU G., MAGETO Y.N., LOCKHART D., SCHMIDT R.A., WOOD D.E., GODWIN J.D. The accuracy of the clinical diagnosis of new-onset idiopathic pulmonary fibrosis and other interstitial lung disease: A prospective study. *Chest*, 1999, **116**, 1168-1174.
- RAGHU G., BROWN K.K., BRADFORD W.Z., STARKO K., NOBLE P.W., SCHWARTZ D.A., KING T.E., JR. A placebo-controlled trial of interferon gamma-1b in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*, 2004, **350**, 125-133.

- RAGHU G., FREUDENBERGER T.D., YANG S., CURTIS J.R., SPADA C., HAYES J., SILLERY J.K., POPE C.E., 2ND, PELLEGRINI C.A. High prevalence of abnormal acid gastro-oesophageal reflux in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*, 2006a, **27**, 136-142.
- RAGHU G., WEYCKER D., EDELSBERG J., BRADFORD W.Z., OSTER G. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006b, **174**, 810-816.
- RAGHU G. Idiopathic pulmonary fibrosis: guidelines for diagnosis and clinical management have advanced from consensus-based in 2000 to evidence-based in 2011. *Eur Respir J*, 2011, **37**, 743-746.
- 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., LYNCH D.A., RYU J.H., SWIGRIS J.J., WELLS A.U., ANCOCHEA J., BOUROS D., CARVALHO C., COSTABEL U., EBINA M., HANSELL D.M., JOHKOH T., KIM D.S., KING T.E., JR., KONDOH Y., MYERS J., MULLER N.L., NICHOLSON A.G., RICHELDI L., SELMAN M., DUDDEN R.F., GRISS B.S., PROTZKO S.L., SCHUNEMANN H.J. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, **183**, 788-824.
- RAGHU G., ANSTROM K.J., KING T.E., JR., LASKY J.A., MARTINEZ F.J. Prednisone, azathioprine, and N-acetylcysteine for pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*, 2012, **366**, 1968-1977.
- RAMIREZ F., PEREIRA L. The fibrillins. *Int J Biochem Cell Biol*, 1999, **31**, 255-259.
- RAMOS C., MONTANO M., GARCIA-ALVAREZ J., RUIZ V., UHAL B.D., SELMAN M., PARDO A. Fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis and normal lungs differ in growth rate, apoptosis, and tissue inhibitor of metalloproteinases expression. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001, **24**, 591-598.
- RAUGI G.J., OLERUD J.E., GOWN A.M. Thrombospondin in early human wound tissue. *The Journal of investigative dermatology*, 1987, **89**, 551-554.
- RAYA A.I., FERNANDEZ-DE MARCO M., NUNEZ A., AFONSO J.C., CORTADE L.E., CARRASCO L. Endogenous lipid pneumonia in a dog. *J Comp Pathol*, 2006, **135**, 153-155.
- REED M.J., IRUELA-ARISPE L., O'BRIEN E.R., TRUONG T., LABELL T., BORNSTEIN P., SAGE E.H. Expression of thrombospondins by endothelial cells. Injury is correlated with TSP-1. *Am J Pathol*, 1995, **147**, 1068-1080.
- REICHENBERGER F., SCHAUER J., KELLNER K., SACK U., STIEHL P., WINKLER J. Different Expression of Endothelin in the Bronchoalveolar Lavage in Patients with Pulmonary Diseases. *Lung*, 2001, **179**, 163-174.
- REINERO C.R., COHN L.A. Interstitial Lung Diseases. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 2007, **37**, 937-947.
- RENZONI E., LYMPANY P., SESTINI P., PANTELIDIS P., WELLS A., BLACK C., WELSH K., BUNN C., KNIGHT C., FOLEY P., DU BOIS R.M. Distribution of novel polymorphisms of the interleukin-8 and CXC receptor 1 and 2 genes in systemic sclerosis and cryptogenic fibrosing alveolitis. *Arthritis Rheum*, 2000, **43**, 1633-1640.
- RENZONI E.A., ABRAHAM D.J., HOWAT S., SHI-WEN X., SESTINI P., BOU-GHARIOS G., WELLS A.U., VEERARAGHAVAN S., NICHOLSON A.G., DENTON C.P., LEASK A., PEARSON J.D., BLACK C.M., WELSH K.I., DU BOIS R.M. Gene expression profiling reveals novel TGFbeta targets in adult lung fibroblasts. *Respir Res*, 2004, **5**, 24.
- RIBEIRO S.M., POCZATEK M., SCHULTZ-CHERRY S., VILLAIN M., MURPHY-ULLRICH J.E. The activation sequence of thrombospondin-1 interacts with the latency-associated peptide to regulate activation of latent transforming growth factor-beta. *J Biol Chem*, 1999, **274**, 13586-13593.

RICHARDS T.J., KAMINSKI N., BARIBAUD F., FLAVIN S., BRODMERKEL C., HOROWITZ D., LI K., CHOI J., VUGA L.J., LINDELL K.O., KLESEN M., ZHANG Y., GIBSON K.F. Peripheral blood proteins predict mortality in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012, **185**, 67-76.

RICHELDI L., DU BOIS R.M., RAGHU G., AZUMA A., BROWN K.K., COSTABEL U., COTTIN V., FLAHERTY K.R., HANSELL D.M., INOUE Y., KIM D.S., KOLB M., NICHOLSON A.G., NOBLE P.W., SELMAN M., TANIGUCHI H., BRUN M., LE MAULF F., GIRARD M., STOWASSER S., SCHLENKER-HERCEG R., DISSE B., COLLARD H.R. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*, 2014, **370**, 2071-2082.

RIFKIN D.B. Latent transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteins: orchestrators of TGF-beta availability. *J Biol Chem*, 2005, **280**, 7409-7412.

RIHA R.L., YANG I.A., RABNOTT G.C., TUNNICLIFFE A.M., FONG K.M., ZIMMERMAN P.V. Cytokine gene polymorphisms in idiopathic pulmonary fibrosis. *Internal medicine journal*, 2004, **34**, 126-129.

RING C.J., CHO K.W. Specificity in transforming growth factor-beta signaling pathways. *American journal of human genetics*, 1999, **64**, 691-697.

ROBERTS A.B., SPORN M.B., ASSOIAN R.K., SMITH J.M., ROCHE N.S., WAKEFIELD L.M., HEINE U.I., LIOTTA L.A., FALANGA V., KEHRL J.H., ET AL. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986, **83**, 4167-4171.

ROMAN J., BROWN K.K., OLSON A., CORCORAN B.M., WILLIAMS K.J. An official American Thoracic Society workshop report: comparative pathobiology of fibrosing lung disorders in humans and domestic animals. *Annals of the American Thoracic Society*, 2013, **10**, S224-229.

ROOK A.H., KEHRL J.H., WAKEFIELD L.M., ROBERTS A.B., SPORN M.B., BURLINGTON D.B., LANE H.C., FAUCI A.S. Effects of transforming growth factor beta on the functions of natural killer cells: depressed cytolytic activity and blunting of interferon responsiveness. *J Immunol*, 1986, **136**, 3916-3920.

