



Génétique des fibroses pulmonaires familiales de l'adulte

Raphaël Borie

► **To cite this version:**

Raphaël Borie. Génétique des fibroses pulmonaires familiales de l'adulte. Génétique humaine. Université Sorbonne Paris Cité, 2017. Français. NNT : 2017USPCC208 . tel-02115539

HAL Id: tel-02115539

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02115539>

Submitted on 30 Apr 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse pour obtenir le grade de Docteur
Sciences de la Vie et de la Santé
Paris Diderot Bio Sorbonne Paris Cité
Discipline : Génétique

Présentée et soutenue publiquement
par Raphael Borie
LE 21 JUIN 2017

Génétique des fibroses pulmonaires
familiales de l'adulte

Jury :

Président du jury	Prof Martine Reynaud Gaubert
Directeur de thèse	Prof Bruno Crestani
Rapporteur	Prof Serge Amselem
Rapporteur	Prof David Montani
Examineur	Prof Dominique Israel Biet
Examineur	Prof Martine Reynaud Gaubert
	Dr Caroline Kannengiesser

Remerciements

Il me faudrait plus de place que ne peut en contenir cette page pour remercier toutes les personnes qui m'ont aidé à soutenir cette thèse.

Je voudrais remercier Bruno et Caroline d'avoir accepté de diriger ce travail à bien des points de vue inhabituel.

Je remercie Martine, Dominique, Serge et David qui me font l'honneur de composer mon jury.

Merci à tous ceux qui ont de près ou de loin ont aidé à ce que ces travaux avancent, les patients et leur famille, les infirmières qui ont les ont prélevés, mes collègues du service qui m'ont remplacé, ou mes confrères ayant accepté que leur patients, leurs données et leurs idées aient infusé dans ces travaux.

Merci évidemment aux équipes des laboratoires de génétique de l'hôpital Bichat de l'équipe INSERM 1152 en particulier Christelle, Marion, Arnaud, Madeleine, Aurélie, mais aussi Patrick Revy, Arturo Londono, Clément Gauvain et Isabelle Callebaut pour leur aide et leurs explications précieuses.

Merci à ma famille de m'avoir soutenu dans ce projet,

à Constance, Arthur et Margot ...

TABLE DES MATIERES

RESUME	8
ABREVIATIONS UTILISEES DANS LE DOCUMENT	11
Introduction	14
1. Génétique des fibroses pulmonaires	16
<i>1.1 Caractéristiques générales des fibroses pulmonaires familiales</i>	<i>16</i>
A Epidémiologie et facteurs de risques	18
B Aspects radiographiques et anatomopathologiques	18
C Profil évolutif	19
D Atteintes pulmonaires sans retentissement clinique des apparentés : « atteintes asymptomatiques »	20
<i>1.2 Formes monogéniques : Variants génétiques rares associés aux fibroses pulmonaires</i>	<i>20</i>
A Le complexe télomérase	20
A.1 Physiologie	20
A.2 Longueur des télomères	24
A.3 Mutations du complexe télomérase, de la dyskératose congénitale aux fibroses pulmonaires familiales	25
A.4 Héritéité complexe et phénocopies	28
A.5 Mesure de la taille des télomères	29
A.6 Mesure de l'activité télomérase	32
A.7 Phénotype des patients porteurs de mutations du complexe télomérase	34
B Le complexe du surfactant	38
B.1 Physiologie	38
B.2 Formes monogéniques liées aux mutations de la voie du surfactant	40
C Autres syndromes avec fibroses pulmonaires associés à des maladies monogéniques	44
C.1 Syndrome d'Hermansky Pudlak	45
C.2 Neurofibromatose	45
C.3 Autres syndromes	46
D <i>ELMOD2</i>	47

1.3 Formes polygéniques : Polymorphismes génétiques et épigénétiques associés aux fibroses pulmonaires	47
A Le paradoxe <i>MUC5B</i>	47
B <i>TOLLIP</i> et autres polymorphismes	49
1.4 Epigénétique	50
1.5 Modèles animaux de fibrose pulmonaire	52
OBJECTIF	54
2 Matériels et Méthodes	54
2.1 Patients	54
A Aspects éthiques et réglementaires	54
B Critères d'inclusion	54
C Phénotype recueilli	55
2.2 Etudes génétiques	56
A Classification des variants	56
B Séquençage de <i>TERT</i> , <i>TERC</i> , et <i>RTEL1</i>	59
C Séquençage d'exome	59
2.3 Mesure de la longueur de télomères	60
2.4 Expression de <i>RTEL1</i>	60
A QPCR <i>RTEL1</i>	60
B Immunohistochimie <i>RTEL1</i>	61
2.5 Modélisation en 3 dimensions	61
3 RESULTATS	62
3.1 Mise en évidence de l'implication de <i>RTEL1</i> dans les fibroses pulmonaires familiales	62
3.2 Prévalence et phénotype des mutations <i>TERT</i> et <i>TERC</i> de la cohorte française (2008-2014)	64
3.3 Phénotype des patients porteurs de mutations hétérozygotes de <i>RTEL1</i> (non publiée)	66
A Méthodes	66
B Résultats	66
Patients	66
Génétique Et Modélisation En 3 Dimensions	73
Expression pulmonaire de <i>RTEL1</i>	74
	5

3.4 Collaborations	76
A Extension des résultats dans une cohorte de pneumopathie interstitielle diffuse non idiopathique	76
B Collaboration avec le laboratoire de génétique de l'hôpital Trousseau	76
4 DISCUSSION DES RESULTATS	78
4.1 Phénotype des PID associées aux mutations du complexe télomérase	78
A Mutation <i>TERT</i> et <i>TERC</i>	78
B Mutations de <i>RTEL1</i>	80
4.2 Implication des mutations de <i>RTEL1</i>	84
4.3 Auto-immunité et mutations du complexe télomérase	87
4.4 Perspectives	89
A Mise en évidence de nouveau gene	89
B Impact thérapeutique	91
4.5 Limites des travaux réalisés	92
A Absence de confirmation fonctionnelle des mutations	92
B Analyse monogénique	96
C Analyse des phénotypes	97
5 CONCLUSION	98
URL des sites web utilisés	99
Annexe 1 Demande d'exploration moléculaire des formes génétiques de fibroses pulmonaires	120
Annexe 2 prédispositions génétiques aux PID associées à la PR	122

Table des Figures

Figure 1 Physiopathologie simplifiée des fibroses pulmonaires	14
Figure 2 Mutations identifiées dans les fibroses pulmonaires familiales en 2015	16
Figure 3 Classification simplifiée des PID	17
Figure 4 Télomères..	21
Figure 5 Principaux complexes impliqués dans la synthèse des télomères	22
Figure 6 Modèle proposé de l'activité de RTEL1.....	23
Figure 7 Représentation des mutations considérées comme pathogènes sur <i>TERT</i>	28
Figure 8 Représentation des mutations considérées comme pathogènes sur <i>TERC</i>	28
Figure 10 Taille des télomères en fonction de l'âge	30
Figure 11 Corrélation entre la taille des télomères mesurée en QPCR et en FlowFISH	32
Figure 11 Arbre généalogique de 5 nouvelles mutations hétérozygotes de <i>RTEL1</i>	68
Figure 13 Taux de Plaquettes et VGM au diagnostic de la PID chez les patients porteurs d'une mutation de <i>RTEL1</i> , de <i>TERC</i> ou de <i>TERT</i>	71
Figure 14 Evolution de la capacité vitale après le diagnostic de la PID associée à une mutation <i>RTEL1</i>	72
Figure 15 Survie sans transplantation après le diagnostic de PID chez les patients mutés <i>RTEL1</i>	73
Figure 16 Représentation schématique de la position des mutations.....	74
Figure 17 (A) Expression pulmonaire de l'ARNm de <i>RTEL1</i> . Immunomarquage de RTEL1	75
Figure 18 Modélisation du déclin de la CVF chez les patients présentant un PID associée à une mutation <i>TERT</i> ou <i>TERC</i> et traités par pirfenidone.....	83
Figure 19 Prévalence relatives des différentes mutations mises en évidence dans les fibroses pulmonaires en 2016	87
Figure 20 Arbre généalogique d'une famille présentant une néomutation de <i>TERC</i>	94

RESUME

Environ 10% des patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) ont au moins un apparenté atteint de pneumopathie interstitielle diffuse (PID). Des mutations avaient été mises en évidence sur les gènes codant pour les protéines impliquées dans le métabolisme du surfactant et les protéines du complexe télomérase. Chez l'adulte, les mutations de *TERT* étaient les plus fréquentes (~15%), les mutations de *TERC*, *DKC1* et *TINF2* plus rarement retrouvées. Environ 80% des formes familiales de fibroses pulmonaires chez l'adulte étaient sans cause identifiée.

Les objectifs de cette thèse étaient 1) d'identifier un nouveau gène en cause dans les fibroses pulmonaires familiales de l'adulte inexplicées 2) de mieux caractériser le phénotype des patients présentant des mutations de *TERT*, de *TERC* ou du nouveau gène mis en évidence.

Nous avons sélectionné 35 familles présentant une fibrose pulmonaire familiale pour lesquelles la recherche de mutation *TERT*, *TERC*, *ABCA3*, *SFTPB* et *SFTPC* était négative, pour réaliser un séquençage de l'exome. Quatre familles sur les 35 analysées présentaient un variant très rare sur *RTEL1* à l'état hétérozygote. La présence des variants a été confirmée par séquençage selon la méthode de Sanger. Ces variants étaient absents des bases de données de contrôles. Les prédictions *in silico* étaient en faveur du caractère pathogène de ces variants. Les variants co-ségrégeaient avec la maladie dans les familles. L'analyse des variants à partir de la modélisation en 3D de la protéine suggérait un impact fonctionnel des variants sur le site de fixation à l'ATP ou à l'ADN. La taille des télomères des patients étaient raccourcies en comparaison des témoins de la même catégorie d'âge.

En 2014, 237 patients avec une fibrose pulmonaire (153 avec une fibrose pulmonaire familiale, 84 avec un syndrome télomère) avaient bénéficié d'un séquençage de *TERC* et de *TERT*. Les variants ont été classés comme pathogènes chez 40 patients (16,8%). Un âge de survenue précoce de fibrose, une macrocytose, ou une thrombopénie étaient significativement associée avec la présence d'une mutation. La probabilité d'une mutation était la plus importante pour les patients de 40-60 ans. La médiane de survie sans transplantation était plus faible pour les patients porteurs de mutations de *TERT* ou de *TERC*.

Nous avons réalisé un séquençage de l'exome chez 75 autres familles et mis en évidence 11 nouveaux variants de *RTEL1* probablement pathogènes *in silico*. Nous avons par ailleurs mis en évidence 3 autres mutations de *RTEL1* dans une cohorte de PID associées à une polyarthrite rhumatoïde. Nous avons colligé les données de 35 patients atteints de PID et porteurs de mutations hétérozygotes de *RTEL1*. Vingt patients présentaient une FPI (57%) et 10 une PID secondaire (25,7%). A la différence des mutations de *TERT* ou *TERC*, les mutations de *RTEL1* étaient associées à moins d'anomalies hématologiques. Par ailleurs, l'expression pulmonaire de la protéine *RTEL1* évaluée par immuno-histochimie et de l'ARNm par PCR était équivalente chez les patients porteurs de mutations *RTEL1*, de *TERT* ou atteints de FPI sans mutation.

Nous avons identifié et confirmé l'implication d'un nouveau gène, *RTEL1*, dans environ 10% des fibroses pulmonaires familiales. La présence d'une macrocytose, d'une thrombopénie ou d'un âge jeune en présence d'une forme familiale de fibrose est prédictive de la présence d'une mutation de *TERT* ou de *TERC*. La fréquence des maladies hématologiques semble plus faible pour les mutations de *RTEL1* que pour celles de *TERT* ou *TERC* dans notre cohorte recrutée sur l'atteinte pulmonaire. Les mutations de *TERT* ou de *RTEL1* sont fréquemment associées à des PID secondaires.

MOTS CLES

Télomères

RTEL1

TERT

TERC

Polyarthrite Rhumatoïde

Fibrose Pulmonaire Idiopathique

TITLE

Genetics of adult familial pulmonary fibrosis

KEYWORDS

Telomeres

RTEL1

TERT

TERC

Rhuemtoïd Arthritis

Idiopathic Pulmonary Fibrosis

ABSTRACT

Almost 10% of patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) have at least one relative with interstitial lung disease (ILD). Mutations on the genes encoding the proteins involved in the surfactant metabolism and the telomerase complex proteins have been reported. In adults, *TERT* mutations were the most frequent ($\approx 15\%$), mutations within *TERC*, *DKC1* and *TINF2* more rarely found. Approximately 80% of the familial forms of pulmonary fibroses in adults were genetically unidentified.

The objectives of this thesis were 1) to identify a new gene involved in familial pulmonary fibrosis 2) to better characterize the phenotype of patients carriers of *TERT*, *TERC* mutations or of the new gene identified.

We selected 35 families with familial pulmonary fibrosis without *TERT*, *TERC*, *ABCA3*, *SFTPB* and *SFTPC* mutation, to perform whole exome sequencing (WES). Four of the 35 families analyzed showed a very rare variant within *RTEL1* at the heterozygous state. The presence of the variants was confirmed by Sanger sequencing. These variants were absent from the databases of controls. *In silico*, predictions were in favor of pathogenicity. In families, the variants co-segregated with the disease. 3D modeling of the protein suggested a functional impact of the variants in the ATP or DNA binding site. The telomere length of patients were shortened compared to age matched-controls.

In 2014, 237 patients with pulmonary fibrosis (153 with familial pulmonary fibrosis, 84 with telomere syndrome) were sequenced for *TERC* and *TERT*. In 40 patients (16.8%), a variant was evidenced and classified as pathogenic. An early age of fibrosis, macrocytosis, or thrombocytopenia were significantly associated with the presence of a mutation. The probability of a mutation was greatest for patients aged of 40-60 years. The median survival without transplantation was lower for patients carriers of *TERT* or *TERC* mutations.

We performed WES for 75 new families and demonstrated 11 new variants of *RTEL1* classified as pathogenic. We also reported 3 other mutations of *RTEL1* in a cohort of ILD associated with rheumatoid arthritis. We collected data from 35 patients with ILD and carriers of *RTEL1* heterozygous mutations. Twenty patients had IPF (57%) and 10 a secondary ILD (25.7%). Unlike mutations within *TERT* or *TERC*, *RTEL1* mutations were associated with fewer hematological abnormalities. Furthermore, pulmonary expression of *RTEL1*, whether at a protein level evaluated by immunohistochemistry or at mRNA level evaluated by PCR was equivalent in patients carriers of *RTEL1* mutations, *TERT* mutations or in IPF patients without mutation identified.

We identified and confirmed the implication of a new gene, *RTEL1*, in about 10% of familial pulmonary fibrosis. The presence of a macrocytosis, a thrombocytopenia or a young age at diagnosis in the presence of a familial form of fibrosis is predictive of the presence of a mutation within *TERT* or *TERC*. The penetrance of hematological diseases appears to be lower for carriers of mutations within *RTEL1* than within *TERT* or *TERC* in our cohort of patients with pulmonary involvement. Mutations of *TERT* or *RTEL1* are frequently associated with secondary ILD.

ABBREVIATIONS UTILISEES DANS LE DOCUMENT

ABCA3 *ATP binding cassette, sub-family A (ABC1), member 3*

AD Autosomique Dominante

AR Autosomique Récessive

ATM *Ataxia Telangiectasia Mutated*

CTC1 *CST telomere replication complex component 1*

CVF Capacité Vitale Forcée

DIP Pneumopathie Interstitielle Desquamative

DKC Dyskératose Congénitale

DLCO Capacité de Diffusion du CO

EFR Epreuves Fonctionnelles Respiratoires

Flow-FISH Cytométrie de flux avec hybridation in-situ

FGF Facteur de croissance Fibroblastique

FPI Fibrose Pulmonaire Idiopathique

GAR1 ou NOLA1 *H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 1*

GM-CSF *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*

HH Hoyeraal-Hreidarsson

LBA Lavage Broncho-Alvéolaire

MU5B Mucine 5B

NAC N Acétyl Cysteine

NAF1 *Nuclear Assembly Factor 1 Ribonucleoprotein*

NKX2.1 *NK2 Homeobox 1*

NHP2 ou NOLA2 *H/ACA Ribonucleoprotein Complex Subunit 2*

NOP10 ou NOLA3 *H/ACA Ribonucleoprotein Complex Subunit 3*

PARN Poly(A) RNase

PID Pneumopathie Interstitielle Diffuse

POT1 *Protection of Telomeres Protein 1*

PPFE Fibro-Elastose Pleuroparenchymateuse

PIC Pneumopathie Interstitielle Commune

PISA Pneumopathie interstitielle diffuse avec auto-immunité

PINS Pneumopathie Interstitielle Non Spécifique

PHS Pneumopathie d'Hypersensibilité

PO Pneumopathie Organisée

PR Polyarthrite Rhumatoïde

QPCR Réaction en Chaîne Polymerase Quantitative

RAP1 *Repressor / Activator Protein 1*

RTEL1 *Regulator of Telomeres Elongation Helicase 1*

RGO Reflux Gastro-Oesophagien

SNP *Single Nucleotide Polymorphism*

SP-A à D *Protéine du Surfactant A à D*

STC *Syndrome des Télomères Courts*

STING *Stimulator of Interferon Genes*

STN1 *Suppressor of CDC Thirteen*

TCAB1 *Telomerase Cajal Body Protein 1*

TEN1 *Protein Involved in Telomeric Pathways in Association with STN1*

TERC *RNA subunit of telomerase*

TERT *Telomerase Reverse Transcriptase*

TGF β *Transforming Growth Factor β*

TIN2 *TERF1-Interacting Nuclear Factor 2*

TPP1 *Telomere Binding Protein 1*

TRAP *Protocole d'Amplification Télomérique Répété*

TRF *Technique de Restriction de Fragment de Télomères*

TRF1 et 2 *Telomere Repeat Factor 1 et 2*

VEGF *Vascular endothelial growth factor*

VGM *Volume Globulaire Moyen*

VRS *Virus Respiratoire Syncitial*

INTRODUCTION

La physiopathologie des fibroses pulmonaires est encore incomplètement comprise, mais il existe désormais un consensus pour penser qu'elle est liée à 3 facteurs principaux 1) une prédisposition génétique, 2) une agression pulmonaire répétée par exemple d'origine environnementale, 3) et enfin un facteur temps, expliquant que ces maladies se développent plus souvent chez l'adulte âgé, ces différents facteurs pouvant avoir une importance variable en fonction des patients (Figure 1) [1].

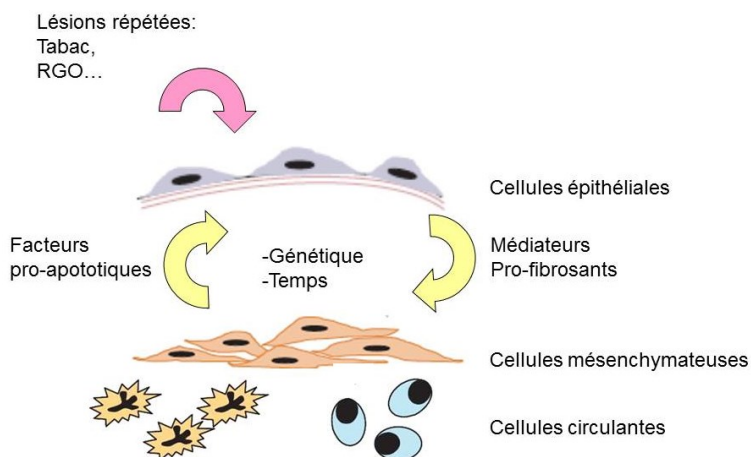


FIGURE 1 **PHYSIOPATHOLOGIE SIMPLIFIEE DES FIBROSES PULMONAIRES.** LE FACTEUR DECLENCHANT SERAIT DES LESIONS EPITHELIALES REPETEES. RGO REFLUX GASTRO-OESOPHAGIEN.

L'implication de l'épithélium dans la physiopathologie de la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est illustrée par le polymorphisme à risque de FPI dans le promoteur de *MUC5B* une mucine essentiellement exprimée au niveau l'épithélium bronchiolaire ([2] cf §1_3-A). Parallèlement, l'augmentation du risque relatif de FPI de 1,5 à 3 en cas de tabagisme, de 1,5 à 3 en cas d'exposition aux poussières de bois aux produits agricoles ou aux métaux, ou à une prévalence du reflux gastro-œsophagien jusqu'à 50% chez les patients atteints de FPI démontrent l'implication des lésions épithéliales répétées [3, 4].