ROSAS I.O., REN P., AVILA N.A., CHOW C.K., FRANKS T.J., TRAVIS W.D., MCCOY J.P., JR., MAY R.M., WU H.P., NGUYEN D.M., ARCOS-BURGOS M., MACDONALD S.D., GOCHUICO B.R. Early interstitial lung disease in familial pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, **176**, 698-705.

ROSAS I.O., RICHARDS T.J., KONISHI K., ZHANG Y., GIBSON K., LOKSHIN A.E., LINDELL K.O., CISNEROS J., MACDONALD S.D., PARDO A., SCIURBA F., DAUBER J., SELMAN M., GOCHUICO B.R., KAMINSKI N. MMP1 and MMP7 as potential peripheral blood biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS Med*, 2008, **5**, e93.

ROSENKILDE M.M., SCHWARTZ T.W. The chemokine system -- a major regulator of angiogenesis in health and disease. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 2004, **112**, 481-495.

ROSS B., D'ORLEANS-JUSTE P., GIAID A. Potential role of endothelin-1 in pulmonary fibrosis: from the bench to the clinic. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2010, **42**, 16-20.

ROTTOLI P., MAGI B., PERARI M.G., LIBERATORI S., NIKIFORAKIS N., BARGAGLI E., CIANTI R., BINI L., PALLINI V. Cytokine profile and proteome analysis in bronchoalveolar lavage of patients with sarcoidosis, pulmonary fibrosis associated with systemic sclerosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Proteomics*, 2005, **5**, 1423-1430.

ROTTOLI P., BARGAGLI E., LANDI C., MAGI B. Proteomic analysis in interstitial lung diseases: a review. *Curr Opin Pulm Med*, 2009, **15**, 470-478.

- RUBANYI G.M., POLOKOFF M.A. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev*, 1994, **46**, 325-415.
- RUDD R.M., PRESCOTT R.J., CHALMERS J.C., JOHNSTON I.D. British Thoracic Society Study on cryptogenic fibrosing alveolitis: Response to treatment and survival. *Thorax*, 2007, **62**, 62-66.
- RUDELL R.G., OAKLEY F., HUSSAIN Z., YEUNG I., BRYAN-LLUKA L.J., RAMM G.A., MANN D.A. A role for serotonin (5-HT) in hepatic stellate cell function and liver fibrosis. *Am J Pathol*, 2006, **169**, 861-876.
- RYAN R.M., MINEO-KUHN M.M., KRAMER C.M., FINKELSTEIN J.N. Growth factors alter neonatal type II alveolar epithelial cell proliferation. *The American journal of physiology*, 1994, **266**, L17-22.
- RYERSON C.J., HARTMAN T., ELICKER B.M., LEY B., LEE J.S., ABBRITTI M., JONES K.D., KING T.E., JR., RYU J., COLLARD H.R. Clinical features and outcomes in combined pulmonary fibrosis and emphysema in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*, 2013, **144**, 234-240.
- SAGE H., FARIN F.M., STRIKER G.E., FISHER A.B. Granular pneumocytes in primary culture secrete several major components of the extracellular matrix. *Biochemistry*, 1983, **22**, 2148-2155.
- SAHARINEN J., KESKI-OJA J. Specific sequence motif of 8-Cys repeats of TGF-beta binding proteins, LTBP1s, creates a hydrophobic interaction surface for binding of small latent TGF-beta. *Molecular biology of the cell*, 2000, **11**, 2691-2704.
- SAKAMOTO K., TANIGUCHI H., KONDOH Y., WAKAI K., KIMURA T., KATAOKA K., HASHIMOTO N., NISHIYAMA O., HASEGAWA Y. Acute exacerbation of IPF following diagnostic bronchoalveolar lavage procedures. *Respir Med*, 2012, **106**, 436-442.
- SALEH D., FURUKAWA K., TSAO M.S., MAGHAZACHI A., CORRIN B., YANAGISAWA M., BARNES P.J., GIAID A. Elevated expression of endothelin-1 and endothelin-converting enzyme-1 in idiopathic pulmonary fibrosis: possible involvement of proinflammatory cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1997, **16**, 187-193.
- SALEZ F., GOSSET P., COPIN M.C., LAMBLIN DEGROS C., TONNEL A.B., WALLAERT B. Transforming growth factor-beta1 in sarcoidosis. *Eur Respir J*, 1998, **12**, 913-919.
- SANDERS Y.Y., AMBALAVANAN N., HALLORAN B., ZHANG X., LIU H., CROSSMAN D.K., BRAY M., ZHANG K., THANNICKAL V.J., HAGOOD J.S. Altered DNA methylation profile in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012, **186**, 525-535.
- SANFORD L.P., ORMSBY I., GITTENBERGER-DE GROOT A.C., SARIOLA H., FRIEDMAN R., BOIVIN G.P., CARDELL E.L., DOETSCHMAN T. TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development (Cambridge, England)*, 1997, **124**, 2659-2670.
- SANTANA A., SAXENA B., NOBLE N.A., GOLD L.I., MARSHALL B.C. Increased expression of transforming growth factor beta isoforms (beta 1, beta 2, beta 3) in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1995, **13**, 34-44.
- SATOH H., KURISHIMA K., ISHIKAWA H., OHTSUKA M. Increased levels of KL-6 and subsequent mortality in patients with interstitial lung diseases. *Journal of internal medicine*, 2006, **260**, 429-434.
- SAUTER W., ROSENBERGER A., BECKMANN L., KROPP S., MITTELSTRASS K., TIMOFEEVA M., WOLKE G., STEINWACHS A., SCHEINER D., MEESE E., SYBRECHT G., KRONENBERG F., DIENEMANN H., CHANG-CLAUDE J., ILLIG T., WICHMANN H.E., BICKEBOLLER H., RISCH A. Matrix metalloproteinase 1 (MMP1) is associated with early-onset lung cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 2008, **17**, 1127-1135.