Au stade de fibrose, l'épithélium secrète de nombreux facteurs de croissance, cytokines, chémokines, metalloprotéinase matricielle, qui provoquent la migration, la prolifération, et

l'activation des cellules mésenchymateuses [5]. Dans l'interstitium, les fibroblastes se différencient en myofibroblastes et s'organisent en foyers fibroblastiques, secrétant alors une quantité anormale de matrice extra-cellulaire qui s'accumule et provoque une destruction du parenchyme pulmonaire. Il est probable qu'il existe des redondances entre les voies activées par le *transforming growth factor β* (TGF β) et des facteurs de croissance comme le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) ou certains facteurs de croissance fibroblastique (FGF) [6]. Cela pourrait expliquer l'échec des études cliniques ayant étudié des drogues n'ayant qu'une seule cible et l'efficacité du nintedanib, un inhibiteur de tyrosine kinase ayant de nombreuses cibles dont le VEGF et plusieurs FGF [7].

La fibrogénèse requiert plusieurs années, et la FPI est considérée comme une maladie du vieillissement dont l'incidence augmente avec l'âge [5]. L'incidence de la FPI est <5/100000 personnes avant 50 ans contre ≈200/100000 après 75 ans [8].

La prévalence de la FPI est rare d'environ 0,02% dans la population générale. Alors que 2 à 20% des patients atteints de FPI présentent au moins un apparenté atteint de PID, cela suggère une prédisposition génétiques [9, 10]. Les études génétiques ont permis de mettre en évidence des polymorphismes présent dans la population général associés à un risque relatif augmenté de PID (jusqu'à 6) et des variants de certains gènes, très rares dans la population générale, et associés à une pénétrance supérieure à 50% pour les atteintes pulmonaires en fonction de l'âge d'évaluation des porteurs (voir paragraphe correspondant (Tableau 1 et Figure 2) [11-13].

<i>Fonction</i>	<i>Gene</i>	<i>Transmissio n</i>	<i>Age de début des manifestations pulmonaires/Signes associés</i>
Telomerase	<i>TERT-TERC</i>	AD	Adultes, moyenne 51 ans STC
Surfactant	<i>SFTPA2</i>	AD	Nouveau-né à 72 ans Cancer bronchique [14]
	<i>SFTPC</i>	AD	Enfants, rares adultes<50 ans Emphysème [15]
	<i>NKX-2.1 (TITF1)</i>	AD	Enfants, rares adultes<50 ans

Suppresseur de Tumeur	<i>NF-1</i>	AD	Chorée, hypothyroïdie [16] Adultes Neurofibromatosis de type 1 [17]
Lysosome	<i>HPS-1 to 8/AP-3B1</i>	AR	Adultes Syndrome d'Hermansky Pudlak [18]

TABLEAU1 PRINCIPAUX GENES POUR LESQUELS DES VARIANTES RARES AVAIENT ETE ASSOCIES AUX FIBROSES PULMONAIRES DE L'ADULTE AU MOMENT OU LA THESE A DEBUTE EN 2013 (AR AUTOSOMIQUE RECESSIF, AD AUTOSOMIQUE DOMINANT, STC SYNDROME DES TELOMERES COURTS)

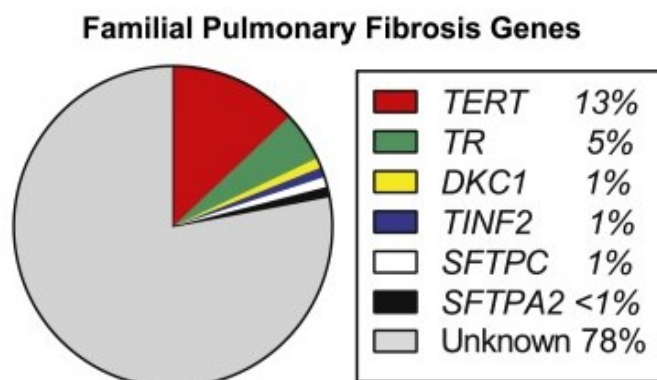


FIGURE 2 PREVALENCE DES DIFFERENTES MUTATIONS IDENTIFIEES DANS LES FIBROSES PULMONAIRES FAMILIALES RAPPORTEE EN 2015 D'APRES [19]

En 2014, 80 % des fibroses pulmonaires familiales étaient inexplicées.

Le but de ce travail de thèse était 1) d'identifier un nouveau gène dans les fibroses pulmonaires familiales inexplicées 2) de mieux caractériser le phénotype des patients avec mutations dans les gènes connus.

La première partie de ce document est constituée de rappels sur les connaissances sur les PID supposées d'origine monogénique suivie des résultats obtenus dans le cadre de cette thèse suivie d'une discussion des résultats et de perspectives.

1. GENETIQUE DES FIBROSES PULMONAIRES

1.1 CARACTERISTIQUES GENERALES DES FIBROSES PULMONAIRES FAMILIALES

Une PID est définie par la présence d'une infiltration diffuse de l'interstitium pulmonaire. La classification des PID repose sur la mise en évidence d'une cause à la pneumopathie interstitielle diffuse, par exemple médicamenteuse, et sur l'aspect scannographique et éventuellement histologique de la PID (Figure 3) [20].

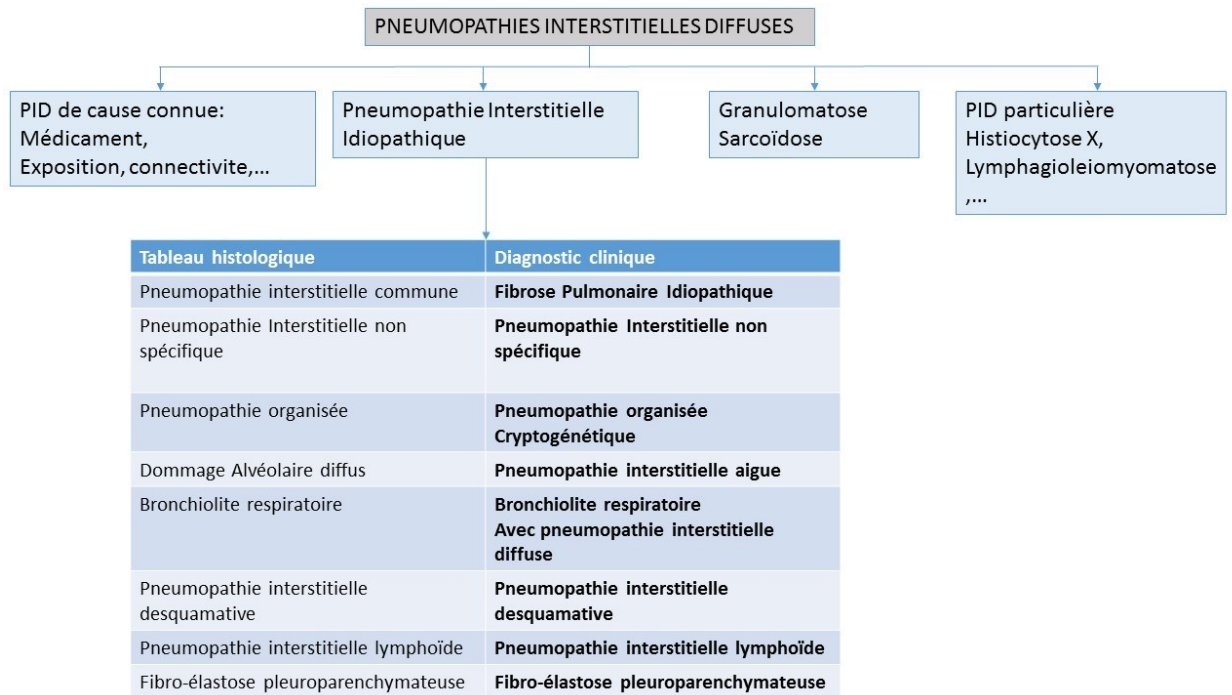


FIGURE 3 CLASSIFICATION SIMPLIFIEE DES PID [20]

La présence de 2 individus d'une même famille présentant une PID a soulevé le concept de fibrose pulmonaire familiale [21]. Il n'existe cependant pas de consensus sur la définition de la fibrose pulmonaire familiale, sur le nombre d'apparentés atteints ou sur le degré de parenté nécessaire. De plus, on peut observer dans certaines familles l'association de FPI, et de fibroses survenant dans un contexte étiologique déterminé, par exemple exposition à l'amiante, ou fibrose associée à une connectivite. Plus rarement, il s'agit de l'association d'une fibrose pulmonaire et d'une autre pneumopathie interstitielle, par exemple pneumopathie interstitielle desquamative (DIP), ou fibro-élastose pleuroparenchymateuse (PPFE), une pneumopathie interstitielle d'identification récente au cours de laquelle 16 à 40% des patients présentent un parent au premier degré atteint d'une PID [22].

A EPIDEMIOLOGIE ET FACTEURS DE RISQUES

L'arbre généalogique des familles de PID évoque une transmission autosomique dominante (AD) dans 80% des cas, avec la présence de cas sur plusieurs générations successives le plus souvent sans consanguinité connue [21]. Dans une étude mexicaine cas-témoin, la présence d'un antécédent familial de fibrose pulmonaire était le facteur de risque le plus important de présenter une FPI avec un OR=6,1 (95% IC, [2,3-15,9]) en analyse multivariée [23]. Il existe ainsi une augmentation du risque de décès par fibrose pulmonaire chez les parents au premier degré (risque relatif=4,7), au deuxième degré (risque relatif=1,92), des patients atteints de fibrose pulmonaire [24]. De façon intéressante, il existe également une augmentation du risque de développer une pneumopathie d'hypersensibilité (PHS) au sein d'une même famille. En effet dans une étude rétrospective japonaise sur une cohorte de 114 patients atteints de PHS chronique, 17,5% d'entre eux avaient une histoire familiale de fibrose pulmonaire [25]. Il existe évidemment des facteurs communs environnementaux, mais aussi des facteurs génétiques, qui pourraient contribuer à cette répartition des cas.

Plusieurs cohortes de patients atteints de fibroses familiales ont été rapportées [21, 26-30]. Deux séries ont mis en évidence qu'au sein de ces familles, la présence d'une PID était plus fréquente chez les hommes (55% d'homme dans le groupe PID contre 37% dans le groupe sans PID), chez les fumeurs (entre 45 et 67% vs 34%) et était corrélée à l'âge. L'âge moyen au diagnostic de PID était en moyenne de 68 ans contre 53 ans dans le groupe sans PID [21]. La présence d'auto-anticorps est possible dans les fibroses familiales. Des anticorps anti-nucléaires étaient retrouvés chez 7 patients sur 16 (44%) et des facteurs rhumatoïdes chez 5 patients sur 15 en dehors de toute connectivité [28].

B ASPECTS RADIOGRAPHIQUES ET ANATOMOPATHOLOGIQUES

Dans une série rétrospective de 309 patients, issus de 111 familles, présentant tous une PID familiale, l'aspect scannographique était évocateur de pneumopathie interstitielle commune (PIC)

dans 80% des cas, de pneumopathie interstitielle non spécifique (PINS) dans 6,4% des cas, et plus rarement de pneumopathie organisée (PO) (1%). Dans 12% des cas, l'aspect scannographique était jugé inclassable [21]. Cependant dans une série récente de 289 patients, la présentation scannographique n'était typique que dans la moitié des cas environ, l'aspect prédominant étant la PIC (22%), les aspects évocateurs de PINS (12%), PHS (6%), ou PO (2%) étant beaucoup plus rares. Les signes élémentaires les plus fréquents étaient le verre dépoli (97%) et les réticulations (82%) [29]. L'atteinte était diffuse sans prédominance cranio-caudale dans 64% des cas et à prédominance basale dans 31% des cas seulement. Les lésions étaient plus souvent sous-pleurales (67%) que diffuses (30%) [29].

Sur le plan histologique, c'est l'aspect de PIC qui est le plus souvent décrit : 11/21 dans une série [29]. Cependant, dans une série de 30 biopsies pulmonaires de patients atteints de PID familiale et relues par 3 anatomopathologistes, un aspect typique de PIC n'était retenu que dans 25% à 50% des cas selon l'observateur, et de manière consensuelle, dans 17/30 cas l'aspect histologique était considéré comme inclassable [27]. Un aspect de PINS, de PHS ou de PO peut être observé [21].

C PROFIL EVOLUTIF

Les formes familiales de PID pourraient être diagnostiquées à un âge plus précoce que les formes sporadiques [30]. Cependant le profil évolutif des formes familiales de fibrose pulmonaire dans leur ensemble est comparable à celui des formes sporadiques, l'âge et les causes de décès étant comparables à ceux observés dans les formes sporadiques [28, 30, 31]. Comme ce qui est observé dans les PID sporadiques, un aspect scannographique de PIC certaine ou une PIC histologique sont associés à un plus mauvais pronostic [21, 27]. En l'absence de données génétiques, la survie moyenne après diagnostic n'apparaît pas statistiquement différente de celle des FPI sporadiques [32].

D ATTEINTES PULMONAIRES SANS RETENTISSEMENT CLINIQUE DES APPARENTES : « ATTEINTES ASYMPTOMATIQUES »

L'étude scannographique systématique des apparentés appartenant à des familles comprenant plusieurs patients atteints de PID révèle une PID asymptomatique chez environ un quart d'entre eux [21, 26]. Les anomalies le plus souvent observées sont : des épaissements des lignes septales, des épaissements périsonchovasculaires, des réticulations et des opacités en verre dépoli.

Le lavage broncho-alvéolaire (LBA) peut montrer des anomalies avec un taux de lymphocytes en moyenne plus élevé que la normale (13+/-2%) [26]. Au stade asymptomatique, les épreuves fonctionnelles respiratoires (EFR) y compris la capacité de diffusion du CO (DLCO) retrouvent le plus souvent des valeurs supérieures à 80% de la théorique [26].

1.2 FORMES MONOGENIQUES : VARIANTES GENETIQUES RARES ASSOCIES AUX FIBROSES PULMONAIRES

A LE COMPLEXE TELOMERASE

A.1 PHYSIOLOGIE

Les télomères sont les régions d'ADN non codantes situées à l'extrémité des chromosomes qui doivent être protégés de la perte d'information génétique et des attaques enzymatiques.

Les télomères sont constitués de répétition de la séquence (TTAGGG) de 5 à 15 kb chez les humains jusqu'à 100 kb chez les rongeurs, se terminant par un simple brin de 50 à 300 nucléotides capable d'envahir l'ADN télomérique double brin pour former une structure de type lasso appelée boucle télomérique T (figure 4) [33].

Chez les mammifères, les télomères sont associés à un complexe shelterine composé du *Telomere Repeat Factor 1* (TRF1), de TRF2, de *TERF1-interacting nuclear factor 2* (TIN2), de *Repressor / Activator Protein 1* (RAP1), de la *protection of telomeres protein 1* (POT1) et de la *Telomere binding protein 1* (TPP1) (figure 4) [34]. TRF1 avait initialement été impliqué dans le contrôle de la longueur des télomères et TRF2 dans la protection des télomères en empêchant les fusions chromosomiques [35, 36]. Leurs fonctions sont cependant plus étendues, TRF2 ayant ainsi un rôle dans l'assemblage de la chromatine [37]. Le complexe shelterine a un rôle important dans la régulation de la longueur des télomères, la protection des attaques enzymatiques, et le recrutement des activités enzymatiques de réparation et de réplication de l'ADN.

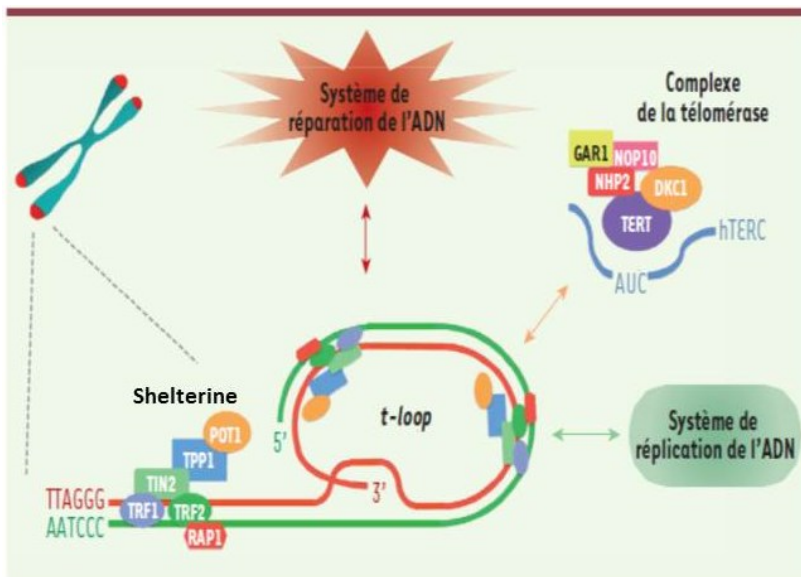


FIGURE 4 TELOMERES. LES TELOMERES SONT CONSTITUES DE REPETITION DE LA SEQUENCE (TTAGGG) SE TERMINANT PAR UN SURPLOMB SIMPLE BRIN CAPABLE D'ENVAHIR L'ADN DOUBLE BRIN POUR FORMER LA BOUCLE T. SIX PROTEINES SONT RECRUTEES POUR FORMER LE COMPLEXE SHELTERINE AFIN DE PROTEGER LES TELOMERES ET INTERAGIR AVEC LE COMPLEXE TELOMERASE ET LES SYSTEMES DE REPLICATION ET DE REPARATION DE L'ADN (D'APRES [38]).

Un autre complexe important est le complexe CST qui comprend 3 protéines: le *CST telomere replication complex component 1* (CTC1), le *Suppressor of CDC thirteen* (STN1) et la *protein involved in telomeric pathways in association with Stn1* (TEN1) (figure 3) [39-42]. CTC1 se lie avec l'ADN simple brin, et CTC1 est supposé être impliqué dans la synthèse télomérique ou non télomérique du brin indirect (*lagging strand*), mais le complexe CST pourrait avoir un rôle plus global dans la réplication de l'ADN.

Enfin, le complexe télomérase catalyse l'addition de séquences répétées d'ADN au niveau des télomères, protégeant ainsi les chromosomes du raccourcissement lors des mitoses [43]. Le cœur du complexe télomérase est composé de 2 parties : la *telomerase reverse transcriptase* inverse (TERT) et le *RNA subunit of telomerase* (TERC codé par le gène *TERC* ou *TR*) qui sert de modèle pour la synthèse de la séquence télomérique [44-46].

Bien que ce complexe soit suffisant pour générer une activité enzymatique *in vitro*, d'autres protéines sont requises pour son assemblage, sa circulation ou sa régulation [47, 48]. La protéine la mieux caractérisée est la dyskerine (codée par le gène *DKC1*) [49]. La dyskerine forme un complexe avec 3 protéines plus petites, les sous-unités 1 à 3 du complexe rinoNucléoprotéique H/ACA (GAR1 ou NOLA1, NHP2 ou NOLA2 et NOP10 ou NOLA3) [50]. TERC possède un domaine 3' H/ACA sur lequel se fixe le complexe dyskerine (Figure 5) [51]. L'holoenzyme formée par le complexe ribonucléoprotéique avec TERT et TERC et d'autres protéines est supposée s'assembler dans le corps de Cajal [47].

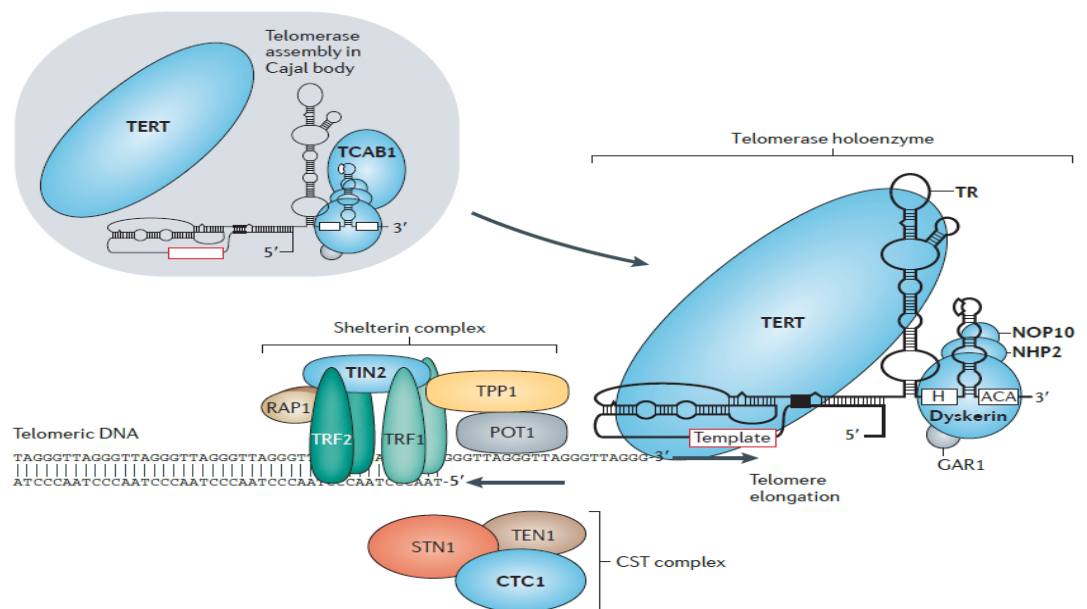


FIGURE 5 PRINCIPAUX COMPLEXES IMPLIQUES DANS LA SYNTHÈSE DES TÉLOMÈRES. LES GENES EN GRAS ONT ÉTÉ ASSOCIÉS À UN SYNDROME DES TÉLOMÈRES COURTS (STC) (D'APRÈS [52])

Par ailleurs d'autres protéines comme la *Telomerase Cajal body protein 1* (TCAB1), la Poly(A) RNase (PARN) ou le *Nuclear Assembly Factor 1 Ribonucleoprotein* (NAF1) se lient à TERC et interviennent dans sa régulation [53-55].