- SCHELLENBERG S., GRENACHER B., KAUFMANN K., REUSCH C.E., GLAUS T.M. Analytical validation of commercial immunoassays for the measurement of cardiovascular peptides in the dog. *The Veterinary Journal*, 2008, **178**, 85-90.
- SCHOBER K.E., BAADE H. Doppler echocardiographic prediction of pulmonary hypertension in West Highland white terriers with chronic pulmonary disease. *J Vet Intern Med*, 2006, **20**, 912-920.
- SCHULTZ-CHERRY S., MURPHY-ULLRICH J.E. Thrombospondin causes activation of latent transforming growth factor-beta secreted by endothelial cells by a novel mechanism. *The Journal of cell biology*, 1993, **122**, 923-932.
- SCHULTZ-CHERRY S., LAWLER J., MURPHY-ULLRICH J.E. The type 1 repeats of thrombospondin 1 activate latent transforming growth factor-beta. *J Biol Chem*, 1994a, **269**, 26783-26788.
- SCHULTZ-CHERRY S., RIBEIRO S., GENTRY L., MURPHY-ULLRICH J.E. Thrombospondin binds and activates the small and large forms of latent transforming growth factor-beta in a chemically defined system. *J Biol Chem*, 1994b, **269**, 26775-26782.
- SCHULTZ-CHERRY S., CHEN H., MOSHER D.F., MISENHEIMER T.M., KRUTZSCH H.C., ROBERTS D.D., MURPHY-ULLRICH J.E. Regulation of transforming growth factor-beta activation by discrete sequences of thrombospondin 1. *J Biol Chem*, 1995, **270**, 7304-7310.
- SCHUSTER N.H. Pulmonary asbestosis in a dog. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 1931, **34**, 751-757.
- SCHWARTZ D.A., VAN FOSSEN D.S., DAVIS C.S., HELMERS R.A., DAYTON C.S., BURMEISTER L.F., HUNNINGHAKE G.W. Determinants of progression in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 1994, **149**, 444-449.
- SCOTT J., JOHNSTON I., BRITTON J. What causes cryptogenic fibrosing alveolitis? A case-control study of environmental exposure to dust. *BMJ (Clinical research ed.)*, 1990, **301**, 1015-1017.
- SCOTTON C.J., CHAMBERS R.C. Molecular targets in pulmonary fibrosis: the myofibroblast in focus. *Chest*, 2007, **132**, 1311-1321.
- SCOTTON C.J., KRUPICZOJC M.A., KONIGSHOFF M., MERCER P.F., LEE Y.C., KAMINSKI N., MORSER J., POST J.M., MAHER T.M., NICHOLSON A.G., MOFFATT J.D., LAURENT G.J., DERIAN C.K., EICKELBERG O., CHAMBERS R.C. Increased local expression of coagulation factor X contributes to the fibrotic response in human and murine lung injury. *J Clin Invest*, 2009, **119**, 2550-2563.
- SCRUGGS S.M., DISATIAN S., ORTON E.C. Serotonin transmembrane transporter is down-regulated in late-stage canine degenerative mitral valve disease. *Journal of veterinary cardiology : the official journal of the European Society of Veterinary Cardiology*, 2010, **12**, 163-169.
- SEIBOLD M.A., WISE A.L., SPEER M.C., STEELE M.P., BROWN K.K., LOYD J.E., FINGERLIN T.E., ZHANG W., GUDMUNDSSON G., GROSHONG S.D., EVANS C.M., GARANTZIOTIS S., ADLER K.B., DICKEY B.F., DU BOIS R.M., YANG I.V., HERRON A., KERVITSKY D., TALBERT J.L., MARKIN C., PARK J., CREWS A.L., SLIFER S.H., AUERBACH S., ROY M.G., LIN J., HENNESSY C.E., SCHWARZ M.I., SCHWARTZ D.A. A common MUC5B promoter polymorphism and pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*, 2011, **364**, 1503-1512.
- SEKIYA T., MIYAMASU M., IMANISHI M., YAMADA H., NAKAJIMA T., YAMAGUCHI M., FUJISAWA T., PAWANKAR R., SANO Y., OHTA K., ISHII A., MORITA Y., YAMAMOTO K., MATSUSHIMA K., YOSHIE O., HIRAI K. Inducible expression of a Th2-type CC chemokine thymus- and activation-regulated chemokine by human bronchial epithelial cells. *J Immunol*, 2000, **165**, 2205-2213.

- SELMAN M., KING T.E., PARDO A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med*, 2001, **134**, 136-151.
- SELMAN M., LIN H.M., MONTANO M., JENKINS A.L., ESTRADA A., LIN Z., WANG G., DIANGELO S.L., GUO X., UMSTEAD T.M., LANG C.M., PARDO A., PHELPS D.S., FLOROS J. Surfactant protein A and B genetic variants predispose to idiopathic pulmonary fibrosis. *Human genetics*, 2003, **113**, 542-550.
- SELMAN M., PARDO A. Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis: from innocent targets to serial killers. *Proc Am Thorac Soc*, 2006, **3**, 364-372.
- SELMAN M., CARRILLO G., ESTRADA A., MEJIA M., BECERRIL C., CISNEROS J., GAXIOLA M., PEREZ-PADILLA R., NAVARRO C., RICHARDS T., DAUBER J., KING T.E., JR., PARDO A., KAMINSKI N. Accelerated variant of idiopathic pulmonary fibrosis: clinical behavior and gene expression pattern. *PLoS One*, 2007, **2**, e482.
- SELMAN M., PARDO A., KAMINSKI N. Idiopathic pulmonary fibrosis: aberrant recapitulation of developmental programs? *PLoS Med*, 2008, **5**, e62.
- SELMAN M., ROJAS M., MORA A.L., PARDO A. Aging and interstitial lung diseases: unraveling an old forgotten player in the pathogenesis of lung fibrosis. *Seminars in respiratory and critical care medicine*, 2010, **31**, 607-617.
- SENOO T., HATTORI N., TANIMOTO T., FURONAKA M., ISHIKAWA N., FUJITAKA K., HARUTA Y., MURAI H., YOKOYAMA A., KOHNO N. Suppression of plasminogen activator inhibitor-1 by RNA interference attenuates pulmonary fibrosis. *Thorax*, 2010, **65**, 334-340.
- SHAH M., FOREMAN D.M., FERGUSON M.W. Neutralising antibody to TGF-beta 1,2 reduces cutaneous scarring in adult rodents. *Journal of cell science*, 1994, **107 ( Pt 5)**, 1137-1157.
- SHEPPARD D., COHEN D.S., WANG A., BUSK M. Transforming growth factor beta differentially regulates expression of integrin subunits in guinea pig airway epithelial cells. *J Biol Chem*, 1992, **267**, 17409-17414.
- SHEPPARD D. Transforming growth factor beta: a central modulator of pulmonary and airway inflammation and fibrosis. *Proc Am Thorac Soc*, 2006, **3**, 413-417.
- SHETTY S., KUMAR A., JOHNSON A.R., PUEBLITZ S., HOLIDAY D., RAGHU G., IDELL S. Differential expression of the urokinase receptor in fibroblasts from normal and fibrotic human lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1996, **15**, 78-87.
- SHIN K.M., LEE K.S., CHUNG M.P., HAN J., BAE Y.A., KIM T.S., CHUNG M.J. Prognostic determinants among clinical, thin-section CT, and histopathologic findings for fibrotic idiopathic interstitial pneumonias: tertiary hospital study. *Radiology*, 2008, **249**, 328-337.
- SHINODA H., TASAKA S., FUJISHIMA S., YAMASAWA W., MIYAMOTO K., NAKANO Y., KAMATA H., HASEGAWA N., ISHIZAKA A. Elevated CC chemokine level in bronchoalveolar lavage fluid is predictive of a poor outcome of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiration*, 2009, **78**, 285-292.
- SHULL M.M., ORMSBY I., KIER A.B., PAWLOWSKI S., DIEBOLD R.J., YIN M., ALLEN R., SIDMAN C., PROETZEL G., CALVIN D., ET AL. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*, 1992, **359**, 693-699.
- SIAHANIDOU T., NICOLAIDOU P., DOUDOUNAKIS S., GEORGOULI E., PAPANIMITRIOU A., KARPATIOS T. Plasma immunoreactive endothelin levels in children with cystic fibrosis. *Acta Paediatr*, 2000, **89**, 915-920.
- SIEGEL P.M., MASSAGUE J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nature reviews. Cancer*, 2003, **3**, 807-821.