De très nombreux autres facteurs interviennent dans le contrôle de la stabilité du génome en général ou dans la régulation des télomères en particulier. *Regulator of telomeres elongation helicase 1* (RTEL1) a ainsi récemment été identifiée [56]. RTEL1 pourrait dissocier la boucle D télomérique et permettre une réplication complète des télomères [57, 58]. En son absence, les boucles T ne pourraient être désassemblées au cours de la réplication et des cercles T seraient formés après excision (Figure 6).

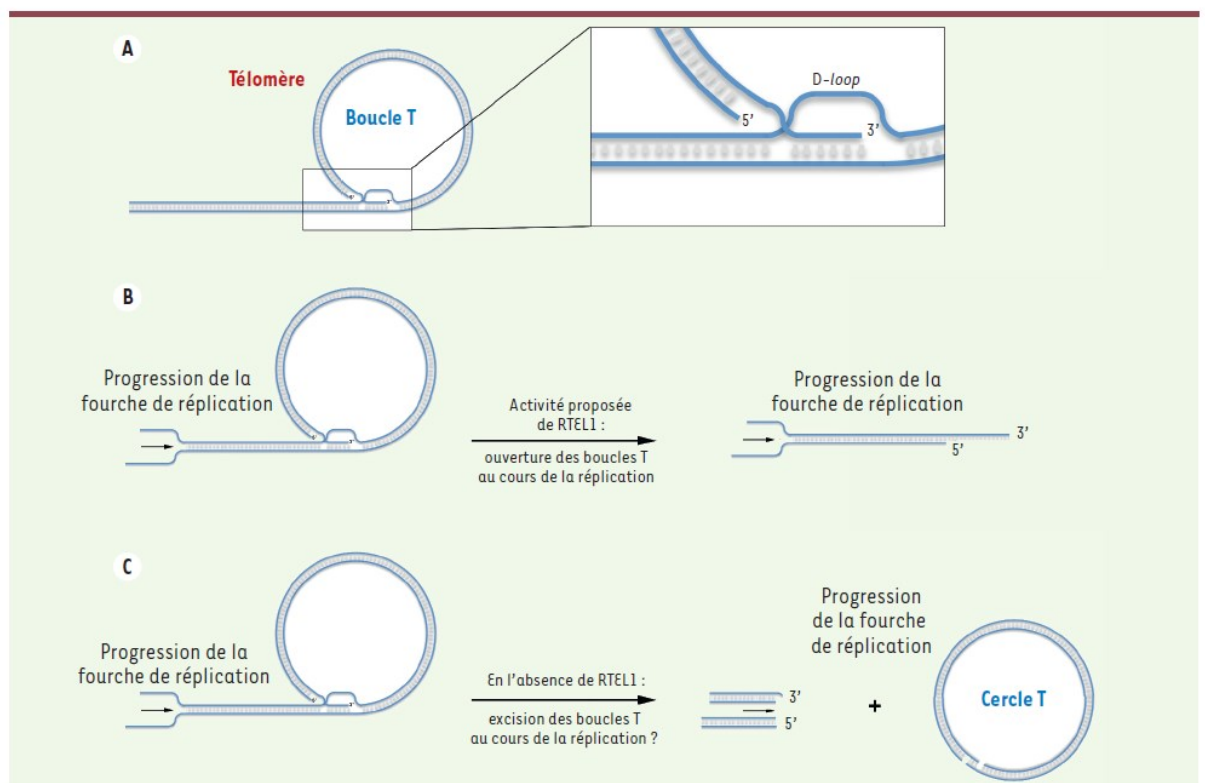


FIGURE 6 MODELE PROPOSE DE L'ACTIVITE DE RTEL1. RTEL1 POURRAIT DISSOCIER LA BOUCLE D ET PERMETTRE LA REPLICATION COMPLETE DES TELOMERES (D'APRES [59])

A.2 LONGUEUR DES TELOMERES

Les télomères raccourcissent progressivement après chaque division cellulaire. Ainsi les télomères pourraient agir comme des horloges biologiques. Lorsque les télomères atteignent une taille trop courte, les cellules stoppent leur prolifération et entrent dans un état de sénescence ou d'apoptose [33]. L'apoptose induite par le raccourcissement télomérique contribue à la préservation du génome dans son intégrité.

Le maintien de la taille des télomères n'est nécessaire que dans certains types cellulaires à forte capacité de renouvellement. Le complexe télomérase est exprimé principalement dans les cellules germinales, les cellules souches hématopoïétiques et quelques cellules activées comme les lymphocytes [60]. La plupart des cellules somatiques, comme les fibroblastes, n'expriment pas ou peu *TERT* et ont par conséquent une capacité proliférative limitée. Cependant de nombreuses cellules tumorales ré-expriment *TERT* leur conférant de nouveau un potentiel de division infini [61, 62].

Dans les cellules germinales la longueur des télomères reste stable voire s'allonge avec l'âge [63]. Dans les cellules somatiques avec une activité télomérase naturellement importante comme les cellules souches hématopoïétiques les télomères se raccourcissent après chaque division cellulaire et avec l'âge. Le mécanisme à l'origine du maintien de la taille des télomères dans les cellules germinales est incomplètement élucidé [63].

L'élongation des télomères se produit pendant la phase S et la phase M du cycle cellulaire [64, 65]. La télomérase allonge préférentiellement les télomères les plus courts [66]. La capacité d'élongation des télomères est très fortement liée à l'activité télomérase comme le démontre la diminution de la taille des télomères en présence d'une haploinsufisance d'un des gènes codant pour la télomérase [52].

Un dysfonctionnement télomérique provoque l'activation des voies de réparation de l'ADN, qui reconnaissent alors les extrémités chromosomiques comme des cassures double-brin de l'ADN. De nombreuses molécules impliquées dans la signalisation et la réparation des dommages de l'ADN sont alors activées comme *ataxia telangiectasia mutated* (ATM) [33]. L'activation des voies de réparation de l'ADN est responsable de l'entrée de la cellule en sénescence, de son apoptose [33]. Ainsi après inactivation des kinases responsables des points de contrôles des dommages de l'ADN (comme ATM), malgré des télomères courts le cycle cellulaire reprend en phase S [67].

A.3 MUTATIONS DU COMPLEXE TELOMERASE, DE LA DYSKERATOSE CONGENITALE AUX FIBROSES PULMONAIRES FAMILIALES

La meilleure démonstration de l'implication des protéines sus-citées a été donnée par la mise en évidence de mutations dans les gènes correspondants d'abord dans la dyskératose congénitale (DKC) puis dans les fibroses pulmonaires familiales ou les syndromes des télomères courts (STC) associés à une taille de télomères raccourcis.

La DKC a été en 1910 la première maladie des télomères décrite [68]. Elle associe dystrophie unguéale, hyperpigmentation cutanée localisée et leucoplasie orale. La triade est présente dans l'enfance, une insuffisance médullaire apparaît dans 86% des cas entre 10 et 30 ans et une fibrose pulmonaire dans environ 20% des cas. Ces patients présentent des complications pulmonaires fréquentes et graves après allogreffe de moelle [69-71]. Trois modes de transmission avaient été reconnus : récessif lié à l'X (OMIM, 305000), AD (OMIM, 127550) et autosomique récessif (OMIM, 224230)

Des 1986 des analyses de liaison avaient permis de localiser un gène candidat dans la région Xq28 [72]. En 1998, par des techniques de clonage positionnel dans cette région chez 10 patients sans lien de parenté, 4 mutations faux-sens différentes et une délétion de 3 acides aminés ont été mises en évidence dans *DKC1*, un gène particulièrement conservé [70]. L'hétérogénéité du phénotype a été mise en évidence par la découverte de mutation de *DKC1* dans le syndrome d'

Hoyeraal-Hreidarsson (HH), une forme particulièrement sévère de DC [73]. Le syndrome HH est un syndrome associant retard de croissance intra-utérin, microcéphalie, hypoplasie cérébelleuse, aplasie médullaire, et déficit immunitaire.

Des mutations hétérozygotes dans les gènes *TERC*, *TERT* et *TINF2* (codant pour TIN2) et plus récemment d'*ACD* [52] ont été mise en évidence dans des familles avec une DKC de transmission AD. La mise en évidence de mutation de *TERC* en 2001 a permis d'étayer le lien entre DKC et télomères [74]. Une analyse de liaison dans une famille de DKC avait permis de mettre en évidence la région d'intérêt 3q21–3q28, puis l'analyse du gène a montré une délétion et 2 mutations ponctuelles de *TERC* dans 3 familles non apparentées [74].

Des mutations homozygotes ou hétérozygotes composites de *NOP10*, *NHP2*, *RTE1* ou *PARN* ont été décrites dans des DKC de transmission AR [75-77].

Les autres gènes du complexe télomérase étaient candidats à être responsables de DKC ou de phénotypes moins sévères purement hématologiques. Ainsi dans une cohorte de 205 patients présentant une aplasie médullaire, après séquençage de *DKC1*, *NOP10*, *NHP2*, *TERC* et *TERT*, 5 présentaient une mutation de *TERC* et 7 une mutation hétérozygote faux-sens de *TERT* [78]. Ces 7 patients présentaient 5 mutations différentes absentes des bases de données, associées à des longueurs de télomères courtes et une activité télomérase réduite. Parallèlement une autre équipe décrivait une autre mutation faux-sens de *TERT* dans une famille avec anticipation des phénotypes, des patients présentant certains une DKC, d'autres une fibrose pulmonaire, des cheveux blancs et une macrocytose [79]. Cette mutation était associée à une longueur des télomères se raccourcissant de génération en génération et à une activité télomérase réduite.

La présence de patients présentant une fibrose pulmonaire dans ces familles suggérait que ces gènes pouvaient être impliqués dans les fibroses familiales. La fibrose pulmonaire est alors considérée comme une dyskératose « cryptique » entre autre par le groupe de I. Dokal en l'absence d'atteinte cutanée. En 2007, le séquençage de *TERT* et *TERC* chez 73 familles de fibroses révélait 6

nouvelles mutations hétérozygotes de *TERT* et de *TERC* [12]. Les mutations de *TERT* étaient 2 faux-sens, 2 variants entraînant un épissage alternatif, et 1 décalage du cadre de lecture. Ces mutations étaient associées à des télomères courts et à une activité télomérase réduite. Les mutations de *TERT* étaient associées à une transmission autosomique dominante (AD) de fibrose pulmonaire de pénétrance variable, la mutation de *TERC*, était associée à une transmission AD de fibrose pulmonaire ou d'aplasie médullaire, de pénétrance variable. De manière concomitante, une autre équipe rapportait le séquençage de *TERC* et de *TERT* chez 46 familles de fibrose pulmonaire qui révélait 6 nouvelles mutations de *TERT* et une mutation de *TERC* [11]. Les mutations de *TERT* étaient 2 faux-sens et 2 délétions avec décalage du cadre de lecture. Dans une cohorte de 44 patients présentant une FPI sporadique, un seul présentait une mutation faux-sens de *TERT* [11].

Parallèlement des mutations de *DKC1* ont été décrites dans des formes familiales de fibroses, puis des mutations hétérozygotes de *TINF2* initialement dans des DKC puis dans des formes familiales de fibrose [19, 80, 81]. Ces 2 gènes ne sont retrouvés que de manière anecdotique dans les fibroses familiales avec en particulier au moins une description pouvant suggérer un mécanisme de réversion somatique [82].

La pénétrance des mutations de *TERT*, *TERC*, *DKC1* et *TINF2* et le phénotype des patients mutés sont variables du syndrome HH à une FPI sporadique. *TERT* était alors le gène le plus fréquemment mis en évidence dans les fibroses familiales. Sur le plan génétique il n'y a pas de mutation fréquente ni de point chaud unique (hotspot) de mutations dans *TERT* ou dans *TERC*, la majorité des variants sont des variants faux sens supposés entraîner une perte de fonction avec haploinsuffisance (Figures 7 et 8). La protéine ou l'ARN sont potentiellement détectables dans les cellules sanguines circulantes. Il a donc été nécessaire de réaliser des tests fonctionnels pour qualifier ces mutations de pathogènes en mesurant la taille des télomères et l'activité télomérase [83, 84].

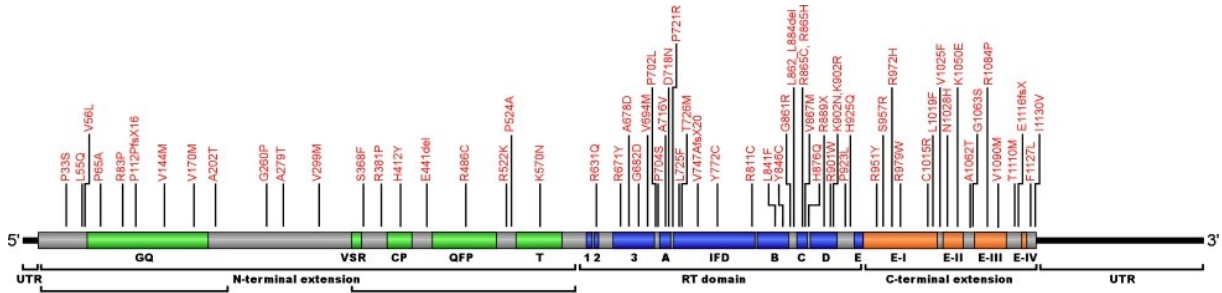


FIGURE 7 REPRESENTATION DES MUTATIONS CONSIDEREES COMME PATHOGENES SUR *TERT* AU 01/01/2017 [85]

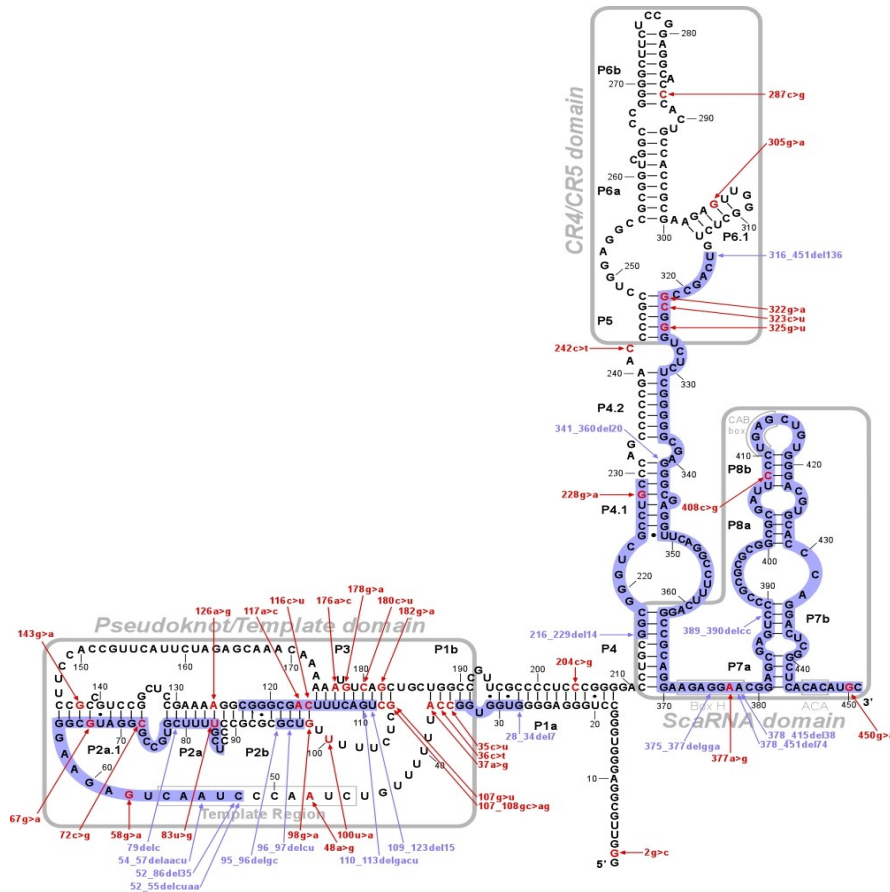


FIGURE 8 REPRESENTATION DES MUTATIONS CONSIDEREES COMME PATHOGENES SUR *TERC* AU 01/01/2017 [86]

A.4 HEREDITE COMPLEXE ET PHENOCOPIES

Les patients porteurs de mutations de *DKC1* ou de *TERC* présentent des télomères courts. De plus la taille des télomères raccourcit de génération en génération dans ces familles, et est associée à un phénomène d'anticipation original [87]. Jusqu'à cette découverte, les mécanismes d'anticipation étaient principalement associés à des mécanismes d'extension de triplet comme le syndrome de l'X fragile [88]. L'anticipation est ici mise en évidence par un âge de survenue plus précoce mais aussi un phénotype potentiellement de plus en plus grave. Bien que la pénétrance soit incomplète le phénotype de la première génération peut être limité à une macrocytose à plus de 60

ans, les générations suivantes pouvant présenter une fibrose pulmonaire, un STC ou une DKC dans l'enfance [87].

La longueur des télomères se transmet à tous les descendants, alors que la mutation ne se transmet qu'1 fois sur 2 [89]. Il est probable que la longueur des télomères influe sur la physiopathologie de la FPI [90, 91].

La pénétrance de la maladie étant ici associée à la présence de la mutation mais aussi à la taille des télomères ce qu'une équipe a qualifié d'hérédité complexe [92]. La présence de télomères courts pourrait être considérée comme un facteur de risque indépendant de la présence de la mutation de développer une PID, alors que la taille des télomères est associée à une moins bonne survie des patients atteints de FPI [91, 93].

Une phénocopie est la présence d'un phénotype déterminé par un génotype spécifique, par l'action de certains facteurs d'environnement sur une autre partie du génotype. En l'occurrence nous utilisons le terme de phénocopie pour décrire la présence de plusieurs cas de fibroses pulmonaires sans ségrégation de la mutation avec la maladie au sein d'une même famille. Ainsi, alors que l'interprétation du caractère pathogène repose habituellement sur la mise en évidence de la ségrégation de la mutation et de la maladie, la possibilité de transmission des télomères courts (hérédité épigénétique) complique le conseil génétique dans les familles avec mutations.

A.5 MESURE DE LA TAILLE DES TELOMERES

La mise en évidence chez les patients présentant une mutation *TERT* ou *TERC* d'une diminution de la longueur des télomères est un argument en faveur de la pathogénicité de ces mutations. La longueur des télomères peut être mesurée sur les leucocytes circulants ou sur les cellules épithéliales pulmonaires [89, 94]. La longueur des télomères diminue physiologiquement avec l'âge, d'environ 20% entre 20 et 80 ans et doit être comparée à une population appariée sur l'âge (Figure 9) [94]. La longueur des télomères diminue aussi en cas d'exposition au tabac ou aux pesticides et dans de nombreuses maladies chroniques [95-97].

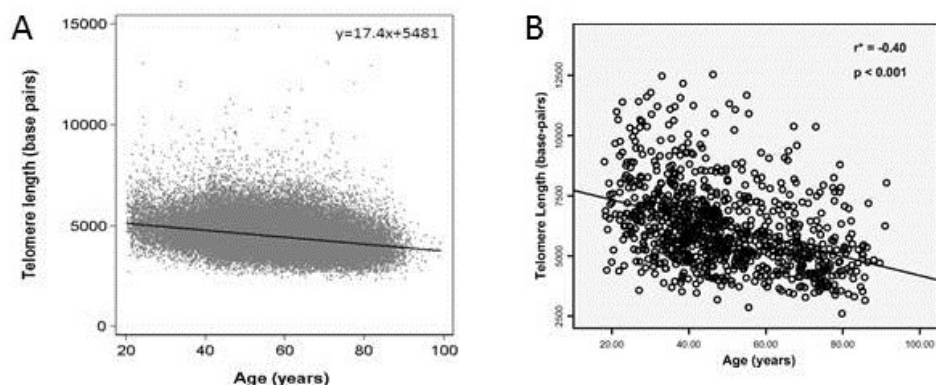


FIGURE 9 TAILLE DES TELOMÈRES EN FONCTION DE L'ÂGE MESURÉE EN QPCR SUR DEUX COHORTES INDEPENDANTES (A) [98] ET (B) [99]

La technique de référence de la mesure de la longueur des télomères est le Flow-FISH sur les leucocytes circulants:

- **L'hybridation in-situ en fluorescence quantitative (QFISH).** Cette technique utilise des sondes d'acides nucléiques peptidiques de séquences (CCCTAA) marquées par un fluorochrome. Les sondes vont reconnaître les extrémités télomériques et s'hybrider. La lecture grâce à un microscope à fluorescence des cellules en métaphase va permettre de mesurer l'intensité de fluorescence au niveau de chaque télomère, puis en comparant avec la fluorescence de plasmides calibrateurs, de calculer précisément la longueur des télomères [100]. Cette technique présente donc l'avantage de permettre de mesurer la longueur des télomères au niveau de chaque chromosome et non une moyenne de la population.
- **L'adaptation du FISH en cytométrie de flux (Flow-FISH) :** est une adaptation de la technique de Q-FISH à la cytométrie en flux [101]. Les sondes sont hybridées sur les cellules en suspension, et la lecture au cytomètre en flux permet d'obtenir une mesure de la moyenne de fluorescence dans l'échantillon de cellules. Un double marquage à l'iodure de propidium doit être réalisé afin de sélectionner uniquement les cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire (une seule copie d'ADN donc quantité de télomères constante). La quantification peut être réalisée en comparant la fluorescence de l'échantillon avec celle d'une lignée cellulaire dont la longueur des télomères reste constante que l'on utilise comme étalon interne. Les résultats sont alors obtenus en longueur relative.

D'autres méthodes de mesure existent :

- **Technique de restriction de fragment de télomères (TRF)** par Southern Blot qui, sur les télomères préalablement isolés permet d'estimer le nombre moyen de répétition des motifs terminaux. Cette technique consiste à digérer l'ADN télomérique par une ou plusieurs enzymes de restriction, puis les fragments de restriction sont séparés en fonction de leur taille par électrophorèse sur gel d'agarose. La position des fragments est révélée à l'aide de sondes marquées en autoradiographie ou chimiluminescence. La taille des fragments terminaux est estimée par comparaison entre la distance qu'ils ont parcourue dans le gel et celle couverte par des fragments de longueur connue [102].
- **Réaction en chaîne par polymérase (QPCR)** : Elle permet la quantification précise du nombre de copies du motif TTAAAG amplifié grâce à des amorces spécifiques et mesuré en temps réel. La PCR permet une utilisation plus rapide et aisée dans les études de cohortes [98].
- **L'analyse de l'élongation d'un seul télomère (STELA)** : Elle est également basée sur une mesure PCR, conduisant à une meilleure résolution que la technique Southern Blot. De plus, comme cette technique est basée sur la liaison d'une amorce spécifique, il est possible de mesurer la longueur d'un télomère spécifique (par exemple la longueur des télomères de la paire de chromosomes 21) [103].

La mesure de la taille des télomères n'est pas aisée. Il faut mesurer la taille des télomères d'une population contrôle permettant de refléter la grande variabilité de la taille des télomères entre les individus et de rendre le résultat en fonction des résultats de la population générale (on exprime les résultats en percentile. Une taille est considérée comme pathologique lorsque le patient présente une taille des télomères inférieure au premier percentile).

La technique de PCR quantitative est plus facile à mettre en œuvre dans un laboratoire de biologie moléculaire mais peu robuste, même si une corrélation est possible avec les résultats obtenus en Flow FISH [101].

Il est parfois difficile de conclure à partir de données individuelles pour un patient (figure 10) ou sur des malades [104].

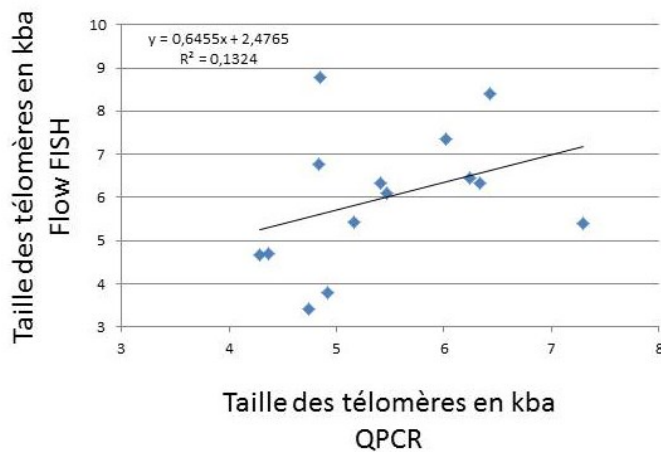


FIGURE 10 CORRELATION ENTRE LA TAILLE DES TELOMERES MESUREE EN QPCR ET EN FLOWFISH SUR UN MEME PRELEVEMENT (ADAPTE DE LA TABLE S4 DE [104])

La longueur des télomères ne peut être utilisée seule pour dépister les mutations dans le complexe télomérase. En effet, dans la cohorte de 134 patients avec une mutation *TERT*, 15% des patients mutés avaient des mesures de télomères normales, tandis que 85% d’entre eux présentaient des télomères d’une longueur inférieure au 10^{ème} percentile [89]. De même, certains patients présentant un syndrome HH ne présentent pas de télomères courts [105]. Cette observation va dans le sens de l’hypothèse de STC avec un défaut qualitatif et non quantitatif, et sans diminution de la taille des télomères. Par ailleurs 23% des patients atteints de FPI sporadiques présentent des longueurs de télomères inférieures au 10^{ème} percentile sans mutation identifiée de *TERT* ou de *TERC* [94].

A.6 MESURE DE L’ACTIVITE TELOMERASE

La plupart des techniques de mesure de l’activité télomérase repose sur le protocole d’amplification télomérique répété (TRAP).

Cette méthode est composée de deux phases, la première permet l’élargissement in vitro d’un fragment télomérique synthétique par la télomérase contenue dans l’extrait cellulaire, la deuxième permet la détection de ces produits d’élargissement par amplification par PCR [63]. Le principe initial de la technique TRAP consiste en l’utilisation d’une amorce synthétique (TS) mimant une extrémité télomérique et d’une seconde amorce (CX) permettant l’amplification par PCR des produits

d'élongation. La télomérase contenue dans l'extrait cellulaire va ainsi, en présence de dNTP, ajouter des répétitions télomériques à l'extrémité 3' de l'amorce synthétique : 5'-AATCCGTCGACGAGAGTT-3' pendant une phase d'incubation. Par la suite la présence de Taq polymérase et de l'amorce CX : 5'-AATCCCATTTCCCATTTCCCATTTCCC-3' permet l'amplification par PCR des produits formés par la télomérase.

La migration de ces produits d'amplification sur gel de polyacrylamide permet de distinguer des bandes successives correspondant aux produits de PCR formés après l'ajout d'un nombre distinct de répétitions télomériques à l'amorce synthétique. Il existe plusieurs techniques de détection de ces produits d'amplification qui vont permettre une mesure semi-quantitative ou quantitative de l'activité télomérase initiale.

L'ajout d'un standard interne dans le milieu réactionnel permet d'obtenir une mesure semi-quantitative de l'activité télomérase. Plusieurs techniques permettent par la suite de détecter les produits d'amplification de la PCR. Un test utilisant la méthode de transfert d'énergie en fluorescence permet, grâce à l'utilisation d'une amorce-sonde d'hybridation en épingle à cheveux marquée par un fluorochrome, une semi-quantification des produits de PCR [106]. Les produits de PCR peuvent aussi être détectés par ELISA, en marquant l'amorce synthétique avec la biotine. Après immobilisation en plaque de microtitration sur laquelle de la streptavidine a été fixée, les produits de PCR sont détectés grâce à une sonde d'oligonucléotides couplée à la peroxydase (TeloTAGGG Telomerase PCR-ELISA kit, Roche) [107].

Une technique de TRAP quantitatif a été développée par l'utilisation de la QPCR [108]. Ce test utilise le même principe que le TRAP classique, mais la phase d'amplification est réalisée en PCR temps réel. La réalisation d'une gamme étalon obtenue à partir de dilutions successives d'un échantillon de télomérase quantifié, permet la quantification précise de l'activité télomérase contenue dans l'échantillon de départ.

La mesure de l'activité télomérase peut en plus passer par une étape préalable de mutagénèse [109, 110].

A.7 PHENOTYPE DES PATIENTS PORTEURS DE MUTATIONS DU COMPLEXE TELOMERASE

La plupart des patients qui présentent une fibrose pulmonaire associée à une mutation de *TERT* présentent une consommation tabagique ou une exposition toxique environnementale illustrant le rôle de l'environnement dans la survenue de la maladie [89]. C'est probablement un des mécanismes des différences d'expressivité de chacune des mutations.

ATTEINTES PULMONAIRES

Les principales données cliniques connues étaient issues d'une cohorte américaine, rapportée en 2010, de 134 patients issus de 21 familles, présentant tous une mutation sur le gène *TERT*, avec des manifestations cliniques variables [89]. La présence d'une PID était corrélée à l'âge : avant 40 ans aucun des patients mutés ne présentait de PID, alors que plus de 60% des patients mutés présentaient une PID après 60 ans. L'âge moyen des patients présentant une PID était de 57 ans, plus jeune que celui des patients atteints de FPI sporadique (65 à 70 ans). Le ratio homme/femme des patients présentant une PID était de 1,5 et les hommes atteints étaient plus jeunes (54 ans) que les femmes (63 ans) au moment du diagnostic de PID. Pratiquement tous les patients atteints de PID (96%) étaient fumeurs ou déclaraient une exposition pneumotoxique [89].

L'interrogatoire retrouvait une dyspnée d'effort et l'auscultation révélait des crépitations chez la plupart des patients. Les EFR retrouvaient un syndrome restrictif dans 87% des cas et la DLCO était toujours abaissée. Le scanner thoracique était considéré comme typique de PIC dans 74 % des cas ou compatible avec le diagnostic de PIC dans 13% des cas. Des atypies étaient observées dans 13% des cas : rayon de miel prédominant dans les sommets, fibrose centrolobulaire. Des adénopathies médiastinales étaient décrites dans 38% des cas [89].

Une biopsie pulmonaire était disponible pour 29 patients. Tous les patients (25/29) dont le scanner était compatible ou typique de PIC étaient classés comme PIC sur l'examen histologique.

Des atypies pouvaient cependant être observées : présence d'inflammation dans les zones de fibrose (35% des cas), ou de granulomes non nécrotiques (17% des cas). De plus, des zones de pneumopathie organisée ou de dommage alvéolaire diffus surajoutées à la fibrose pouvaient être observées en cas d'exacerbation, gênant alors le diagnostic de PIC. Dans 4 cas, les lésions anatomopathologiques étaient considérées comme « fibrose pulmonaire non classable » [89].

La fibrose pulmonaire associée aux mutations de *TERT* est une maladie létale avec une survie moyenne de 3 ans après le diagnostic. Dans cette série, tous les patients présentaient une dégradation clinique, radiologique et fonctionnelle au cours du suivi. [89]. Ainsi l'âge moyen de décès était de 57,7 ans pour les hommes et 66,6 ans pour les femmes, et tous les patients décédaient de cause respiratoire. L'évolution peut cependant être plus longue. Une évolution particulièrement lente a été décrite chez 2 sœurs présentant une PID asymptomatique associée à une mutation de *TERT*. Après 30 ans de suivi sans tabagisme, l'une présentait toujours une DLCO normale alors que l'autre avait une diminution de la DLCO passant de 101 à 54% de la valeur prédite [111].

MANIFESTATIONS EXTRA-PULMONAIRES

Atteintes cutané-muqueuses

La première maladie des télomères décrite fut donc la DKC qui associe dystrophie unguéale, hyperpigmentation cutanée localisée et leucoplasie orale [71]. La triade classique de la dyskératose congénitale est habituellement absente chez les patients présentant une FPI associée à une mutation de *TERT*, mais ces patients peuvent présenter des anomalies des phanères. Ainsi dans une cohorte de patients porteurs asymptomatiques de mutation *TERT*, 40% d'entre eux présentaient un blanchissement des cheveux (canitie) précoce (avant 30 ans) contre 5% chez les non porteurs. La chute des cheveux ne semblait ni plus fréquente ni plus précoce [112].

Certaines lésions cutanées pourraient correspondre à un déficit de l'immunité cellulaire liée à une infection chronique à *papillomavirus* provoquant macules hyperpigmentées [113].

Atteintes hématologiques

Des mutations de complexe télomérase ont été décrites chez des patients atteints d'aplasie médullaire, de myélodysplasie, ou de leucémie aigüe en l'absence de signe de dyskératose congénitale [78, 114, 115]. La prévalence de ces mutations est inférieure à 2% dans une population de patients atteints d'aplasie médullaire ou de myélodysplasie non sélectionnée [115]. Cependant la coexistence chez un individu donné ou dans une famille d'une fibrose pulmonaire et d'une insuffisance médullaire avec une transmission AD est très évocatrice de mutation du complexe télomérase. Ainsi dans une cohorte de 10 familles consécutives avec une telle association, toutes présentaient une mutation de *TERT* ou de *TERC* [116]. Cependant la coexistence d'une myelodysplasie et d'une FPI chez des patients âgés de plus de 75 ans pourrait être ne pas être liée à une maladie monogénique.

Dans la cohorte de 134 patients mutés *TERT*, une anémie sans autre précision est décrite dans 13% des cas [89]. Par ailleurs, dans une cohorte de parents asymptomatiques issus de familles de patients présentant une mutation de *TERT*, par rapport aux parents non porteurs de mutations, la présence d'une mutation de *TERT* était associée à un volume globulaire moyen (VGM) augmenté (97+/-4 fL vs 90+/-5 fL) et à un nombre de plaquettes légèrement plus faible (209+/-56 G/L vs 237+/-57 G/L) [112]. La prévalence des thrombopénies n'est pas connue.

A l'inverse, des mutations du complexe télomérase, les polymorphismes associés à une augmentation de la taille des télomères sont associés à une augmentation du risque de lymphome B [117].

Atteintes hépatiques

Les patients présentant une mutation du complexe télomérase peuvent également présenter une cirrhose, qu'il s'agisse d'une cirrhose cryptogénique, post hépatite virale ou alcoolique. La présence d'une mutation augmente le risque de développer une cirrhose en cas d'infection par le virus de l'hépatite C et probablement aussi à consommation égale d'alcool [118, 119]. Dans une série de 134 patients atteints de cirrhose hépatique, 9 (7%) étaient porteur d'une

mutation de *TERT* et un d'une mutation de *TERC* [120]. Les 10 patients présentaient une cirrhose considérée comme secondaire, due à une hépatite C (n=4), à l'alcool (n=3), à une maladie de Wilson (n=1), à une stéatohépatite non alcoolique (n=1) à une cirrhose biliaire primitive (n=1).

Entre 5 et 8% des patients avec une mutation de *TERT* présentent une cytolysé hépatique [89]. Les patients avec la même mutation y compris de la même famille peuvent être indemne d'atteinte hépatique, ou présenter une élévation des enzymes hépatique avec un degré variable de nécrose, d'inflammation, de fibrose et de régénération hépatique histologique [118].

Les syndromes hépato-pulmonaires pourraient être fréquent dans le STC [121]. Dans une cohorte rétrospective de 42 patients dyspnéique et présentant un STC, 9 patients sans ou avec une PID minime présentaient un syndrome hépato-pulmonaire. Le syndrome hépato-pulmonaire était défini par la présence d'une hépatopathie associée à des dilatations vasculaires intra-pulmonaires provoquant une hypoxémie. L'analyse génétique montrait des mutations de *TERT* (n=4), de *RTEL1* (n=1) ou de *DKC1* (n=1), mais aucune mutation n'était mise en évidence pour 3 patients malgré un phénotype de DKC. Quatre des 6 patients ayant bénéficié d'une biopsie hépatique présentait une hyperplasie nodulaire régénérative, le diagnostic retenu était celui d'hypertension portale sans cirrhose. Deux patients ont reçu une transplantation pulmonaire et ont développé une fibrose pulmonaire respectivement 18 mois et 12 ans après.

Autres manifestations

D'autres manifestations ont été décrites dans le cadre de STC ou dans le syndrome HH: retard de croissance intra-utérin, déficits immunitaires cellulaires et humoraux, rétinopathies exsudatives, larmoiement lié à l'obstruction des canaux lacrymaux, saignements gastro-intestinaux ou atteinte neurologique centrale avec notamment des calcifications cérébrales, hypoplasie cérébelleuse microcéphalie [122, 123]. Toutes ces manifestations ont principalement été décrites chez des enfants et n'ont à notre connaissance peu ou pas été décrites en association avec des fibroses pulmonaires de l'adulte [69].

PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE: TRANSPLANTATION ET ANDROGENES

Il n'y a pas de traitement spécifique des fibroses pulmonaires associées à une mutation de *TERT*, et il n'existe pas de recommandation à ce sujet. Les recommandations habituelles peuvent donc pour l'instant être appliquées [124]. Compte-tenu de l'âge de ces patients une transplantation pulmonaire est souvent discutée. Il existe cependant un risque de complications hématologiques sévères et en particulier de thrombopénie après la transplantation chez ces patients [125, 126]. Une transplantation pulmonaire a été rapportée chez un patient atteint d'une mutation de *TINF2*. Ce patient de 13 ans présentait une fibrose pulmonaire au décours d'une allogreffe de moelle pour aplasie médullaire [127]. La transplantation était considérée comme un succès 21 mois après la transplantation, sous tacrolimus mais sans mycophenolate mofetil.

L'allogreffe de moelle est compliquée chez les patients atteints de DKC par une hypersensibilité au conditionnement conventionnel (irradiation ou chimiothérapie) et un risque de décès précoce d'origine hématologique. L'allogreffe peut être discutée avec un donneur apparenté et un conditionnement sans fludarabine [128].

Les androgènes sont utilisés en hématologie depuis plus de 60 ans [129]. Il a depuis été démontré, une augmentation de l'activité télomérase par l'exposition aux androgènes, *in vitro* sur des lymphocytes humains, et *in vivo* dans un modèle de souris avec dysfonction télomérase [130, 131]. Très récemment, dans une étude de phase I/II sur 27 patients atteints de STC, le danazol, une hormone de synthèse avec des propriétés androgéniques a permis une augmentation de la longueur des télomères, une réponse hématologique, mais une aussi une stabilisation de la fonction respiratoire [104]. Ainsi le danazol ou un traitement visant à augmenter la longueur des télomères apparaissent comme une perspective thérapeutique pour ces patients.

B LE COMPLEXE DU SURFACTANT

B.1 PHYSIOLOGIE

Le surfactant est un film phospholipidique tapissant la surface des alvéoles à leur interface air-liquide. Il empêche le collapsus alvéolaire en fin d'expiration grâce à ses propriétés tensio-actives [132]. Le surfactant est aussi impliqué dans la réponse anti-infectieuse et participe à la clairance muco-ciliaire [133].

Le surfactant est composé de 90% de lipides sécrété par les pneumocytes de type 2 et est composé de 90% de lipides principalement des phospholipides de type phosphatidylcholine, assemblés en double couche, et de 10 % de protéines dont 2 à 3% de protéines spécifiques. Les protéines spécifiques du surfactant sont SP-A, SP-B, SP-C et SP-D et les gènes correspondant sont nommés *SFTPA*, *SFTPB*, *SFTPC* et *SFTPD* [132]. SP-A et SP-D sont des protéines hydrophiles de la famille des collectines alors que SP-B et SP-C sont hydrophobes. La protéine SP-A est composée de deux protéines SP-A1 et SP-A2, partageant 98 % de leur séquence protéique.

Les protéines du surfactant sont essentiellement sécrétées par les pneumocytes de type 2. Avant sécrétion elles subissent plusieurs étapes de maturation dans le réticulum endoplasmique puis le Golgi. SP-A et SP-D sont sécrétée par des vésicules sécrétoires. SP-B et SP-C sont transportées vers la membrane cellulaire dans des corps lamellaires, par le transporteur ATP Binding Cassette famille A, member 3 (ABCA3) [134]. ABCA3 est un transporteur lipidique de 1704 acides aminés comprenant 12 domaines transmembranaires, 2 domaines de liaison à l'ATP et des boucles extra-cellulaires et intra-cellulaires. ABCA3 est principalement retrouvé au niveau de la membrane plasmique des pneumocytes de type 2. Elle est synthétisée et glycosylée dans le réticulum endoplasmique puis transportée via l'appareil de Golgi vers la membrane externe des corps lamellaires.