- SILVERSTEIN D., GREENE C., GREGORY C., LUCAS S., QUANDT J. Pulmonary alveolar proteinosis in a dog. *J Vet Intern Med*, 2000, **14**, 546-551.
- SIME P.J., XING Z., GRAHAM F.L., CSAKY K.G., GAULDIE J. Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor-beta1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. *J Clin Invest*, 1997, **100**, 768-776.
- SIME P.J., MARR R.A., GAULDIE D., XING Z., HEWLETT B.R., GRAHAM F.L., GAULDIE J. Transfer of tumor necrosis factor-alpha to rat lung induces severe pulmonary inflammation and patchy interstitial fibrogenesis with induction of transforming growth factor-beta1 and myofibroblasts. *Am J Pathol*, 1998, **153**, 825-832.
- SOCIETY A.T. American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, **161**, 646-664.
- SOCIETY A.T.S.E.R. American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, **165**, 277-304.
- SON J.Y., KIM S.Y., CHO S.H., SHIM H.S., JUNG J.Y., KIM E.Y., LIM J.E., PARK B.H., KANG Y.A., KIM Y.S., KIM S.K., CHANG J., PARK M.S. TGF-beta1 T869C Polymorphism May Affect Susceptibility to Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Disease Severity. *Lung*, 2013, **191**, 199-205.
- SONG J.W., SONG J.K., KIM D.S. Echocardiography and brain natriuretic peptide as prognostic indicators in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med*, 2009, **103**, 180-186.
- SONG J.W., HONG S.B., LIM C.M., KOH Y., KIM D.S. Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: incidence, risk factors and outcome. *Eur Respir J*, 2011, **37**, 356-363.
- SONG J.W., DO K.H., JANG S.J., COLBY T.V., HAN S., KIM D.S. Blood biomarkers MMP-7 and SP-A: predictors of outcome in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*, 2013, **143**, 1422-1429.
- SOUZA C.A., MULLER N.L., LEE K.S., JOHKOH T., MITSUHIRO H., CHONG S. Idiopathic interstitial pneumonias: prevalence of mediastinal lymph node enlargement in 206 patients. *AJR. American journal of roentgenology*, 2006, **186**, 995-999.
- STARNES T., RASILA K.K., ROBERTSON M.J., BRAHMI Z., DAHL R., CHRISTOPHERSON K., HROMAS R. The chemokine CXCL14 (BRACK) stimulates activated NK cell migration: implications for the downregulation of CXCL14 in malignancy. *Experimental hematology*, 2006, **34**, 1101-1105.
- STEELE M.P., SPEER M.C., LOYD J.E., BROWN K.K., HERRON A., SLIFER S.H., BURCH L.H., WAHIDI M.M., PHILLIPS J.A., 3RD, SPORN T.A., MCADAMS H.P., SCHWARZ M.I., SCHWARTZ D.A. Clinical and pathologic features of familial interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005, **172**, 1146-1152.
- STERNER-KOCK A., THOREY I.S., KOLI K., WEMPE F., OTTE J., BANGSOW T., KUHLMEIER K., KIRCHNER T., JIN S., KESKI-OJA J., VON MELCHNER H. Disruption of the gene encoding the latent transforming growth factor-beta binding protein 4 (LTBP-4) causes abnormal lung development, cardiomyopathy, and colorectal cancer. *Genes & development*, 2002, **16**, 2264-2273.
- STEWART D.J., LEVY R.D., CERNACEK P., LANGLEBEN D. Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Ann Intern Med*, 1991, **114**, 464-469.
- STEWART J.P., EGAN J.J., ROSS A.J., KELLY B.G., LOK S.S., HASLETON P.S., WOODCOCK A.A. The detection of Epstein-Barr virus DNA in lung tissue from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999, **159**, 1336-1341.



- STRIETER R.M., GOMPERTS B.N., KEANE M.P. The role of CXC chemokines in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest*, 2007, **117**, 549-556.
- STRIETER R.M. What differentiates normal lung repair and fibrosis? Inflammation, resolution of repair, and fibrosis. *Proc Am Thorac Soc*, 2008, **5**, 305-310.
- STRIETER R.M., KEELEY E.C., HUGHES M.A., BURDICK M.D., MEHRAD B. The role of circulating mesenchymal progenitor cells (fibrocytes) in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Journal of leukocyte biology*, 2009, **86**, 1111-1118.
- STUDER S.M., KAMINSKI N. Towards systems biology of human pulmonary fibrosis. *Proc Am Thorac Soc*, 2007, **4**, 85-91.
- SUGA M., IYONAGA K., ICHIYASU H., SAITA N., YAMASAKI H., ANDO M. Clinical significance of MCP-1 levels in BALF and serum in patients with interstitial lung diseases. *Eur Respir J*, 1999, **14**, 376-382.
- SUMIKAWA H., JOHKOH T., COLBY T.V., ICHIKADO K., SUGA M., TANIGUCHI H., KONDOH Y., OGURA T., ARAKAWA H., FUJIMOTO K., INOUE A., MIHARA N., HONDA O., TOMIYAMA N., NAKAMURA H., MULLER N.L. Computed tomography findings in pathological usual interstitial pneumonia: relationship to survival. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, **177**, 433-439.
- SWENSEN S.J., AUGHENBAUGH G.L., MYERS J.L. Diffuse lung disease: diagnostic accuracy of CT in patients undergoing surgical biopsy of the lung. *Radiology*, 1997, **205**, 229-234.
- SWIGRIS J.J., KUSCHNER W.G., KELSEY J.L., GOULD M.K. Idiopathic pulmonary fibrosis: challenges and opportunities for the clinician and investigator. *Chest*, 2005, **127**, 275-283.
- SWIGRIS J.J., BROWN K.K. The role of endothelin-1 in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *BioDrugs*, 2010, **24**, 49-54.
- SWIMMER R.A., ROZANSKI E.A. Evaluation of the 6-minute walk test in pet dogs. *J Vet Intern Med*, 2011, **25**, 405-406.
- SYRJA P., HEIKKILA H.P., LILJA-MAULA L., KRAFFT E., CLERCX C., DAY M.J., RONTY M., MYLLARNIEMI M., RAJAMAKI M.M. The histopathology of idiopathic pulmonary fibrosis in West Highland white terriers shares features of both non-specific interstitial pneumonia and usual interstitial pneumonia in man. *J Comp Pathol*, 2013, **149**, 303-313.
- TAKAHASHI H., FUJISHIMA T., KOBAYASHI H., MURAKAMI S., KUROKAWA K., SHIBUYA Y., SHIRATORI M., KUROKI Y., ABE S. 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, **162**, 1109-1114.
- TAMBURINI B.A., PHANG T.L., FOSMIRE S.P., SCOTT M.C., TRAPP S.C., DUCKETT M.M., ROBINSON S.R., SLANSKY J.E., SHARKEY L.C., CUTTER G.R., WOJCIESZYN J.W., BELLGRAU D., GEMMILL R.M., HUNTER L.E., MODIANO J.F. Gene expression profiling identifies inflammation and angiogenesis as distinguishing features of canine hemangiosarcoma. *BMC Cancer*, 2010, **10**, 619.
- TANG Y.W., JOHNSON J.E., BROWNING P.J., CRUZ-GERVIS R.A., DAVIS A., GRAHAM B.S., BRIGHAM K.L., OATES J.A., JR., LOYD J.E., STECENKO A.A. Herpesvirus DNA is consistently detected in lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Microbiol*, 2003, **41**, 2633-2640.
- TANIGUCHI H., EBINA M., KONDOH Y., OGURA T., AZUMA A., SUGA M., TAGUCHI Y., TAKAHASHI H., NAKATA K., SATO A., TAKEUCHI M., RAGHU G., KUDOH S., NUKIWA T. Pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*, 2010, **35**, 821-829.
- TANJORE H., CHENG D.S., DEGRYSE A.L., ZOZ D.F., ABDOLRASULNIA R., LAWSON W.E., BLACKWELL T.S. Alveolar epithelial cells undergo epithelial-to-mesenchymal transition in response to endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem*, 2011, **286**, 30972-30980.

- TASKAR V.S., COULTAS D.B. Is idiopathic pulmonary fibrosis an environmental disease? *Proc Am Thorac Soc*, 2006, **3**, 293-298.
- TATLER A.L., JENKINS G. TGF-beta activation and lung fibrosis. *Proc Am Thorac Soc*, 2012, **9**, 130-136.
- TEDER P., NOBLE P.W. A cytokine reborn? Endothelin-1 in pulmonary inflammation and fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2000, **23**, 7-10.
- TERASHITA K., KATO S., SATA M., INOUE S., NAKAMURA H., TOMOIKE H. Increased endothelin-1 levels of BAL fluid in patients with pulmonary sarcoidosis. *Respirology*, 2006, **11**, 145-151.
- TESSIER-VETZEL D., TISSIER R., CHETBOUL V., CARLOS C., NICOLLE A., BENBARON D., DANDRIEUX J., THOULON F., CARAYON A., POUCHELON J.L. Diagnostic and prognostic value of endothelin-1 plasma concentrations in dogs with heart and respiratory disorders. *Vet Rec*, 2006, **158**, 783-788.
- THANNICKAL V.J., HOROWITZ J.C. Evolving concepts of apoptosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Am Thorac Soc*, 2006, **3**, 350-356.
- THOMAS A.Q., LANE K., PHILLIPS J., 3RD, PRINCE M., MARKIN C., SPEER M., SCHWARTZ D.A., GADDIPATI R., MARNEY A., JOHNSON J., ROBERTS R., HAINES J., STAHLMAN M., LOYD J.E. Heterozygosity for a surfactant protein C gene mutation associated with usual interstitial pneumonitis and cellular nonspecific interstitial pneumonitis in one kindred. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, **165**, 1322-1328.
- TOBIN R.W., POPE C.E., 2ND, PELLEGRINI C.A., EMOND M.J., SILLERY J., RAGHU G. Increased prevalence of gastroesophageal reflux in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, **158**, 1804-1808.
- TODOROVIC V., RIFKIN D.B. LTBP3, more than just an escort service. *Journal of cellular biochemistry*, 2012, **113**, 410-418.
- TOTANI Y., SAITOH Y., SAKAKIBARA H., MIYAMORI I., ISHIZAKI T. [Clinical characterization of interleukin-8 in patients with idiopathic pulmonary fibrosis]. *Nihon Kokyuki Gakkai zasshi = the journal of the Japanese Respiratory Society*, 2002, **40**, 869-874.
- TOUSSAINT O., MEDRANO E.E., VON ZGLINICKI T. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol*, 2000, **35**, 927-945.
- TRAVIS M.A., REIZIS B., MELTON A.C., MASTELLER E., TANG Q., PROCTOR J.M., WANG Y., BERNSTEIN X., HUANG X., REICHARDT L.F., BLUESTONE J.A., SHEPPARD D. Loss of integrin alpha(v)beta8 on dendritic cells causes autoimmunity and colitis in mice. *Nature*, 2007, **449**, 361-365.
- TSAKIRI K.D., CRONKHITE J.T., KUAN P.J., XING C., RAGHU G., WEISSLER J.C., ROSENBLATT R.L., SHAY J.W., GARCIA C.K. Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, **104**, 7552-7557.
- TSOUTSOU P.G., GOURGOULIANIS K.I., PETINAKI E., GERMENIS A., TSOUTSOU A.G., MPAKA M., EFREMIDOU S., MOLYVDAS P.A. Cytokine levels in the sera of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med*, 2006, **100**, 938-945.
- TSUKAMOTO K., HAYAKAWA H., SATO A., CHIDA K., NAKAMURA H., MIURA K. Involvement of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 in disease progression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax*, 2000, **55**, 958-961.
- TZORTZAKI E.G., ANTONIOU K.M., ZERVOU M.I., LAMBIRI I., KOUTSOPOULOS A., TZANAKIS N., PLATAKI M., MALTEZAKIS G., BOUROS D., SIAFAKAS N.M. Effects of antifibrotic agents on TGF-beta1, CTGF and IFN-gamma expression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med*, 2007, **101**, 1821-1829.