Le facteur de transcription homeobox NK2 (NKX2.1) active la transcription de *SFTPB*, *SFTPC* et *ABCA3*.

SP-A1 et SP-A2 s'oligomérisent en complexes de 6 jeux de trimères en forme de bouquet [135]. Les trimères de SP-A sont formés de 2 monomères de SP-A1, et un monomère de SP-A2

[136]. Les octadecamères de SP-A s'insèrent à l'interface air-liquide de la myéline tubulaire, à la périphérie des doubles couches de phospholipides.

Le surfactant est en partie recyclé par les pneumocytes de type 2 et dégradé par les macrophages alvéolaires et la clairance muco-ciliaire. L'accumulation du surfactant dans l'espace alvéolaire est caractéristique de la protéinose alvéolaire qui peut être secondaire à une mutation de *CSF2RA* ou *CSF2RB* codant pour les sous-unité formant le récepteur du *granulocyte macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF), responsable d'une dysfonction du système de renouvellement du surfactant, mais qui évolue rarement vers une fibrose pulmonaire [137].

B.2 FORMES MONOGENIQUES LIEES AUX MUTATIONS DE LA VOIE DU SURFACTANT

Les protéines du surfactant sont codées par les gènes correspondant *SPFPA1*, *SPFPA2*, *SPFTPB*, *SPFTPC* et *SPFTPD*. Des mutations de *SPFPA1*, *SPFPA2*, *SPFTPB*, *SPFTPC*, *ABCA3* et *NKX2.1* ont été associées à des fibroses pulmonaires. Aucune mutation de *SFTPD* n'a à ce jour été associée à des fibroses pulmonaires.

MUTATION DE SFTPA1 ET SFTPA2

SFTPA1 et *SFTPA2* sont 2 gènes très homologues distants d'environ 40 kb localisés dans la région chromosomique 10q22-23 [138, 139].

Deux mutations distinctes de *SFTPA2* codant pour le domaine de reconnaissance des carbohydrates de SP-A2 (F198S et G231V) ont été mises en évidence dans deux familles [14]. La transmission était AD avec un phénotype associant fibrose pulmonaire de début précoce et cancer broncho-pulmonaire.

Les protéines mutantes sont séquestrées dans le réticulum endoplasmique et ne sont pas sécrétées. Elles induiraient un stress du réticulum endoplasmique conduisant à une activation du protéasome et possiblement une augmentation de la production de TGFβ1 [140-142]. Les

mutations (F198S et G231V) entraîneraient une diminution de la dimérisation et trimérisation des protéines SP-A [141].

Quatre autres mutations de *SFTPA2*, dont 3 dans le domaine de reconnaissance des hydrates de carbone (L12W, N171Y, N210T, G231R) ont été décrites chez des adultes présentant des PID ou des cancers broncho-pulmonaires, mais sans études fonctionnelles confirmant leur pathogénicité [143, 144].

L'équipe du Professeur Amselem du laboratoire de génétique de l'hôpital Trousseau a récemment impliqué *SFTPA1* dans une famille de patients présentant des fibroses pulmonaires de début précoce et des cancers broncho-pulmonaire [145]. Le séquençage de *SFTPA1* et *SFTPA2* chez 12 familles présentant des fibroses familiales et des cancers broncho-pulmonaire a permis de mettre en évidence chez 2 patients le variants W211R situé dans le domaine de reconnaissance des hydrates de carbone. Après nouvel interrogatoire, des patients et des familles, l'arbre généalogique avait pu être complété et les 2 patients étaient apparentés. La mutation ségrégeait avec le phénotype. La mutation n'était pas présente dans les bases de données. *In vitro*, la transfection de la mutation entraînant l'arrêt de la sécrétion de SP-A1. L'expression épithéliale alvéolaire de SPA-1 était altérée chez le patient porteur de la mutation qui a pu être évalué confirmant la pathogénicité de la mutation [145].

MUTATION DE *SFTPB*

Les mutations homozygotes ou hétérozygotes composites de *SFTPB* sont associées à un syndrome de détresse respiratoire néo-natal et n'ont pas été associées à des formes familiales de fibrose pulmonaire chez l'adulte [132]. Les mutations hétérozygotes de *SFTPB* ne semblent pas avoir d'influence sur la fonction respiratoire au moins jusqu'à 40 ans, mais pourraient ensuite augmenter le risque de développer une broncho-pneumopathie chronique obstructive chez les patients fumeurs [146, 147].

MUTATION DE *SFTPC*

Parmi les mutations des gènes du surfactant, les mutations de *SFTPC* sont celles qui ont été les premières décrites dans les PID familiales de l'adulte. La première mutation hétérozygote de *SFTPC* de transmission AD a été rapportée en 2001 chez un nouveau-né, rapidement suivie de la description d'une famille comportant 11 adultes présentant une FPI et 3 enfants atteints de PID, porteurs d'une mutation de *SFTPC* (L188Q) [148, 149]. Chez l'enfant environ 15% des PID sont associées à des mutations de *SFTPC*, qui représentent l'étiologie la plus fréquente des PID [150-153]. Chez l'adulte, des mutations de *SFTPC* ont été rapportés dans de rares cas de PID familiales ou non, chez des jeunes adultes habituellement de moins de 50 ans au début des symptômes [154].

La physiopathologie de la PID varie selon la partie du gène *SFTPC* touchée par la mutation. Ainsi les mutations de la région C-terminale touchent le précurseur protéique pro-SP-C, aboutissent à un repliement anormal dans le pneumocyte de type 2, et induisent un stress du réticulum endoplasmique [155, 156]. La mutation la plus fréquente (I73T) correspond à environ 50% des mutations, n'induit pas de stress du réticulum endoplasmique mais altère le trafic intracellulaire de la protéine [157]. De manière remarquable, les souris exprimant une forme mutée de la SP-C humaine ne présentent pas de PID, mais présentent une sensibilité pulmonaire augmentée à la bléomycine [158].

Le mode de transmission de la mutation est AD. La quasi-totalité des mutations sont des mutations faux-sens. Les néomutations sont fréquentes chez l'enfant et pourraient atteindre 50% des cas [157]. Le séquençage de *SFTPC* est proposé pour tous les enfants présentant une PID inexplicée. Dans la cohorte française de 205 enfants présentant une PID, une mutation de *SFTPC* avait été mise en évidence dans 10,7% des cas [150]. La pénétrance est cependant variable et la PID peut être diagnostiquée chez l'adulte au stade asymptomatique après une enquête familiale [159]. La prévalence des mutations de *SFTPC* est faible au cours de la FPI, inférieure à 1% dans les formes sporadiques [160, 161]. Une équipe Hollandaise a détecté une mutation de *SFTPC* dans 5 des 20 familles testées, issues d'une cohorte de PID familiale [154]. Les familles présentaient des

mutations différentes excluant un effet fondateur. Aucune autre équipe n'a depuis rapporté une telle prévalence [30]. Dans notre expérience la prévalence des mutations de *SFTPC* dans les formes familiales de PID est inférieure à 3% y compris après exclusion des mutations de *TERT* ou *TERC*.

L'âge au diagnostic varie de la naissance à 72 ans. La présentation chez l'adulte est très variable y compris avec la même mutation ou dans la même famille, depuis des formes pauci- voire asymptomatiques, jusqu'à des PID sévères fibrosantes [149, 151, 154]. L'infection par le virus respiratoire syncytial (VRS) ou l'association à une mutation hétérozygote d'*ABCA3* pourraient révéler ou aggraver la maladie chez l'enfant [154, 162, 163].

L'aspect radiologique le plus fréquent associe verre dépoli prédominant, épaississements septaux, et kystes, de distribution variable avec une prédominance des lésions dans les lobes supérieurs [154, 164, 165]. A un stade plus tardif des lésions en rayons de miel peuvent prédominer. Chez l'enfant la description scannographique des kystes correspond à la dilatation des bronchioles respiratoires et des alvéoles [164, 166].

Sur le plan histologique, l'aspect le plus fréquemment décrit chez l'adulte est celui de PIC, mais des aspects de PINS, de PO ou de pneumopathie interstitielle desquamative peuvent également s'observer. Il n'est pas décrit de granulome, mais des particularités peuvent être observées : inflammation modérée, fibrose centro-lobulaire [154].

Chez l'enfant, différents traitements ont été proposés avec succès: bolus de méthylprednisolone, hydroxychloroquine ou azithromycine [152, 164, 167]. Il s'agit cependant de cas cliniques ou de séries rétrospectives sans groupe témoin. Quoi qu'il en soit aucun traitement ne semble permettre une amélioration en cas de rayon de miel prédominant. L'effet des drogues antifibrosantes en particulier de la pirfenidone n'est pas connu. La maladie ne semble pas récidiver après transplantation pulmonaire.

MUTATION DE *ABCA3*

Plus de 150 variants d'*ABCA3* ont été décrits [134, 168]. Les mutations homozygotes ou hétérozygotes composites de *ABCA3* sont associées à des PID d'intensité variable, allant de détresses respiratoires sévères chez les nouveau-nés à terme, jusqu'à des PID de découverte tardive chez des adultes jeunes [169, 170]. Le diagnostic est le plus souvent posé en période néonatale. Tous les enfants présentant une mutation homozygote ou hétérozygote composite entraînant un codon stop prématuré présentent une insuffisance respiratoire néonatale [171]. En revanche les variants faux-sens ou prédits comme modifiant l'épissage sont associés à un âge de présentation plus tardif et à un meilleur pronostic. Une large famille dont les patients les plus âgés avaient 52 et 57 ans et un patient de 41 ans, tous non ou peu fumeurs et présentant un syndrome emphysème fibrose associé à des mutations d'*ABCA3* ont récemment été rapportés [170, 172]. Chez l'enfant, des améliorations ont été rapportés avec la prednisone, l'hydroxychloroquine ou l'azithromycine [167].

MUTATION DE NKX2.1

NKX2.1 (TTF1) est un facteur de transcription impliqué dans la formation du surfactant, dans la croissance et la fonction thyroïdienne, et dans le développement neurologique. Il se fixe, entre autres, au promoteur des gènes *SFTPB* et *SFTPC* pour activer leur transcription.

Les mutations hétérozygotes de *NKX2.1* sont associées chez l'enfant à des PID qui peuvent précéder l'hypothyroïdie et les anomalies neurologiques (hypotonie, retard de développement, chorée) caractéristiques de ces mutations [173]. Ces mutations ont cependant été rapportées chez au moins 2 adultes dont un homme de 26 ans appartenant à une famille avec plusieurs patients atteints de PID d'âge de début variable sans atteintes neurologique ou thyroïdienne [16, 173].

C AUTRES SYNDROMES AVEC FIBROSES PULMONAIRES ASSOCIES A DES MALADIES MONOGENIQUES

En plus des maladies génétiques liées aux mutations des gènes surfactant ou du complexe télomérase, des fibroses pulmonaires ont été décrites au cours de certains syndromes familiaux rares (tableau 1).

C.1 SYNDROME D'HERMANSKY PUDLAK

Le syndrome d'Hermansky-Pudlak (SHP) est une maladie génétique liée à une genèse anormale des organites intra-cellulaires liés aux lysosomes [174]. Ces organites sont présents dans les lymphocytes, les plaquettes, les pneumocytes de type 2 et les mélanocytes. Les patients atteints d'un SHP présentent un albinisme oculaire et cutané et une prédisposition aux saignements. Cette maladie est exceptionnelle en France, mais relativement fréquente à Porto Rico avec une prévalence de 1/1800 individus [175]. Il existe 9 gènes associés au SHP avec des présentations cliniques qui varient en fonction du gène muté. Ainsi certaines mutations sont associées à une colite granulomateuse ressemblant à une maladie de Crohn, d'autres à un déficit immunitaire. Jusqu'à 80% des patients atteints de mutations de *HPS-1* ou *HPS-4* pourraient présenter une fibrose pulmonaire [176]. La présentation scannographique et histologique de ces patients ne semble pas être celle d'une PIC [177]. Le scanner retrouve des réticulations et des condensations, l'examen histologique met en évidence une fibrose difficile à classer avec une prédominance périlobulonnaire. La fibrose pulmonaire pourrait être responsable de la moitié des décès avant 50 ans au cours du SHP [178]. Deux études contre placebo ont montré des résultats contradictoires sur l'effet de la pirfenidone dans cette maladie, l'une de 35 patients ne retrouvant pas de différence entre les 2 groupes, l'autre de 21 patients retrouvant un ralentissement du déclin respiratoire chez les patients traités par pirfenidone [18, 178].

C.2 NEUROFIBROMATOSE

Les neurofibromatoses sont des dysplasies du mésoderme et de l'ectoderme caractérisées par la présence de neurofibromes, de taches « café au lait », d'hamartome pigmenté de l'iris (nodules de Lish) [179]. Le type 1 (NF1 ou maladie de von Recklinhausen) est la forme la plus fréquente avec une prévalence de 1/3000 ; la transmission est AD. Le type 2 (NF2) est de

transmission autosomique récessive avec une prévalence d'environ 1/33000 dans le monde. Une revue réalisée en 2007 rapportait 64 cas de fibroses pulmonaires associées à la NF1 [180]. La radiographie thoracique retrouvait des bulles dans 73% des cas qui prédominaient dans les lobes supérieurs dans 93% des cas. Le scanner retrouvait de l'emphysème (25%), des kystes (25%), des opacités en verre dépoli (37%), des bulles (50%) ou des réticulations (50%). L'association entre une fibrose pulmonaire et la neurofibromatose est discutée [181]. Il semble exister une association entre une maladie kystique pulmonaire prédominant dans les sommets et la NF1.

C.3 AUTRES SYNDROMES

La poïkilodermie est caractérisée par des marbrures cutanées, des télangiectasies et une atrophie épidermique. Plusieurs poïkilodermies d'origine génétiques sont connues comme le syndrome de Werner. Cinq familles présentant une poïkilodermie associée à des contractures tendineuses et à une fibrose pulmonaire ont été associées à des mutations du gène *FAM111B* [182].

Très récemment 10 patients pédiatriques ou jeunes adultes qui présentaient une inflammation systémique, une vascularite périphérique et une PID, ont révélé être associés avec des mutations activatrice de *TMEM173*, codant pour *Stimulator of interferon genes* (STING) [183].

Cinq autres familles qui présentaient une polyarthrite, des auto-anticorps et une PID ont été associées avec des mutations de *COPA*, interférant dans le transport intracellulaire par l'appareil de Golgi [184].

Le variant acadien du syndrome de Fanconi est diagnostiqué dans l'enfance et associe un rachitisme, une petite taille, et une insuffisance rénale avec protéinurie [185]. Une fibrose pulmonaire apparaît entre 30 et 50 ans et conduit au décès par insuffisance respiratoire. Très récemment une étude par séquençage de génome a permis de mettre en évidence des mutations homozygotes de *NDUFA6* chez les 9 patients testés [186]. Ce variant intronique (c.298-731 A > G) est associé un épissage alternatif de la protéine impliquée dans la chaîne respiratoire mitochondriale.

D *ELMOD2*

Une étude de liaison sur 17 familles finlandaises de FPI a mis en évidence un locus comportant 2 gènes candidats de fonction inconnue dont seul le gène *ELMOD2* est exprimé dans le poumon [187]. L'expression d'*ELMOD2* dans les biopsies de poumon de patients atteint de FPI est diminuée par rapport aux contrôles. Cependant, aucune mutation n'a été trouvée dans ce gène chez les familles en séquençage direct [187]. Un article montre l'implication d'*ELMOD2* dans la réponse antivirale médiée par TLR3 (Toll- like receptor 3) [188].

1.3 FORMES POLYGENIQUES : POLYMORPHISMES GENETIQUES ET EPIGENETIQUES ASSOCIES AUX FIBROSES PULMONAIRES

En plus de l'hérédité mendélienne monogénique, plusieurs polymorphismes génétiques ont été associés à la FPI.

A LE PARADOXE *MUC5B*

Un polymorphisme dans le promoteur de *MUC5B* est fortement associé à la FPI dans la population caucasienne, mais pas dans les populations asiatiques ou africaines [2, 189, 190]. Ce polymorphisme a été associé à la FPI suite à la mise en évidence d'une liaison entre la FPI et une région de 3,4 Mb en 11p15 (LOD score à 3,3) à partir de 82 familles de fibroses pulmonaire [2]. Cette région a été séquencée chez 83 patients présentant une fibrose pulmonaire familiale, 492 FPI et 322 contrôles. Dix-neuf polymorphismes nucléotidiques simple (SNP) étaient significativement associés aux PID, le SNP rs35705950 situé en amont du gène *MUC5B* était celui avec la plus forte association ($p = 2,55 \times 10^{-37}$).

Dans la population caucasienne, ce polymorphisme est présent dans $\approx 10\%$ de la population générale contre $\approx 35\%$ dans les formes sporadiques ou familiales de FPI. Ainsi le risque relatif de développer une FPI est ≈ 6 pour les patients hétérozygotes et ≈ 20 pour les patients homozygotes quelle que soit la population caucasienne étudiée [2, 189, 191-194]. En revanche ce polymorphisme n'est pas associé à la sarcoïdose ou aux PID des sclérodermies [189, 194]. La prévalence de ce

polymorphisme est plus faible dans la population générale asiatique <2% et sa prévalence chez les patients d'origine asiatique atteints de PID est comprise entre 3-7%, l'association entre ce polymorphisme et les PID dans ces populations est plus faible [191-193]. Ce polymorphisme est encore plus rare dans les populations d'origine africaine [189].

L'allèle minoritaire est associé à une augmentation de l'expression de *MUC5B*. *In vitro*, la transfection du variant rs35705950 sur des cellules A549 sauvages augmente l'activité du promoteur [195]. L'expression de *MUC5B* est multipliée par 37 dans les poumons des sujets sains porteurs de l'allèle à risque [2]. L'expression de *MUC5B* est 14 fois plus importante dans les poumons atteints de FPI que dans les poumons sains [196]. Cependant l'expression de *MUC5B* et l'aspect histologique des poumons atteints de FPI ne varient pas en fonction de ce polymorphisme [2, 195].

Mucine 5B (*MUC5B*) est une mucine normalement absente de l'épithélium alvéolaire, mais exprimée par les cellules épithéliales bronchiolaires [2]. Dans les poumons de FPI, *MUC5B* est fortement exprimé par les cellules qui tapissent les kystes du rayon de miel [2]. La présence du variant rs35705950 est associée dans les poumons de FPI à une augmentation de la proportion de cellules marquées par *MUC5B* au niveau bronchiolaire mais ne modifie pas le taux de cellules marquées par *MUC5B* au niveau des kystes [195].

Le polymorphisme du promoteur de *MUC5B* augmente probablement surtout le risque de développer une fibrose pulmonaire avec un aspect de PIC plutôt qu'une fibrose avec un autre aspect. Dans deux analyses prospectives Chung et al. ont suggéré que les patients homozygotes pour l'allèle mineur de *MUC5B* présenteraient plus spécifiquement un aspect de PIC histologique ou scannographique plutôt qu'une autre PID [197, 198]. Cependant dans une cohorte de 31 patients allemands avec un diagnostic de PINS, 2 (6%) étaient aussi homozygotes pour le polymorphisme à risque sur *MUC5B* [191].

En immunohistochimie, la proportion de cellules marquées par MUC5B est deux fois plus importante dans les voies aériennes distales poumons atteints de FPI que de PINS idiopathique ou de PINS associée à une sclérodémie systémique [199]. En revanche, la proportion de cellules tapissant les kystes de rayons de miel marquées par MUC5B est la même dans les trois histologies [199].

Les souris KO pour le gène *MUC5B* ne présentent pas de PID. Elles présentent des infections bronchiques et otologiques, en particulier à Staphylocoque doré, associées à une diminution des capacités de phagocytose [200].

Le rôle de *MUC5B* au cours de la FPI est peu clair mais souligne l'importance de la réponse épithéliale bronchiolaire au cours de la physiopathologie de la FPI [201]. L'hypothèse principale serait que ce polymorphisme en altérant la réponse anti-infectieuse bronchiolaire, augmente le risque d'infection et de colonisation bronchiques, et que les infections répétées pourraient agir comme un facteur déclenchant de FPI (figure 1) [202, 203]. Cette hypothèse physiopathologique de la FPI a notamment justifié de la réalisation d'une étude clinique avec le cotrimoxazol dans la FPI avec cependant un effet thérapeutique incertain [204].