- UEDA T., OHTA K., SUZUKI N., YAMAGUCHI M., HIRAI K., HORIUCHI T., WATANABE J., MIYAMOTO T., ITO K. Idiopathic pulmonary fibrosis and high prevalence of serum antibodies to hepatitis C virus. *Am Rev Respir Dis*, 1992, **146**, 266-268.
- UGUCCIONI M., PULSATELLI L., GRIGOLO B., FACCHINI A., FASANO L., CINTI C., FABBRI M., GASBARRINI G., MELICONI R. Endothelin-1 in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Pathol*, 1995, **48**, 330-334.
- UHAL B.D., KIM J.K., LI X., MOLINA-MOLINA M. Angiotensin-TGF-beta 1 crosstalk in human idiopathic pulmonary fibrosis: autocrine mechanisms in myofibroblasts and macrophages. *Curr Pharm Des*, 2007, **13**, 1247-1256.
- UNSOLD C., HYYTIAINEN M., BRUCKNER-TUDERMAN L., KESKI-OJA J. Latent TGF-beta binding protein LTBP-1 contains three potential extracellular matrix interacting domains. *Journal of cell science*, 2001, **114**, 187-197.
- UTZ J.P., RYU J.H., DOUGLAS W.W., HARTMAN T.E., TAZELAAR H.D., MYERS J.L., ALLEN M.S., SCHROEDER D.R. High short-term mortality following lung biopsy for usual interstitial pneumonia. *Eur Respir J*, 2001, **17**, 175-179.
- VAGO H., SOOS P., ZIMA E., GELLER L., KELTAI K., ROKA A., KEKESI V., JUHASZ-NAGY A., MERKELY B. Changes of endothelin-1 and big endothelin-1 levels and action potential duration during myocardial ischemia-reperfusion in dogs with and without ventricular fibrillation. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2004, **44 Suppl 1**, S376-379.
- VAN DEN BLINK B., WIJSENBEK M.S., HOOGSTEDEN H.C. Serum biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *Pulm Pharmacol Ther*, 2010, **23**, 515-520.
- VAN WIJK D.F., VAN LEUVEN S.I., SANDHU M.S., TANCK M.W., HUTTEN B.A., WAREHAM N.J., KASTELEIN J.J., STROES E.S., KHAW K.T., BOEKHOLDT S.M. Chemokine ligand 2 genetic variants, serum monocyte chemoattractant protein-1 levels, and the risk of coronary artery disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2010, **30**, 1460-1466.
- VANHEE D., GOSSET P., WALLAERT B., VOISIN C., TONNEL A.B. Mechanisms of fibrosis in coal workers' pneumoconiosis. Increased production of platelet-derived growth factor, insulin-like growth factor type I, and transforming growth factor beta and relationship to disease severity. *Am J Respir Crit Care Med*, 1994, **150**, 1049-1055.
- VANHERBERGHEN M., BUREAU F., PETERS I.R., DAY M.J., CLERCX C., PEETERS D. Analysis of gene expression in canine sino-nasal aspergillosis and idiopathic lymphoplasmacytic rhinitis: a transcriptomic analysis. *Veterinary microbiology*, 2012, **157**, 143-151.
- VASAKOVA M., STRIZ I., SLAVCEV A., JANDOVA S., KOLESAR L., SULC J. Th1/Th2 cytokine gene polymorphisms in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Tissue antigens*, 2006, **67**, 229-232.
- VASAKOVA M., STRIZ I., SLAVCEV A., JANDOVA S., DUTKA J., TERL M., KOLESAR L., SULC J. Correlation of IL-1alpha and IL-4 gene polymorphisms and clinical parameters in idiopathic pulmonary fibrosis. *Scand J Immunol*, 2007, **65**, 265-270.
- VASAKOVA M., STERCLOVA M., KOLESAR L., SLAVCEV A., POHUNEK P., SULC J., SKIBOVA J., STRIZ I. Bronchoalveolar lavage fluid cellular characteristics, functional parameters and cytokine and chemokine levels in interstitial lung diseases. *Scand J Immunol*, 2009, **69**, 268-274.
- VEHVILAINEN P., KOLI K., MYLLARNIEMI M., LINDHOLM P., SOINI Y., SALMENKIVI K., KINNULA V.L., KESKI-OJA J. Latent TGF-beta binding proteins (LTBPs) 1 and 3 differentially regulate transforming growth factor-beta activity in malignant mesothelioma. *Hum Pathol*, 2011, **42**, 269-278.

- VIGNOLA A.M., CHANEZ P., CHIAPPARA G., MERENDINO A., PACE E., RIZZO A., LA ROCCA A.M., BELLIA V., BONSIGNORE G., BOUSQUET J. Transforming growth factor-beta expression in mucosal biopsies in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997, **156**, 591-599.
- VIJ R., NOTH I. Peripheral blood biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *Transl Res*, 2012, **159**, 218-227.
- VUGA L.J., BEN-YEHUDAH A., KOVKAROVA-NAUMOVSKI E., ORISS T., GIBSON K.F., FEGHALI-BOSTWICK C., KAMINSKI N. WNT5A is a regulator of fibroblast proliferation and resistance to apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2009, **41**, 583-589.
- VUORINEN K., MYLLARNIEMI M., LAMMI L., PIIRILA P., RYTI P., SALMENKIVI K., KINNULA V.L. Elevated matrilysin levels in bronchoalveolar lavage fluid do not distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from other interstitial lung diseases. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 2007, **115**, 969-975.
- WAGHRAY M., CUI Z., HOROWITZ J.C., SUBRAMANIAN I.M., MARTINEZ F.J., TOEWS G.B., THANNICKAL V.J. Hydrogen peroxide is a diffusible paracrine signal for the induction of epithelial cell death by activated myofibroblasts. *FASEB J*, 2005, **19**, 854-856.
- WANG A., YOKOSAKI Y., FERRANDO R., BALMES J., SHEPPARD D. Differential regulation of airway epithelial integrins by growth factors. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1996, **15**, 664-672.
- WANG E. Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved. *Cancer research*, 1995, **55**, 2284-2292.
- WANG Q., WANG Y., HYDE D.M., GOTWALS P.J., KOTELIANSKY V.E., RYAN S.T., GIRI S.N. Reduction of bleomycin induced lung fibrosis by transforming growth factor beta soluble receptor in hamsters. *Thorax*, 1999a, **54**, 805-812.
- WANG R., RAMOS C., JOSHI I., ZAGARIYA A., PARDO A., SELMAN M., UHAL B.D. Human lung myofibroblast-derived inducers of alveolar epithelial apoptosis identified as angiotensin peptides. *The American journal of physiology*, 1999b, **277**, L1158-1164.
- WANG X.M., ZHANG Y., KIM H.P., ZHOU Z., FEGHALI-BOSTWICK C.A., LIU F., IFEDIGBO E., XU X., OURY T.D., KAMINSKI N., CHOI A.M.K. Caveolin-1: a critical regulator of lung fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 2006, **203**, 2895-2906.
- 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. Genetic defects in surfactant protein A2 are associated with pulmonary fibrosis and lung cancer. *American journal of human genetics*, 2009, **84**, 52-59.
- WANGO O.A., SHAW R.J., DISS T.C., FARRELL P.J., DU BOIS R.M., NICHOLSON A.G. Cryptogenic fibrosing alveolitis: lack of association with Epstein-Barr virus infection. *Thorax*, 1997, **52**, 888-891.
- WATTIEZ R., HERMANS C., CRUYT C., BERNARD A., FALMAGNE P. Human bronchoalveolar lavage fluid protein two-dimensional database: study of interstitial lung diseases. *Electrophoresis*, 2000, **21**, 2703-2712.
- WEBB J.A., ARMSTRONG J. Chronic idiopathic pulmonary fibrosis in a West Highland white terrier. *Can Vet J*, 2002, **43**, 703-705.
- WEIKKOLAINEN K., KESKI-OJA J., KOLI K. Expression of latent TGF-beta binding protein LTBP-1 is hormonally regulated in normal and transformed human lung fibroblasts. *Growth factors (Chur, Switzerland)*, 2003, **21**, 51-60.
- WEINACKER A., CHEN A., AGREZ M., CONE R.I., NISHIMURA S., WAYNER E., PYTELA R., SHEPPARD D. Role of the integrin alpha v beta 6 in cell attachment to fibronectin.

- Heterologous expression of intact and secreted forms of the receptor. *J Biol Chem*, 1994, **269**, 6940-6948.
- WEINACKER A., FERRANDO R., ELLIOTT M., HOGG J., BALMES J., SHEPPARD D. Distribution of integrins alpha v beta 6 and alpha 9 beta 1 and their known ligands, fibronectin and tenascin, in human airways. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1995, **12**, 547-556.
- WELLS A.U., DESAI S.R., RUBENS M.B., GOH N.S., CRAMER D., NICHOLSON A.G., COLBY T.V., DU BOIS R.M., HANSELL D.M. Idiopathic pulmonary fibrosis: a composite physiologic index derived from disease extent observed by computed tomography. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, **167**, 962-969.
- WELLS A.U. Managing diagnostic procedures in idiopathic pulmonary fibrosis. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society*, 2013a, **22**, 158-162.
- WELLS A.U. The revised ATS/ERS/JRS/ALAT diagnostic criteria for idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)--practical implications. *Respir Res*, 2013b, **14 Suppl 1**, S2.
- WHITTINGTON H.A., FREEBURN R.W., GODINHO S.I., EGAN J., HAIDER Y., MILLAR A.B. Analysis of an IL-10 polymorphism in idiopathic pulmonary fibrosis. *Genes and immunity*, 2003, **4**, 258-264.
- WHYTE M., HUBBARD R., MELICONI R., WHIDBORNE M., EATON V., BINGLE C., TIMMS J., DUFF G., FACCHINI A., PACILLI A., FABBRI M., HALL I., BRITTON J., JOHNSTON I., DI GIOVINE F. Increased risk of fibrosing alveolitis associated with interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, **162**, 755-758.
- WHYTE M.K. Genetic factors in idiopathic pulmonary fibrosis: transforming growth factor-beta implicated at last. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, **168**, 410-411.
- WILBORN J., CROFFORD L.J., BURDICK M.D., KUNKEL S.L., STRIETER R.M., PETERS-GOLDEN M. Cultured lung fibroblasts isolated from patients with idiopathic pulmonary fibrosis have a diminished capacity to synthesize prostaglandin E2 and to express cyclooxygenase-2. *J Clin Invest*, 1995, **95**, 1861-1868.
- WILLIS B.C., LIEBLER J.M., LUBY-PHELPS K., NICHOLSON A.G., CRANDALL E.D., DU BOIS R.M., BOROK Z. Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*, 2005, **166**, 1321-1332.
- WILLIS B.C., BOROK Z. TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007, **293**, L525-534.
- WILSON M.S., WYNN T.A. Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation. *Mucosal Immunol*, 2009, **2**, 103-121.
- WIPFF P.J., RIFKIN D.B., MEISTER J.J., HINZ B. Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta1 from the extracellular matrix. *The Journal of cell biology*, 2007, **179**, 1311-1323.
- WIPFF P.J., HINZ B. Integrins and the activation of latent transforming growth factor beta1 - an intimate relationship. *European journal of cell biology*, 2008, **87**, 601-615.
- WOLTERS P.J., COLLARD H.R., JONES K.D. Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Annu Rev Pathol*, 2013.
- XAUBET A., MARIN-ARGUEDAS A., LARIO S., ANCOCHEA J., MORELL F., RUIZ-MANZANO J., RODRIGUEZ-BECERRA E., RODRIGUEZ-ARIAS J.M., INIGO P., SANZ S., CAMPISTOL J.M., MULLOL J., PICADO C. Transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms are associated with disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, **168**, 431-435.

- XIA H., DIEBOLD D., NHO R., PERLMAN D., KLEIDON J., KAHM J., AVDULOV S., PETERSON M., NERVA J., BITTERMAN P., HENKE C. Pathological integrin signaling enhances proliferation of primary lung fibroblasts from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Exp Med*, 2008, **205**, 1659-1672.
- XU M.Y., PORTE J., KNOX A.J., WEINREB P.H., MAHER T.M., VIOLETTE S.M., MCANULTY R.J., SHEPPARD D., JENKINS G. Lysophosphatidic acid induces alphavbeta6 integrin-mediated TGF-beta activation via the LPA2 receptor and the small G protein G alpha(q). *Am J Pathol*, 2009, **174**, 1264-1279.
- XU Y.D., HUA J., MUI A., O'CONNOR R., GROTENDORST G., KHALIL N. Release of biologically active TGF-beta1 by alveolar epithelial cells results in pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003, **285**, L527-539.
- YAMAGUCHI S., KUBO K., FUJIMOTO K., HONDA T., SEKIGUCHI M., SODEYAMA T. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in patients with chronic hepatitis C before and after treatment with interferon alpha. *Thorax*, 1997, **52**, 33-37.
- YAMAKAMI T., TAGUCHI O., GABAZZA E.C., YOSHIDA M., KOBAYASHI T., KOBAYASHI H., YASUI H., IBATA H., ADACHI Y. Arterial endothelin-1 level in pulmonary emphysema and interstitial lung disease. Relation with pulmonary hypertension during exercise. *Eur Respir J*, 1997, **10**, 2055-2060.
- YANG I.V., BURCH L.H., STEELE M.P., SAVOV J.D., HOLLINGSWORTH J.W., MCELVANIA-TEKIPPE E., BERMAN K.G., SPEER M.C., SPORN T.A., BROWN K.K., SCHWARZ M.I., SCHWARTZ D.A. Gene expression profiling of familial and sporadic interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007a, **175**, 45-54.
- YANG I.V., SCHWARTZ D.A. Epigenetic control of gene expression in the lung. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, **183**, 1295-1301.
- YANG I.V. Epigenomics of idiopathic pulmonary fibrosis. *Epigenomics*, 2012, **4**, 195-203.
- YANG I.V., LUNA L.G., COTTER J., TALBERT J., LEACH S.M., KIDD R., TURNER J., KUMMER N., KERVITSKY D., BROWN K.K., BOON K., SCHWARZ M.I., SCHWARTZ D.A., STEELE M.P. The peripheral blood transcriptome identifies the presence and extent of disease in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One*, 2012, **7**, e37708.
- YANG Z., MU Z., DABOVIC B., JURUKOVSKI V., YU D., SUNG J., XIONG X., MUNGER J.S. Absence of integrin-mediated TGFbeta1 activation in vivo recapitulates the phenotype of TGFbeta1-null mice. *The Journal of cell biology*, 2007b, **176**, 787-793.
- YAO H.W., XIE Q.M., CHEN J.Q., DENG Y.M., TANG H.F. TGF-beta1 induces alveolar epithelial to mesenchymal transition in vitro. *Life Sci*, 2004, **76**, 29-37.
- YI E.S., SALGADO M., WILLIAMS S., KIM S.J., MASLIAH E., YIN S., ULICH T.R. Keratinocyte growth factor decreases pulmonary edema, transforming growth factor-beta and platelet-derived growth factor-BB expression, and alveolar type II cell loss in bleomycin-induced lung injury. *Inflammation*, 1998, **22**, 315-325.
- YOKOYAMA A., KOHNO N., HAMADA H., SAKATANI M., UEDA E., KONDO K., HIRASAWA Y., HIWADA K. Circulating KL-6 predicts the outcome of rapidly progressive idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, **158**, 1680-1684.
- YONEMARU M., KASUGA I., KUSUMOTO H., KUNISAWA A., KIYOKAWA H., KUWABARA S., ICHINOSE Y., TOYAMA K. Elevation of antibodies to cytomegalovirus and other herpes viruses in pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*, 1997, **10**, 2040-2045.
- YONG S.J., ADLAKHA A., LIMPER A.H. Circulating transforming growth factor-beta(1): a potential marker of disease activity during idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*, 2001, **120**, 68S-70S.