Paradoxalement, la présence de ce polymorphisme chez les patients atteints de FPI est associée à une augmentation de la survie, mais pas à une réponse thérapeutique différente à la N Acétyl cystéine (NAC) [205-207].

B *TOLLIP* ET AUTRES POLYMORPHISMES

De nombreux autres SNP par exemple sur *TLR9* ont été associés à la FPI [208-210] (Tableau 2). Plus récemment des études d'association génome entier-fibrose pulmonaire ont d'abord confirmé l'association entre la FPI et *MUC5B*, *TERT* ou *TERC* mais ont aussi mis en évidence plusieurs nouveaux loci d'intérêt [211, 212]. Ces loci ont permis de soulever de nouvelles voies physiopathologiques comme :

- La reconnaissance des pathogènes par les récepteurs de type toll avec notamment un SNP sur le gène *TOLLIP* codant pour une protéine interagissant avec les récepteurs toll.
- Les protéines d'adhésion intercellulaires avec la présence de SNP associés aux PID sur *DSP* codant pour la desmoplakine ou sur *DPP9* codant pour une protéine d'adhésion fibroblastique

En plus d'augmenter le risque de développer une PID, ces SNP pourraient être associés à une évolution différente. Dans une analyse *post hoc* d'une étude clinique prospective évaluant la NAC contre placebo dans la FPI, le polymorphisme de *TOLLIP* était associé à une modification de la réponse thérapeutique [206]. Moins de 10 patients étaient finalement analysés dans certains sous-groupes, et ces données doivent être confirmées par une étude prospective.

<i>Localisation</i>	<i>Gène</i>	<i>Polymorphisme</i>
2q14.2	<i>IL1RN</i>	rs408392 rs419598 rs2637988
3q26.2	<i>TERC</i>	rs6793295
4q13.3	<i>IL8</i>	rs4073 rs2227307
4q22.1	<i>FAM13A</i>	rs2609255
4p35.1	<i>TLR3</i>	rs3775291
5p15.33	<i>TERT</i>	rs2736100
6p21.2	<i>CDKN1</i>	rs2395655 rs733590
6p21.31	<i>DRB1</i>	DRB1*1501 DQB1*0602
6q21.31	<i>DSP</i>	rs2076295
11p15.5	<i>MUC5B</i>	rs35705950
11p15.5	<i>TOLLIP</i>	rs5743890 rs5743894 rs111521887
17p13.1	<i>TP53</i>	rs13951053 rs12302273
17q21.31	<i>SPPL2C</i>	rs17690703
19q13.1	<i>TGF-β</i>	rs1800470

TABLEAU 2 PRINCIPAUX POLYMORPHISMES ASSOCIES A UNE MODIFICATION DU RISQUE RELATIF DE FPI D'APRES [213]

1.4 EPIGENETIQUE

Enfin des mécanismes de régulations épigénétiques pourraient expliquer certaines formes de fibroses pulmonaires familiales. La transmission de la taille des télomères discutée plus haut peut être considérée comme un mécanisme de transmission épigénétique.

La méthylation des gènes modifie leur transcription, cette méthylation qui varie en fonction des cellules, est influencée par des facteurs externes comme le tabac, mais pourrait être transmissibles d'une génération à l'autre [214]. Plusieurs études ont démontré des différences de méthylation corrélées à l'expression de de ces gènes au cours de la FPI [215]. Plus de 2000 gènes dont l'expression est modifiée au cours de la FPI ont ainsi été identifiés comme *CLDN5*, *ZNF467*, *TP53INP1*, ou *DDAH1*. Ces études ont ainsi démontré la modification de l'expression de nombreux gènes associés aux cils (*DNAI1*, *DNAH7* ou *DNAH6*) dans le poumon au cours de la FPI [216]. Cela démontre l'implication de la voie des cils dans la physiopathologie de la FPI. Cela suggère que la régulation épigénétique des gènes associés aux cils pourrait intervenir dans le risque de développer une fibrose pulmonaire chez les apparentés.

Par ailleurs d'autres facteurs de régulations épigénétiques comme les microARN ont été impliqués dans la FPI [217-219]. Les microARN sont des ARN non codant ayant une fonction de régulation de l'expression génique post transcriptionnelle et ciblent notamment certaines molécules impliquées dans les phénomènes de méthylation ou le TGF β . Ainsi l'expression des microARN 17~92 est réduite dans les poumons de FPI, dans les fibroblastes pulmonaires issus de FPI ou dans le modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, alors que la méthylation de leurs promoteurs est augmentée [217]. Les différences d'expression de certains microARN pourraient ouvrir la voie à de nouvelles perspectives thérapeutiques. Ainsi le traitement par 5'aza2'deoxytidine, une drogue bloquant la méthylation de l'ADN, réduit la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez la souris et augmente l'expression des microARN 17~92 [217].

1.5 MODELES ANIMAUX DE FIBROSE PULMONAIRE

Le modèle animal de fibrose pulmonaire le plus utilisé est un modèle de fibrose induite par la bléomycine [220]. Il s'agit d'un modèle d'agression aiguë et non répétée avec une évolution naturelle potentiellement favorable à la différence de la FPI. Les mutations du complexe télomérase sur ce modèle ont un impact pulmonaire variable notamment en fonction du gène et de la méthode d'inactivation de celui-ci.

Il n'est ainsi pas décrit de fibrose pulmonaire chez les souris KO pour le gène *TERT*. En effet les souris *TERT* $-/-$ et *TERT* $+/-$ présentent une diminution de leur espérance de vie liée à une atteinte digestive, hépatique et hématologique [221]. De plus les souris avec un KO conditionnel *TERT* sur les cellules mésenchymateuses présentent une diminution de la sensibilité pulmonaire à la bléomycine, l'activité télomérase est nécessaire à la sensibilité à la bléomycine [222]. Ainsi la transplantation de cellules souches sauvages à des souris *TERT* $-/-$ restaure la sensibilité pulmonaire à la bléomycine [223].

Deux équipes indépendantes ont démontré que les souris avec une inactivation conditionnelle de *TRF1* sur les pneumocytes de type 2 développaient une fibrose pulmonaire [224, 225]. Les souris présentent alors une réduction de l'espérance de vie et une fibrose pulmonaire pouvant être mise en évidence radiologiquement ou histologiquement. De plus les souris *TERC* $-/-$ sélectionnées après plusieurs générations pour présenter des télomères plus courts, pourraient présenter une sensibilité supérieure pulmonaire à la bléomycine [224]. Les souris invalidées pour *RTEL1* ne sont cependant pas viables [56]. Enfin les souris avec une mutation entraînant une perte de la partie C terminale de P53 présente une augmentation de l'activité de P53 qui entraîne une diminution de la transcription de *DKC1*, *RTEL1*, *TINF2* et *TERF1* et à un modèle murin de DKC avec fibrose pulmonaire et aplasie médullaire [226].

Il existe par ailleurs au moins deux espèces animales présentant naturellement une fibrose pulmonaire à un âge avancé : le chien de race West Highland White Terrier et l'âne [227, 228]. Chez

le chien, les anomalies scannographiques sont cependant surtout des opacités en verre dépoli, et l'aspect histologique n'est pas celui d'une PIC [229, 230]. Chez l'âne, la présentation est proche de la PPFH humaine [228].

OBJECTIF

Ce travail a eu pour objectif :

- D'identifier un nouveau gène associé aux fibroses pulmonaires familiales de l'adulte en ciblant plus particulièrement les mécanismes de réparation/protection des télomères
- De caractériser le phénotype des patients en fonction du gène muté

2 MATERIELS ET METHODES

2.1 PATIENTS

A ASPECTS ETHIQUES ET REGLEMENTAIRES

Tous les patients ont signé un consentement pour une analyse génétique qui était accompagnée par la fiche de renseignement remplie par le clinicien (annexe 1). La constitution et l'analyse de ces données a reçu un avis favorable du Comité d'Evaluation de l'Ethique des projets de Recherche Biomédicale Paris Nord (IRB 00006477) de l' HUPNVS, Université Paris 7 (CEERB, n°15-021), du Comité d'évaluation des Protocoles de Recherche Observationnelle (CEPRO, n°2015-020), et de la Commission National Informatique et liberté (CNIL n°916151).

B CRITERES D'INCLUSION

Le département de génétique du l'hôpital Bichat concentre depuis 2007 toutes les demandes de suspicion formes monogéniques de fibroses pulmonaires de l'adulte en France.

Toutes les demandes suivantes ont été considérées :

- formes familiales de fibrose ;
- suspicion de STC ;
- PID chronique idiopathique survenant avant l'âge de 50 ans.

Par définition tous les patients présentaient une PID. Les PID chroniques ont été incluses, y compris les formes secondaires dans les 2 premières catégories et quel que soit l'aspect histologique et radiologique de la PID dans les 3 catégories.

Il n'existe pas de définition consensuelle du STC. Le STC n'était pas défini par la taille des télomères. Nous avons proposé d'inclure les patients pour une suspicion de STC si le patient ou un apparenté au premier degré présentait :

- une maladie hématologique idiopathique suivante: macrocytose, thrombopénie, dysmyélopoïese, myélodysplasie, aplasie médullaire, leucémie aigüe ;
- une maladie hépatique idiopathique ou non, suivante : augmentation répétée des enzymes hépatiques, hypertension portale, hyperplasie nodulaire régénérative, cirrhose hépatique ;
- une atteinte cutanée suivante : canitie < 30 ans, dyskératose congénitale.

Au 1^{er} Janvier 2014, les données cliniques et génétiques de 263 cas index avaient été colligées et ont permis la réalisation de la deuxième publication incluse. Au 1^{er} janvier 2016, le laboratoire avait reçu 1354 demandes d'analyse génétique, dont 702 cas index pour suspicion de forme monogénique de fibrose pulmonaire.

C PHENOTYPE RECUEILLI

Tous les dossiers des patients ont été revus et les données suivantes ont été colligées :

- l'âge au diagnostic de PID, le sexe,
- le tabagisme et les expositions fibrogéniques,
- les antécédents familiaux de PID,
- les antécédents personnels et familiaux de maladies hématologiques, hépatiques ou cutanées évocatrices de STC,

- les EFR avec mesure de la capacité vitale forcée (CVF) et de la DL_{CO} exprimées en pourcentage des valeurs prédites selon les recommandations ERS au moment du diagnostic de PID [231].
- la numération formule sanguine, au moment du diagnostic de PID.
- le bilan hépatique, au moment du diagnostic de PID.
- l'aspect scannographique de la PID
- l'aspect histologique des biopsies pulmonaires chirurgicales lorsqu'elles sont disponibles.
- le recours à une transplantation pulmonaire au cours du suivi
- la date des dernières nouvelles et le statut vivant ou décédé du patient au moment du recueil des données.

Le diagnostic final retenu l'a été selon les recommandations internationales sur la FPI et les pneumopathies interstitielles idiopathiques en vigueur au moment de ce travail [3, 20].

2.2 ETUDES GENETIQUES

A CLASSIFICATION DES VARIANTS

La pathogénicité des variants est classée selon les recommandations européennes et américaines en 5 catégories principales) de bénin à pathogène (Tableau 3)[83].

	BENIN (B)		PATHOGENE (P)			
	Fort (S)	Secondaire (P)	Secondaire (P)	Modéré (M)	Fort (S)	Très Fort (VS)
Bases de données population générale	MAF trop fréquente dans la population contrôle/fréquence de la maladie BS1/2			Absent des bases de données de population générale PM2	Prévalence chez les malades statistiquement supérieures à celles des contrôles PS4	
Données prédictives <i>in silico</i>		Données multiples <i>in silico</i> en faveur du caractère bénin BP1-4 ou 7	Données multiples <i>in silico</i> en faveur du caractère pathogène PP3	Nouveau variant faux-sens sur un acide aminé avec un variant faux-sens déjà été décrit PM4 ou Variant changeant la longueur de la protéine PM5	Variant déjà décrit comme pathogène PS1	Variant responsable d'un codon stop prématuré sur un gène dont la perte de fonction est associée à la maladie PVS1
Données fonctionnelles	Données fonctionnelles ne montrant pas d'effet délétère BS3		Faux-sens dans un gène avec un taux de variants bénins faux-sens faible PP2	Zone chaude de mutation ou domaine fonctionnel sans variant bénin connu PM1	Données fonctionnelles montrant un effet délétère PS3	
Ségrégation phénotype-génotype	Pas de ségrégation entre le variant et le phénotype BS4		Co-ségrégation du génotype et du phénotype PP1	Augmentation des données de coségrégation →		
Néomutation				Néomutation sans confirmation de la paternité et la maternité PM6	Néomutation avec confirmation de la paternité et la maternité PS2	
Données alleliques		Variant en <i>trans</i> d'un variant dominant ou Variant en <i>cis</i> d'un variant pathogène BP2		Variant en <i>trans</i> d'un variant pathogène dans une maladie récessive PM3		
Autre base de données		Base de données personnelle en faveur du caractère bénin BP6	Base de données personnelle en faveur du caractère pathogène PP5			
Autres données		Observé dans un cas avec une cause alternative BP5	Phénotype du patient très spécifique de ce gène PP4			

TABLEAU 3 CRITERES UTILISES POUR CLASSER LE VARIANT, CHAQUE CRITERE EST QUALIFIE BENIN (B) OU PATHOGENE (P) ET DE SECONDAIRE (P), MODERE (M), FORT (S) A TRES FORT (VS). MAF FREQUENCE DE L'ALLELE MINEUR [83]. .

En pratique, le caractère pathogène des variants reposait sur les éléments suivants :

- absence du variant dans les bases de données de contrôles 1000 genome project ou EVS,
- prédiction du caractère pathogène *in silico* par les scores polyphen, CADD et splice,
- type de changement:
 - o mutation entraînant un codon stop prématuré,
 - o substitution d'un acide aminé conservé ou altération d'un site d'épissage,
- mesure de la taille des télomères,
- co-ségrégation génotype/phénotype dans la famille,
- description antérieure de la mutation ou présence dans notre base de données.

Les variants ont été classés selon à partir des critères ci-dessous selon les recommandations de l'*American College of Medical Genetics and Genomics* et de l'*Association for Molecular Pathology* [83].

Selon la proposition de ces recommandations, nous avons rajouté la catégorie variant de signification inconnue probablement pathogène :

Pathogène :

1) 1 critère très fort (PVS) et

- a) ≥ 1 critère fort (PS) ou
- b) ≥ 2 critères modérés (PM) ou
- c) 1 critère modéré (PM) et 1 critère secondaire (PP) ou
- d) ≥ 2 critères secondaires (PP)

2) ≥ 2 critères forts (PS) ou

3) 1 critère fort (PS) et

- a) ≥ 3 critères modérés (PM) ou
- b) 2 critères modérés (PM) et ≥ 2 critère secondaire (PP) ou
- c) 1 critère modéré (PM) et ≥ 4 critères secondaires (PP)

Probablement Pathogène

- 1) 1 critère fort (PS) et 1 critère modéré (PM) ou
- 2) 1 critère très fort (PVS) et 1-2 critères modérés (PM) ou
- 3) 1 critère fort (PF) et ≥ 2 critères secondaires (PP)
- 4) ≥ 3 critères modérés (PM)

- 5) 2 critères modérés (PM) et ≥ 2 critères secondaires (PP)
- 6) 1 critère modéré (PM) et ≥ 4 critères secondaires (PP)

Variant de signification inconnue probablement pathogène (VUSD)

- 1) 1 critère modéré (PM) and 3 critères secondaires (PP)

Bénin

- 1) ≥ 2 critères bénins forts (BS) ou
- 2) Fréquence du variant trop élevée pour la maladie

Probablement bénin

- 1) 1 Critère fort (BS) et 1 critère secondaire (BP)
- 2) ≥ 2 critères secondaires (BP).

B SEQUENÇAGE DE *TERT*, *TERC*, ET *RTEL1*

Tous les patients ont bénéficié d'un séquençage fluorescent des exons, des jonctions introns-exons et des régions promotrices des gènes *TERT* et *TERC* et ont été comparés à la séquence de référence NM_198253.2 pour *TERT* et NR_001566.1 pour *TERC*. Tous les séquençages ont été réalisés dans le laboratoire de génétique de l'hôpital Bichat et analysés par le Dr Caroline Kannengiesser.

Pour confirmer la présence d'une mutation de *RTEL1* identifiée par séquençage d'exome, les cas-index et tous les apparentés disponibles ont bénéficié d'un séquençage de *RTEL1* par séquençage bidirectionnel selon la méthode de Sanger en utilisant des primers fluorescents. Les séquences ont été comparées aux 2 transcrits humains principaux (isoforme de 1219 acides aminés :NM_016434.3/NP_057518.1 et isoforme de 1300 acides aminés: NM_032957.4/NP_116575.3), qui diffèrent par leurs exons 34 et 35 [232].

C SEQUENÇAGE D'EXOME

Le séquençage de l'exome a été réalisé par Otogenetics (Norcross, Georgia, USA), utilisant la technologie Agilent V5 et un séquenceur PE Illumina HiSeq2000 avec une profondeur estimée en moyenne à 50 X ou lectures. L'analyse bioinformatique (alignement et annotation) a été faite par l'équipe de bioinformatique de l'université Paris Descartes à Imagine (Patrick Nitschke) (alignement au génome humain de référence hg19 en utilisant la transformée de Burrows-Wheeler. L'appel des variants a été réalisé avec le génotypeur unifié GATK [233]. L'interrogation des variants

a été réalisée par le logiciel POLYWEB (Institut Imagine, Université Paris Descartes, Paris, France).

2.3 MESURE DE LA LONGUEUR DE TELOMERES

La mesure de la longueur des télomères a été réalisée en Southern Blot par le test de restriction de fragment télomérique (TRF). L'ADN génomique (800 ng) extrait des cellules sanguines circulantes est digéré par les enzymes *HinfI* and *RsaI*, révélé sur un gel d'agarose à 0,7% et transféré sur une membrane de nylon. L'hybridation a été réalisée en utilisant la solution EasyHyb (Roche) avec une sonde marquée γ -32P-(TTAGGG). Après rinçage, les membranes ont été lues avec un PhosphorImager. Les images obtenues ont été interprétées avec le programme ImageJ. Les données digitalisées a ensuite été transférée sous Microsoft Excel pour servir de base au calcul de la longueur moyenne des télomères en utilisant la formule longueur= (OD_i)/(OD_i/L_i), où OD_i = intensité du signal intégré à la position i and L_i = longueur des télomères à la position i [105].

2.4 EXPRESSION DE RTEL1

A QPCR RTEL1

Les tissus pulmonaires humains ont été congelés immédiatement après prélèvement : explant de transplantation pulmonaire ou biopsie pulmonaire chirurgicale. L'ensemble des ARNm des échantillons de tissus pulmonaire a été extrait avec l'utilisation du kit de purification Trizol Plus RNA (Invitrogen, Saint-Quentin Fallavier, France), et les ADNc ont été obtenus à partir de 2 µg d'ARN total avec l'utilisation de la transcriptase inverse du virus de leucémie murine Moloney (Invitrogen, Carlsbad, CA). Les ARNm des fibroblastes ont été extraits avec le kit NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel GmbH & Co., Düren, Germany). La transcription inverse utilisait 1 µg d'ARN total. La transcription de l'ubiquitine C (UBC) était utilisée comme contrôle. L'expression *RTEL1* et *d'UBC* était quantifiée par PCR en temps réel avec l'utilisation de la PCR ABI 7500 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) (tableau 4).

Gene	Séquences des primers	
	Forward	Reverse
UBC	5'-CACTTGGTCCTGCGCTTGA-3'	5'-TTTTTTGGGAATGCAACAACCTT-3'
RTEL1	5'- GGCAAGTCGCTCCTGTCATTT -3'	5'- GACCAAGTCCTCAATGTCCAG -3'

TABLEAU 4 SEQUENCES DES PRIMERS UTILISES POUR LA QPCR DE RTEL1 DESSINES POUR LES EXONS 5 ET 6

B IMMUNOHISTOCHIMIE RTEL1

Des sections tissulaires pulmonaires de 7 µm d'épaisseur initialement fixée en paraffine ont été déparaffinées et réhydratées. Le démasquage des épitopes antigénique a été réalisé dans un tampon citrate (acide citrique 1,8 mM, citrate de sodium 8,3 mM, pH 6) dans un bain aqueux de 40 min à 97°C. Le blocage du bruit de fond a été réalisé avec du BSA 3% (1h à température ambiante) et les lames ont été incubées avec l'anticorps maison anti RTEL1 une nuit à 4°C et révélée par le kit Vectastain ABC phosphatase alcaline (Vector) et le substrat rouge rapide (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) [232]. Pour vérifier la spécificité du marquage, les anticorps ont été omis ou remplacé par un contrôle matché sur l'isotype. Les images en microscopie optique ont été acquises avec l'utilisation d'un microscope Leica DM400B équipé d'une caméra Leica DFC420 CDD.