- YOSHINAGA K., OBATA H., JURUKOVSKI V., MAZZIERI R., CHEN Y., ZILBERBERG L., HUSO D., MELAMED J., PRIJATELJ P., TODOROVIC V., DABOVIC B., RIFKIN D.B. Perturbation of transforming growth factor (TGF)-beta1 association with latent TGF-beta binding protein yields inflammation and tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, **105**, 18758-18763.
- YU H., KONIGSHOFF M., JAYACHANDRAN A., HANDLEY D., SEEGER W., KAMINSKI N., EICKELBERG O. Transgelin is a direct target of TGF-beta/Smad3-dependent epithelial cell migration in lung fibrosis. *FASEB J*, 2008, **22**, 1778-1789.
- YUKSEL M., OZYURTKAN M.O., BOSTANCI K., AHISKALI R., KODALLI N. Acute exacerbation of interstitial fibrosis after pulmonary resection. *The Annals of thoracic surgery*, 2006, **82**, 336-338.
- ZAMO A., POLETTI V., REGHELLIN D., MONTAGNA L., PEDRON S., PICCOLI P., CHILOSI M. HHV-8 and EBV are not commonly found in idiopathic pulmonary fibrosis. *Sarcoidosis, vasculitis, and diffuse lung diseases : official journal of WASOG / World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders*, 2005, **22**, 123-128.
- ZEGDI R., AZORIN J., TREMBLAY B., DESTABLE M.D., LAJOS P.S., VALEYRE D. Videothoroscopic lung biopsy in diffuse infiltrative lung diseases: a 5-year surgical experience. *The Annals of thoracic surgery*, 1998, **66**, 1170-1173.
- ZHANG H.Y., PHAN S.H. Inhibition of myofibroblast apoptosis by transforming growth factor beta(1). *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999, **21**, 658-665.
- ZHANG K., FLANDERS K.C., PHAN S.H. Cellular localization of transforming growth factor-beta expression in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*, 1995, **147**, 352-361.
- ZHANG Y., NOTH I., GARCIA J.G., KAMINSKI N. A variant in the promoter of MUC5B and idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*, 2011, **364**, 1576-1577.
- ZHANG Y.E. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res*, 2009, **19**, 128-139.
- ZHAO J., SHI W., WANG Y.L., CHEN H., BRINGAS P., JR., DATTO M.B., FREDERICK J.P., WANG X.F., WARBURTON D. Smad3 deficiency attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002, **282**, L585-593.
- ZHENG J., CHEN Y., PAT B., DELL'ITALIA L.A., TILLSON M., DILLON A.R., POWELL P.C., SHI K., SHAH N., DENNEY T., HUSAIN A., DELL'ITALIA L.J. Microarray identifies extensive downregulation of noncollagen extracellular matrix and profibrotic growth factor genes in chronic isolated mitral regurgitation in the dog. *Circulation*, 2009, **119**, 2086-2095.
- ZHONG Q., ZHOU B., ANN D.K., MINOO P., LIU Y., BANFALVI A., KRISHNAVENI M.S., DUBOURD M., DEMAIO L., WILLIS B.C., KIM K.J., DUBOIS R.M., CRANDALL E.D., BEERS M.F., BOROK Z. Role of endoplasmic reticulum stress in epithelial-mesenchymal transition of alveolar epithelial cells: effects of misfolded surfactant protein. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011, **45**, 498-509.
- ZHOU B., LIU Y., KAHN M., ANN D.K., HAN A., WANG H., NGUYEN C., FLODBY P., ZHONG Q., KRISHNAVENI M.S., LIEBLER J.M., MINOO P., CRANDALL E.D., BOROK Z. Interactions between beta-catenin and transforming growth factor-beta signaling pathways mediate epithelial-mesenchymal transition and are dependent on the transcriptional co-activator cAMP-response element-binding protein (CREB)-binding protein (CBP). *J Biol Chem*, 2012, **287**, 7026-7038.
- ZHOU Y., KOLI K., HAGOOD J.S., MIAO M., MAVALLI M., RIFKIN D.B., MURPHY-ULLRICH J.E. Latent transforming growth factor-beta-binding protein-4 regulates transforming growth factor-beta1 bioavailability for activation by fibrogenic lung fibroblasts in response to bleomycin. *Am J Pathol*, 2009, **174**, 21-33.

ZIEGENHAGEN M.W., ZABEL P., ZISSEL G., SCHLAAK M., MULLER-QUERNHEIM J. Serum level of interleukin 8 is elevated in idiopathic pulmonary fibrosis and indicates disease activity. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, **157**, 762-768.

ZISMAN D.A., KAWUT S.M., LEDERER D.J., BELPERIO J.A., LYNCH J.P., 3RD, SCHWARZ M.I., TAYEK J.A., REUBEN D.B., KARLAMANGLA A.S. Serum albumin concentration and waiting list mortality in idiopathic interstitial pneumonia. *Chest*, 2009, **135**, 929-935.

ZORZETTO M., FERRAROTTI I., CAMPO I., TRISOLINI R., POLETTI V., SCABINI R., CERUTI M., MAZZOLA P., CRIPPA E., OTTAVIANI S., AGOSTINI C., SEMENZATO G., POZZI E., LUISETTI M. NOD2/CARD15 gene polymorphisms in idiopathic pulmonary fibrosis. *Sarcoidosis, vasculitis, and diffuse lung diseases : official journal of WASOG / World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders*, 2005, **22**, 180-185.

ZUO F., KAMINSKI N., EUGUI E., ALLARD J., YAKHINI Z., BEN-DOR A., LOLLINI L., MORRIS D., KIM Y., DELUSTRO B., SHEPPARD D., PARDO A., SELMAN M., HELLER R.A. Gene expression analysis reveals matrilysin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, **99**, 6292-6297.