2.5 MODELISATION EN 3 DIMENSIONS

Des similitudes ont été cherchées entre l'extrémité N terminal de RTEL1 et les structures en 3 dimensions connues en utilisant le logiciel HH-PRED [234]. Un modèle en 3 dimensions de RTEL1 a été réalisé avec le logiciel en ligne I-TASSER [235], en utilisant *Thermoplasma acidophilum* XPD comme modèle (I-TASSER C-score -0.73). Les modèles de Faure et al et de Jullien et al. ont été utilisés pour le premier domaine harmonine et pour le domaine ARC [236, 237].

3 RESULTATS

3.1 MISE EN EVIDENCE DE L'IMPLICATION DE *RTEL1* DANS LES FIBROSES PULMONAIRES FAMILIALES

Nous avons mis en évidence l'implication de mutation de *RTEL1* dans les fibroses pulmonaires familiales. Ce travail a fait l'objet de la publication ci-après.

Kannengiesser C*, Borie R*, Ménard C, Réocreux M, Nitschké P, Gazal S, Mal H, Taillé C, Cadranel J, Nunes H, Valeyre D, Cordier JF, Callebaut I, Boileau C, Cottin V, Grandchamp B, Revy P, Crestani B. Heterozygous *RTEL1* mutations are associated with familial pulmonary fibrosis. **Eur Respir J.** 2015 Aug;46(2):474-85 [238].

Nous avons sélectionné 35 premières familles présentant une fibrose pulmonaire familiale pour lesquelles la recherche de mutation *TERT*, *TERC*, *ABCA3*, *SFTPB* et *SFTPC* était négative, malgré une probabilité élevée de mutation : âge jeune, ≥3 patients dans la famille, STC.

Nous avons réalisés une analyse d'exome pour 47 patients de ces 35 familles.

Nous avons utilisé plusieurs stratégies d'analyse :

- Exploration par gène candidats avec environ 100 gènes explorés à ce jour dont 60 ont pu être exclus sur les éléments génétiques ci-dessous.
- Recherche de variants rares sur un gène commun à plusieurs familles.

Le gène *RTEL1* venait d'être impliqué dans le syndrome HH et était donc un gène candidat. Indépendamment, 4 familles sur les 35 analysées présentaient des variants rares (c.146C>T; c.637C>T c.2890T>C et c.3493dupC) chez sur le gène *RTEL1* (Figure 1 de [238]).

Ces variants étaient absent des bases de données de contrôles (1000 genome project, EVS). Le type de changement (codon stop prématuré, substitution d'un acide aminé conservé), les prédictions *in silico* sont en faveur du caractère pathogène de ces variants.

La présence du variant était confirmée par séquençage par la méthode de Sanger et le variant co-ségrégait avec la maladie dans les familles

Nous avons modélisé en 3D la protéine et les variants entraînent probablement une modification structurale et fonctionnelle de la protéine: site de fixation à l'ATP ou à l'ADN. Le variant c.146C>T est associé à la modification p.Thr49Met qui est situé dans le motif hélicase au niveau du site de fixation à l'ATP et pourrait être responsable de la perte d'activité catalytique du domaine hélicase. Le variant c.637C>T est associé à la modification p.Arg213Trp situé dans l'hélice $\alpha 8$ au niveau du site catalytique de RTEL1 limitant probablement sa fixation à l'ADN. Le variant c.2890T>C associé à la modification p.Phe964Leu, qui est située dans la 5eme hélice α du premier domaine harmonine. Il est probablement responsable d'une modification de la capacité de plissement de la protéine (Figure 4 de [238]).

Nous avons mesuré la taille des télomères en Southern Blot qui étaient raccourcis par rapport à une population contrôle.

Nous avons mis en évidence des mutations hétérozygotes de *RTEL1* dans 11% d'une population de fibrose pulmonaire familiale inexplicée, correspondant alors à une nouvelle cause génétique majeure de fibrose pulmonaire familiale.

3.2 PREVALENCE ET PHENOTYPE DES MUTATIONS TERT ET TERC DE LA COHORTE FRANÇAISE (2008-2014)

La description de la cohorte, avec les prévalences des mutations de *TERT* et de *TERC* considérées comme pathogènes et le phénotype des patients mutés a fait l'objet de la publication ci-après.

Borie R, Tabèze L, Thabut G, Nunes H, Cottin V, Marchand-Adam S, Prevot G, Tazi A, Cadranel J, Mal H, Wemeau-Stervinou L, Bergeron Lafaurie A, Israel-Biet D, Picard C, Reynaud Gaubert M, Jouneau S, Naccache JM, Mankikian J, Ménard C, Revy P, Cordier JF, Valeyre D, Grandchamp B, Kannengiesser C, Crestani B. Prevalence and characteristics of *TERT* and *TERC* mutations in suspected genetic pulmonary fibrosis, **Eur Respir J**. 2016 Dec;48(6):1721-1731 [239].

Nous avons gelé la base du laboratoire de génétique de l'hôpital Bichat en 2014 pour analyser tous les patients présentant une fibrose pulmonaire qui avaient bénéficié d'un séquençage de *TERT* et de *TERC*. Entre 2007 et 2014, 237 cas-index ont bénéficié d'un séquençage de *TERT* et de *TERC*.

Quarante mutations (16,8%) ont été classés comme pathogènes (VUSD à pathogènes). L'indication du séquençage ; formes familiales de fibrose (n=153) ou STC sans fibrose familiale (n=84) ne modifiait pas le taux de mutation. Cependant la prévalence des mutations étaient plus faible dans le groupe fibrose familiale sans signe de STC (n=103, 8%) que dans le groupe fibrose pulmonaire familiale avec des signes personnels de STC (n=38, 45%) (Figure 1 de [239]).

Ainsi en analyse univariée, la présence d'anomalies hématologiques personnelles ou familiales (macrocytose, thrombopénie), d'anomalies hépatiques personnelles ou familiales, cutanées (canitie) étaient significativement associées à la présence d'une mutation (Table 2 de [239]). De plus, le nombre de patients atteints par famille, l'âge du cas index et un diagnostic pulmonaire différent de celui d'une FPI étaient aussi associés à la présence d'une mutation.

En analyse multivariée, la présence d'une canitie ($p=0,006$), d'une thrombopénie ($p=0,05$), d'une atteinte hépatique familiale ($p=0,01$) et le nombre d'apparentés avec une maladie pulmonaire ($p=0,004$) restaient significativement associés à la mise en évidence d'une mutation.

La médiane de survie sans transplantation pour la cohorte était de 6,3 ans (5,1-8,1 ans). La médiane de survie sans transplantation était plus faible pour les patients porteurs de mutations de *TERT* ou de *TERC* à 4.2 ans (2.9-∞), contre 7.2 (6.0-9.4) ans ($p=0,046$) (figure 3 de [239]). En analyse univariée, la présence d'une mutation de *TERT* ou de *TERC*, le sexe masculin, la CVF, la DLCO, la présence d'une macrocytose ou d'une thrombopénie étaient significativement associée à une diminution de la survie sans transplantation.

Nous avons ainsi pu mettre en évidence que la présence d'anomalies extra-pulmonaires étaient prédictives de la présence d'une mutation de *TERT* ou *TERC* dans les fibroses pulmonaires familiales, que les mutations de *TERT* et de *TERC* pouvaient être associées à des FPI mais aussi à des PID non-idiopathiques et que la présence de mutations de *TERT* ou de *TERC* était un marqueur indépendant du pronostic.

3.3 PHENOTYPE DES PATIENTS PORTEURS DE MUTATIONS HETEROZYGOTES DE *RTEL1* (NON PUBLIE)

Trois équipes ont confirmé l'implication de *RTEL1* dans 5-9% des fibroses pulmonaires familiales [238, 240, 241] Cependant les données phénotypiques étaient peu importantes. Nous avons donc voulu évaluer le phénotype des patients présentant une mutation hétérozygote de *RTEL1* en la comparant au patients porteurs de mutations *TERT* ou *TERC*.

A METHODES

Nous avons initialement réalisé un séquençage d'exome pour 35 familles permettant la découverte de 4 mutations différentes [238]. Parallèlement, dans le cadre d'une collaboration nationale organisée par le service de rhumatologie de l'hôpital Bichat, une analyse d'exome a été réalisée à 101 patients consécutifs atteints d'une PID associée à une polyarthrite rhumatoïde (PR-PID) vus entre 2013 et 2015, et a permis de découvrir 3 nouvelles mutations de *RTEL1* [242] Enfin, nous avons réalisé une deuxième série d'analyse d'exome chez 75 familles supplémentaires sans mutation *TERT* ou *TERC*.

Les méthodes de séquençage et d'analyse de l'exome, et statistique étaient identiques à celle utilisées précédemment.

B RESULTATS

PATIENTS

Sur les 75 nouvelles familles séquencées, nous avons identifié 12 nouvelles familles avec une PID et une mutation hétérozygote de *RTEL1*. Une famille a été exclue de l'analyse car la mutation ne ségrégait pas avec le phénotype (PID). Nous avons colligé les données des 4 familles issues du premier séquençage d'exome et les nouvelles familles identifiées. Trente-cinq patients avec une PID ont été identifiés, et l'ADN était disponible pour 25 (tableau 5, figure 11)[238, 242].

Position nucléotidique du variant sur le cDNA	Position protéique du variant	Présence dans base de données ExAC et Fréquence	Score de Prediction			Nombres de patient/génération impliqués	Longueur Telomeres, kb	Atteinte hématologique ou hépatique
			Sift	Poly-phen	CADD (PHRED)			
c.146C>T	p.Thr49Met	NR	1	Del	28,4	3/2	4,5-5	Neutropénie (2)
c.146C>T	p.Thr49Met	NR	1	Del	28,4	2/2		Cirrhose OH (1)
c.637C>T	p.Arg213Trp	NR	1	Del	35	2/2	7,6	
c.1228_1266+39del78 c.1266+3A>G	Epissage	NR	NA	NA	32	5/1		
c.2266-1G>C	Epissage	NR	NA	NA	22	3/2		
c.2695T>C	p.Phe899Leu			Del	25,3	1/1	5,3	
c.2824G>A	p.Asp942Asn	0,0002		Tol	22,3	1/1	5,3	
c.2869C>T £	p.Arg957Trp	NR			33	3/2		Cirrhose OH (1) Thalassemie (2)
c.2875C>T	p.His959Tyr	NR		Del	15,3	1/1	8,4	
c.2890T>C	p.Phe964Leu	NR	0,77	Del	12,9	2/1	5,7	
c.2890T>C	p.Phe964Leu	NR	0,77	Del	12,9	1/1	5,9	Thrombopénie (1)
c.2896del	p.Glu966Argfs*	NR	NA	NA	29,9	3/2		Anémie hémolytique auto-immune
c.2956C>T £	p.Arg986*	8.10 ⁻⁵	NA	NA	35	1/1		
c.2956C>T £	p.Arg986*	8.10 ⁻⁵	NA	NA	35	1/1		Macrocytose, thrombopenie et pancytopenie post transplantation (1)
c.2956C>T £	p.Arg986*	8.10 ⁻⁵	NA	NA	35	2/2		
c.3420C>A	p.Trp1140*	NR	D	D	35	2/1		Cirrhose OH et HCV (1)
c.3493dupC	p.Gln1165Profs*22	NR	NA	NA	25	2/2	5,4-5,4	Hépatite auto-immune (1) Leucémie aiguë(1)
c.3556_3559de IAGAC	p.Gln1187Glyfs*176	NR	NA	NA	11.35	5/3		

TABLEAU 5 MUTATIONS RTEL1 RETENUES COMME PATHOGENES. OH ALCOOLIQUE, ANCA ANTICORPS ANTICYTOPLASME DES POLYNUCLEAIRES, HCV HEPATITE C, DEL DELETERE, TOL TOLEREE, NA NON APPLICABLE. NR NON REPORTE. £ PRECEDEMMENT RAPPORTEE [238, 243, 244]

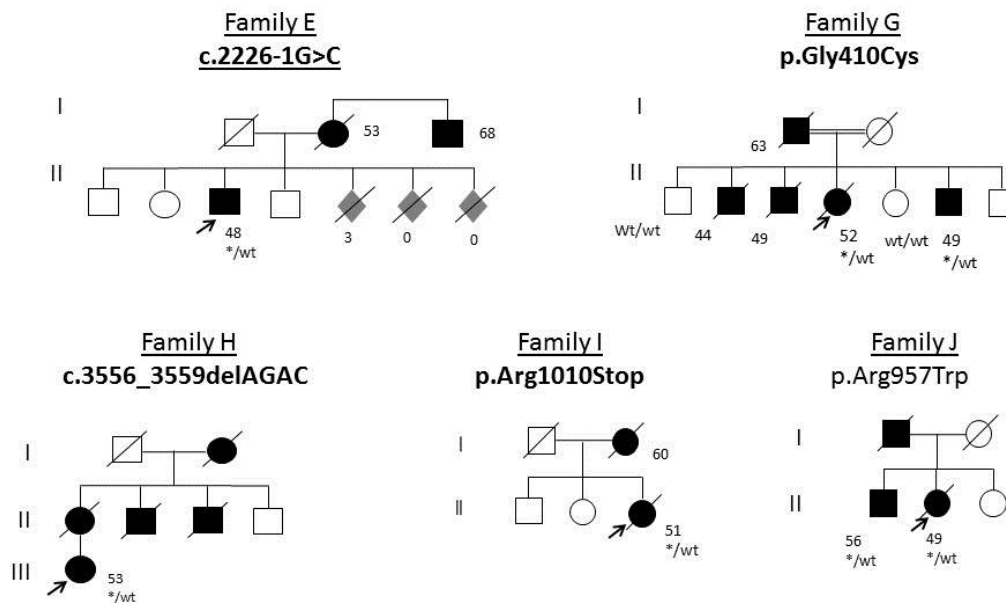


FIGURE 11 ARBRE GENEALOGIQUE DE 5 NOUVELLES MUTATIONS HETEROZYGOTE DE *RTEL1* A ETE MISE EN EVIDENCE. LES CHIFFRES CORRESPONDENT A L'AGE DE DIAGNOSTIC DE LA PID. LES ANALYSES GENETIQUES SONT INDIQUEES QUAND DISPONIBLES : WT/WT PAS DE MUTATION MISE EN EVIDENCE ; */WT MUTATION HETEROZYGOTE. EN NOIR LES PATIENTS PRESENTANT UNE PID. EN GRIS LE PHENOTYPE N'A PAS ETE CONFIRME.

ATTEINTE PULMONAIRE

L'âge moyen au diagnostic de la PID était de 55,2 ans [28,0-80,6] avec une prédominance masculine (21 hommes/14 femmes) (Tableau 6). L'âge moyen au diagnostic de la PID tendait à être plus jeune pour les patients de la 2nde génération que ceux de la 1^{ere} sans atteindre la significativité statistique (51,7 ans vs 57,8 ans, $p=0,12$). Vingt-cinq patients étaient fumeurs actifs ou sevrés y compris 2 patients avec un tabagisme <5 paquets-années. Dix patients étaient considérés comme ayant une exposition inhalée fibrogénique : oiseaux (n=4), cocaïne (n=1), sable (n=2), solvant (n=1), foin (n=1), poussières métalliques (n=1). Une patiente avait reçu une radiothérapie pour un cancer du sein quelques mois avant le diagnostic de la PID. Seuls 6 patients (17%) n'avaient ni fumé et ni reçu une exposition pouvant être considéré comme associée à la PID.

Nombre de patients	35
Age au diagnostic de la PID	55,2 [28,0-80,6]
Femme (%)	14 (40,0%)
Expositions	
Tabagisme	25 (71,4%)
Exposition fibrogenique	11 (31,4%)
Tabac ou exposition fibrogenique	29 (82,8%)
Nombre de PID par famille	3,0 [1-5]
Epreuves fonctionnelles respiratoires:	
CVF (% pred.)	75 [36-128]
DLCO (% pred.)	61 [28-112]
Aspect du scanner	
PIC ou PIC possible	26 (74,2%)
Incompatible avec une PIC	5 (14,2%)
Aspect histologique	
PIC	7
PINS	2
Pneumoconiose	1
Diagnostic Pulmonaire	
FPI *	20 (57%)
CTD-PID	4 (11,4%)
PISA	3 (5,8%)
Fibrose inclassable	4 (11,4%)
PHS	2 (5,7%)
Sarcoïdose	1 (2,8%)
Pneumoconiose	1 (2,8%)

TABLEAU 6 PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DES 35 PATIENTS AVEC UNE PID ET UNE MUTATION DE RTEL1. CTD-PID PID ASSOCIEE A UNE CONNECTIVITE. PISA PNEUMONIE INTERSTITIELLE AVEC AUTO-IMMUNITE

Une relecture du scanner a pu être réalisée chez 31 patients (88%), et le scanner classé comme PIC (n=17, 48,5%), PIC possible (n=9, 25,7%), incompatible avec une PIC (n=5, 14,2%). Parmi ces 5 patients, l'aspect du scanner suggérait une PINS (n=3), une sarcoïdose (n=1) ou une pneumoconiose (n=1), mais aucun ne faisait évoquer une PPFE. Six patients (17,1%) présentaient un emphysème associé.

Une biopsie pulmonaire était disponible pour 10 patients après une biopsie pulmonaire chirurgicale (n=8) et/ou après une transplantation pulmonaire (n=4). L'aspect histologique était une PIC pour 7 patients, tous avec un aspect scannographique de PIC ou de PIC possible. L'aspect histologique était celui d'une PINS pour 2 patients dont 1 avec aspect associé de DIP. Les 2 patients avaient un aspect du scanner incompatible avec une PIC. Un patient avait un aspect histologique de

pneumoconiose et présentait une charge élevée en MICA dans le poumon. De manière notable, 3 patients de 3 familles différentes avaient présenté initialement des adénopathies médiastinales faisant évoquer une sarcoïdose qui avait été confirmée par une histologie retrouvant du granulome pour 2 patients. Un de ces patients a ensuite présenté un aspect de PIC possible scannographique avec une régression des adénopathies, la PIC n'a pas été confirmée par l'histologie. L'autre patient a finalement bénéficié d'une transplantation pulmonaire sans aucun granulome sur l'explant.

Le diagnostic final était FPI ou possible FPI en l'absence d'histologie (n=20, 57%), PR-PID (n=4, 18%), PID associée à une hépatite auto-immune (n=1, 4%), PINS avec la présence d'ANCA (n=1, 4%), pneumonie interstitielle avec auto-immunité (PISA, n=1) PHS chronique (n=2, 7%), sarcoïdose (n=1, 4%), pneumoconiose (n=1), fibrose non classée (n=4, 18%).

ATTEINTE EXTRA-PULMONAIRE

Huit patients présentaient une canitie précoce <35 ans (22,8%), sans signes cutanés de DKC. Une patiente décrivait des difficultés à tomber enceinte alors que les 34 autres patients avaient au moins 1 enfant. Un patient présentait des anomalies du squelette, mais ni sa mère, ni ses filles, toutes porteuses de la mutation ne présentaient d'anomalie squelettique. Quatre patients présentaient des douleurs articulaires et le diagnostic de PR était finalement porté.

La numération formule sanguine et le bilan hépatique étaient disponibles pour 32 patients. Quatre patients (12,5%) présentaient une thrombopénie et 5 (15,6%), une macrocytose. Les patients avec une mutation hétérozygote de *RTEL1*, présentaient moins fréquemment une thrombopénie ou une macrocytose que les patients porteurs d'une mutation *TERT* (p=0,004 et p=0,03, respectivement), et moins fréquemment une thrombopénie que les patients porteurs d'une mutation de *TERC* (p=0,05, figure 12). Quatre patients ont présenté des maladies hématologiques: agranulocytose temporaire après cyclophosphamide (n=2), leucémie aigüe (n=1), pancytopenie post transplantation pulmonaire. Autant que nous le sachions, aucun apparenté n'a présenté de pathologie hématologique sans PID.

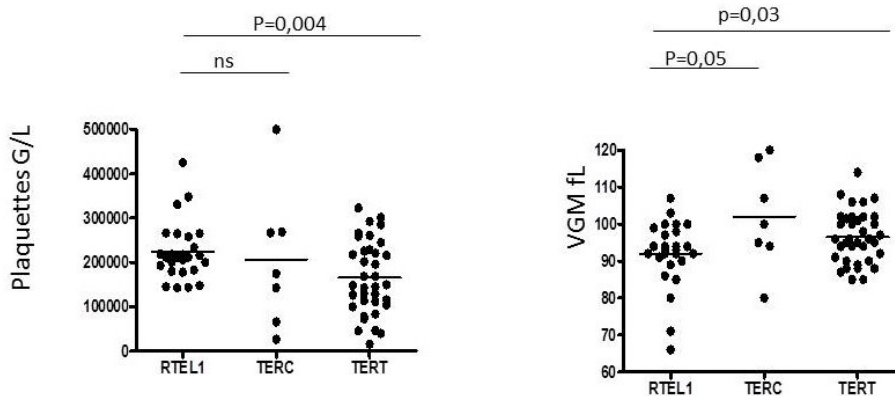


FIGURE 12 TAUX DE PLAQUETTES ET VGM AU DIAGNOSTIC DE LA PID CHEZ LES PATIENTS PORTEURS D'UNE MUTATION DE *RTEL1*, DE *TERC* OU DE *TERT*.

Quatre patients présentaient une augmentation des enzymes hépatiques (12,5%), les diagnostics retenus étaient : hépatite auto-immune (n=1), cirrhose hépatique post alcoolique (n=1), cirrhose hépatique post alcoolique et virale due à l'hépatite C (n=1) et steatohépatite non alcoolique (n=1). Un patient a reçu une transplantation hépatique et a présenté une fibrose pulmonaire 10 ans après, sans pathologie hématologique. Il est décédé d'insuffisance respiratoire 12 ans après la transplantation hépatique. Aucun patient n'a présenté de syndrome hépatopulmonaire. Autant que nous le sachions, aucun apparenté n'a présenté de pathologie hépatique sans PID.

Un patient a présenté un cancer du poumon et une autre un cancer du sein.

EVOLUTION ET SURVIE

Vingt-huit patients ont reçu un traitement pour la maladie pulmonaire. Une évaluation de chaque traitement n'est pas réalisable en raison de nombreuses données d'EFR manquantes. Cependant 4 patients ont présenté une amélioration respiratoire après corticothérapie mise en évidence par les EFR ou la diminution des besoins en oxygène : 2 patients avec une PINS et 2 patients avec une exacerbation aigüe de FPI. Tous les autres patients ont présenté une aggravation respiratoire progressive quel que soit le traitement. Le déclin moyen de la CVF était de 140 mL /an (4,5% de la théorique) (Figure 13).

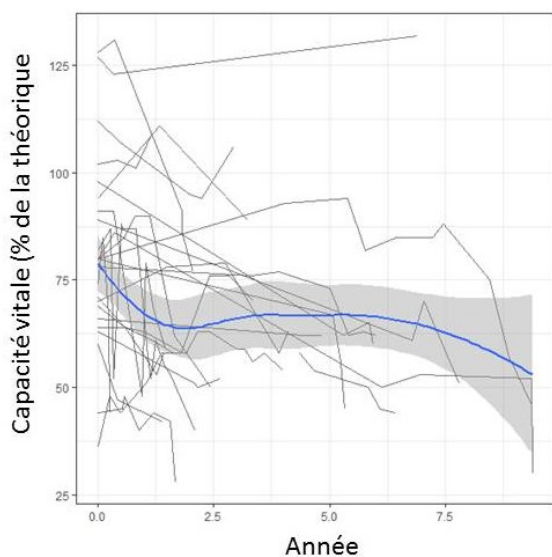


FIGURE 13 EVOLUTION DE LA CAPACITE VITALE APRES LE DIAGNOSTIC DE LA PID ASSOCIEE A UNE MUTATION *RTEL1*.

Deux patients de la même famille ont présenté une agranulocytose après avoir reçu du cyclophosphamide. Cependant 4 autres patients ont reçu du cyclophosphamide sans toxicité hématologique. Quatre patients ont reçu une transplantation pulmonaire avec un traitement immunosuppresseur par prednisone, mycophenolate mofetil et tacrolimus. Un patient a présenté un rejet chronique et a reçu une nouvelle transplantation pulmonaire. Il a présenté à nouveau un rejet chronique et est finalement décédé d'insuffisance respiratoire 50 mois après la première transplantation. Une patiente qui présentait une macrocytose et une thrombopénie au diagnostic de la PID a présenté une pancytopénie après la transplantation pulmonaire. Elle est décédée d'hémorragie digestive attribuable à la thrombopénie. Deux patients sont toujours en vie 35 et 47 mois après la transplantation avec une fonction respiratoire conservée.

Vingt-cinq patients sont décédés. La médiane de survie globale est de 45,2 mois et la médiane de survie sans transplantation est 39,2 mois (Figure 14). Un décès a été considéré comme secondaire à un cancer du poumon alors que le patient présentait une insuffisance respiratoire. Une patiente est décédée des complications hématologiques post transplantation.

Tous les autres décès (n=23) ont été considérés comme secondaires à la fibrose pulmonaire. En analyse univariée la CVF était le seul facteur associé à une diminution de la survie sans transplantation (tableau 7, p=0,009)

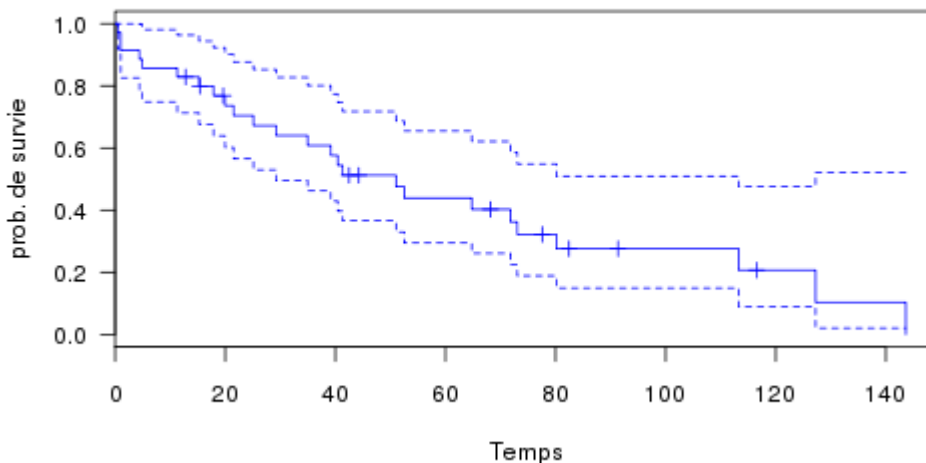


FIGURE 14 SURVIE SANS TRANSPLANTATION APRES LE DIAGNOSTIC DE PID CHEZ LES PATIENTS MUTES *RTEL1*

<i>Variable</i>	<i>Hazard Ratio (CI 95%)</i>	<i>p</i>
Age	1,03 (0,97-1,09)	0,34
Tabagisme	1,04 (0,82-1,32)	0,74
Generation	1,98 (0,62-6,36)	0,25
Aspect du scanner		
- PIC/ PIC Possible	0,66 (0,13-3,27)	0,61
Diagnostic de FPI	2,11 (0,78-5,69)	0,14
Cancer du poumon	0,00000004 (0-∞)	0,99
CVF	0,88 (0,80-0,97)	0,009
DLCO	0,96 (0,87-1,05)	0,36

TABEAU 7 ANALYSE UNIVARIEE DES FACTEURS ASSOCIES A LA SURVIE SANS TRANSPLANTATION

GENETIQUE ET MODELISATION EN 3 DIMENSIONS

Parmi les 5 nouvelles mutations (Tableau 5), 2 sont responsables d'un codon stop prématuré (c.2656_3559delAGAC et c.3028C>T), et une modifie le site d'épissage (c.2266-1G> C). Les deux autres sont des mutations faux-sens (p.Gly410Cys and p.Arg957Trp), dont une a déjà été rapportée comme pathogène (p.Arg957Trp) [243].

RTEL1 est une hélicase critique pour la maintenance des télomères et la réparation de l'ADN. p.Gly410Cys est située dans le domaine ARCH de l'hélicase est prédit pour interagir avec les acides nucléiques, une étape essentielle de la réparation de l'ADN (Figure 15). p.Arg957Trp est situé dans la boucle α 4- α 5 du domaine harmonine 1, exposé aux solvants, prédit pour interagir avec un ligand pour l'instant inconnu de RTEL1.

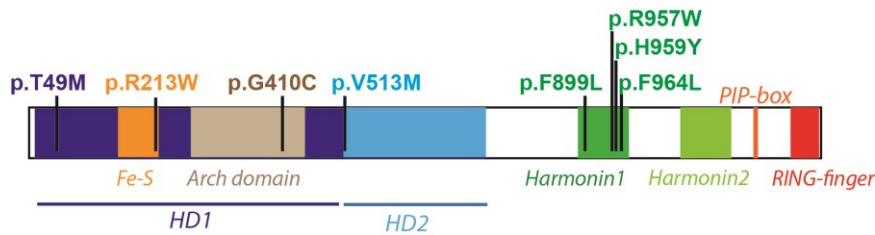


FIGURE 15 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA POSITION DES MUTATIONS

EXPRESSION PULMONAIRE DE RTEL1

Nous avons évalué l'expression de l'ARNm de RTEL1 par QPCR sur poumon total. L'expression de RTEL1 n'était pas différente entre les poumons sains, les FPI sporadiques ou dans les fibroses pulmonaires associées à une mutation de *RTEL1* (Figure 16). L'expression de l'ARNm de RTEL1 tendait à être plus faible dans les poumons de patients porteurs de mutations *TERT* ou *RTEL1*.

L'analyse en immunohistochimie permettait la détection de RTEL1 dans les poumons sains (n=3) : dans les cellules épithéliales bronchiques, les macrophages alvéolaires et les pneumocytes de type 2 (Figure 16). Dans les poumons fibrotiques (n=11), RTEL1 était exprimé dans les cellules épithéliales bronchiques, les macrophages alvéolaires, les pneumocytes de type 2 et les lymphocytes en particulier dans les follicules lymphoïdes. RTEL1 était localisé dans le noyau de ces cellules. RTEL1 n'était exprimé ni par les fibroblastes ni par les cellules endothéliales. L'expression de RTEL1 a été évaluée en analyse semi-quantitative visuelle en insu de la présence de la mutation. L'expression de RTEL1 ne différait pas entre les poumons de patients porteurs de mutations *RTEL1* (n=3), *TERT* (n=3) ou atteint de FPI sans mutation identifiée (n=5).

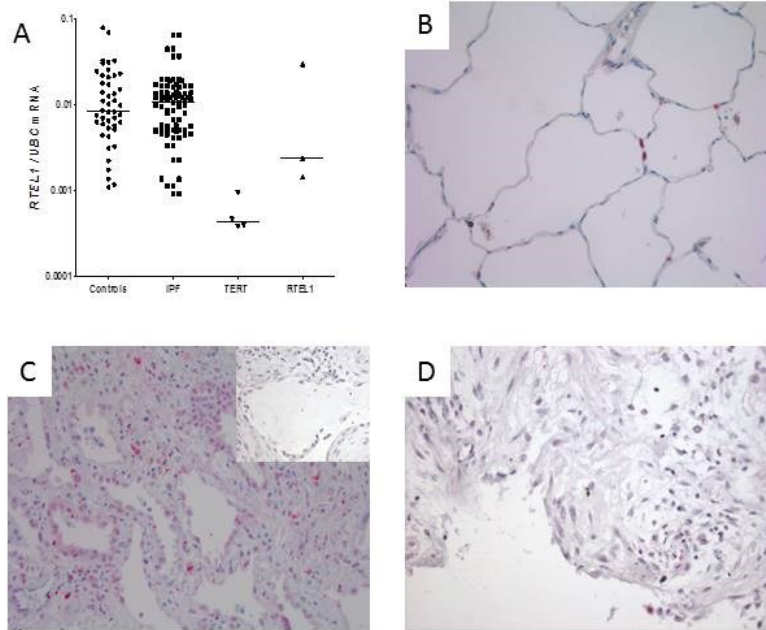


FIGURE 16 (A) EXPRESSION PULMONAIRE DE L'ARNM DE *RTEL1* DANS DES POUMONS SAINS, DES FPI SPORADIQUES, DES FIBROSES PULMONAIRES ASSOCIEES A UNE MUTATION *TERT* ET DES FIBROSES PULMONAIRES ASSOCIEES A UNE MUTATION *RTEL1*. IMMUNOMARQUAGE DE *RTEL1* SUR (B) POUMON SAIN (B) FIBROSE PULMONAIRE ASSOCIEE A UNE MUTATION HETEROZYGOTE DE *RTEL1*, ET CONTROLE DE L'ISOTYPE (INSERT) (D) FOYER FIBROBLASTIQUE.

3.4 COLLABORATIONS

A EXTENSION DES RESULTATS DANS UNE COHORTE DE PNEUMOPATHIE INTERSTITIELLE DIFFUSE NON IDIOPATHIQUE

Ce travail de thèse nous a permis de mettre en évidence des mutations de *TERT* ou *RTEL1* chez des patients atteints de PID secondaires en particuliers à des maladies systémiques. Dans le cadre d'une collaboration nationale organisée par le service de rhumatologie de l'hôpital Bichat, une analyse d'exome a été réalisée à 101 patients consécutifs atteints d'une PID associée à une polyarthrite rhumatoïde (PR-PID) vus entre 2013 et 2015. Douze patients (11,9%) présentaient une mutation hétérozygote d'un de ces gènes : de *TERT* (n=6), de *RTEL1* (n=4), de *PARN* (n=1) ou de *SFTPC* (n=2) (table 2, [242]). En effet un patient présentait une mutation dans *SFTPC* (c.218T>C, p.Ile73Thr) et une mutation dans *TERT* (c.1234C>T, p.His412Tyr).

L'âge moyen au diagnostic de la PID était plus jeune pour les patients porteurs de mutations (53,2 ans) qu'en l'absence de mutation (62,5 ans, p=0,015). L'analyse statistique supportait une association non linéaire entre l'âge de diagnostic de la PID et la présence d'une mutation, les patients de 36-41 ans étant les plus associés à la présence d'une mutation. Seuls 3 des 12 patients (25%) présentaient une fibrose pulmonaire familiale connue. Les télomères des patients porteurs d'une mutation de *TERT*, *RTEL1* ou *PARN* étaient significativement plus courts que ceux des contrôles (p=2,87x10⁻²). Les patients porteurs de mutations de *TERT*, *RTEL1* ou *PARN* ne présentaient pas d'autre signe de STC (macrocytose, thrombocytopenie, ou hépatopathie). Ce travail a été accepté pour publication en 2017[242] (annexe2).

B COLLABORATION AVEC LE LABORATOIRE DE GENETIQUE DE L'HOPITAL TROUSSEAU

Dans le cadre d'une collaboration entre les laboratoires de génétique de l'hôpital Trousseau et l'hôpital Bichat, il avait été décidé de concentrer les recherches sur les gènes du surfactant pour Trousseau et sur les gènes du complexe télomérase pour Bichat.

L'équipe du Prof Amselem a pu découvrir et démontrer l'implication d'un nouveau gène *SFTPA1* dans une famille présentant des fibroses pulmonaires et des cancers bronchiques adultes et pédiatriques [145].

La prévalence et le phénotype des patients atteints de mutations du complexe du surfactant a été présenté au congrès de l'ATS, et l'article est en cours de rédaction [245].

Le phénotype des patients atteints de mutations de *NKX2.1* a été rapporté sous forme de cas clinique [173] et un article original décrivant le phénotype pulmonaire de 15 patients a été soumise.

4 DISCUSSION DES RESULTATS

Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence (1) un nouveau gène, *RTEL1*, associés aux fibroses pulmonaires familiales, (2) l'hétérogénéité des fibroses pulmonaires familiales et démontrer que le phénotype était prédictif de la présence d'une mutation *TERT* ou *TERC* (3) l'hétérogénéité non seulement des phénotypes mais aussi de l'évolution des patients atteints de PID associées à une mutation de *RTEL1*.

4.1 PHENOTYPE DES PID ASSOCIEES AUX MUTATIONS DU COMPLEXE TELOMERASE

A MUTATION *TERT* ET *TERC*

Dans la cohorte initiale, 41,8% des cas index avec une PID de mutation *TERT* ou *TERC* présentent une macrocytose, 48,8% une thrombopénie et 37,2% des anomalies hépatiques toutes prédictives de mutations *TERT* ou *TERC*. Ces résultats étaient prévisibles car la prévalence des anomalies hématologiques était par exemple de 16,2% dans la série de Diaz de Leon et al., dont 13,4% d'anémie et 3,0% de myélodysplasie, et 8,2% présentaient une augmentation des enzymes hépatiques [89]. Ainsi la co-existence d'une fibrose pulmonaire et d'une insuffisance médullaire chez un même individu ou dans une famille avait été montrée comme prédictive de la présence d'une mutation *TERT* ou *TERC* [116]. De plus des mutations de *TERT* ou de *TERC* avaient été associées à des cirrhoses cryptogéniques [118]. Cependant avant notre étude et le travail rapporté concomitamment par l'équipe de Christine Garcia le taux de thrombopénie et de macrocytose n'avait pas été rapporté chez les patients présentant une PID et porteurs d'une mutation de *TERT* ou de *TERC*. De fait Newton et al. ont rapporté une prévalence relativement identiques des atteintes hépatiques ou hématologiques chez les patients porteurs de mutations *TERT*: 26,7% d'anémie, 25,3% de macrocytose, 9,3% de thrombopénie et 4,0% d'augmentation des enzymes hépatiques [246]. Les patients porteurs d'une mutation *TERC* semblaient présenter plus fréquemment des atteintes hématologiques avec 71,4% d'anémie. Cependant le faible nombre de patients présentant

une mutation *TERC* (n=7) associée à une fibrose pulmonaire ne permettait pas de mettre en évidence une différence significative (p=0,09).

Nous avons mis en évidence un taux de 18,4% de mutations de *TERT* ou *TERC* dans les fibroses pulmonaires familiales ce qui est un taux similaire aux études précédentes (8-13%) [11, 12]. Une étude récente a mis évidence après séquençage d'exome, 11.3% de variant rares *TERT*, *RTEL1* ou *PARN* dans une population de fibroses pulmonaires sporadique [247]. Il s'agissait cependant d'une cohorte de patients ayant reçu une transplantation pulmonaire à un âge moyen de 63,2 ans dont le phénotype extra-pulmonaire personnel ou familial est inconnu. Ces résultats ne peuvent donc pas être extrapolés et ne permettent pas de justifier une analyse génétique à l'ensemble d'une cohorte de FPI sporadique en moyenne plus âgée d'au moins 5 ans, en l'absence d'anomalie hématologiques ou hépatiques.

Nous avons inclus tous les patients présentant une PID qu'elles soient idiopathiques ou secondaires. Ainsi 6 des 43 premiers patients avec une mutation *TERT* ou *TERC* présentaient une PID non-idiopathique. Ce taux est relativement similaire à celui rapporté récemment par Newton et al. de 20,8% de PID non idiopathiques: 11,7% de PHS chroniques, 2,6% de PID associées à une connectivite et 6,5% de PISA [246]. Cela confirme que la PID non idiopathique et la FPI pouvaient partager un cause génétique commune [25, 89, 126, 238, 241]. Ces travaux démontrent que les PID non idiopathiques peuvent justifier d'une analyse génétique en particulier en présence d'une forme familiale ou d'un STC.

Environ 2/3 des patients porteurs d'une mutation *TERT* ou *TERC* présentent un tabagisme ou une exposition fibrogénique. Dans une cohorte américaine de 134 patients issus de 21 familles avec une mutation de *TERT*, quasiment tous les patients avec une PID (96%) présentaient une telle exposition [89]. Il a ainsi été rapporté une augmentation du risque de développer une cirrhose chez les patients porteurs d'une mutation *TERT* à consommation alcoolique égale [118, 120]. De plus dans une cohorte de 132 cas de cirrhoses avec une étiologie connue (alcool, hépatite virale...), dix

patients étaient porteurs d'une mutation *TERT* ou *TERC* [118, 120]. Enfin les patients porteurs de mutation *TERT* ou *TERC* mutation présentent des complications hématologiques sévères après transplantation pulmonaire et l'utilisation de drogues cytotoxiques [125, 126, 248]. Ceci démontre l'importance des interactions gènes –environnement chez les patients porteurs de mutations du complexe télomérase.

B MUTATIONS DE *RTEL1*

Les données actuellement disponibles sur le phénotype des patients atteints d'une PID associées à une mutation *RTEL1* sont très peu importantes (tableau 8). Ainsi en 2015, deux équipes américaines ont mis en évidence des mutations hétérozygotes de *RTEL1* chez 9 des 188 (4,7%) et 5 des 99 (5,0%) familles explorées en exome [238, 240, 241]. Au total 66 patients était rapportés, mais la description du phénotype était limitée. L'âge moyen des patients était de 65 ans. Environ 2/3 des patients présentaient une FPI. Un seul patient avec une macrocytose et une thrombopénie était rapporté. Une des 2 équipes a récemment complété la description du phénotype de 14 patients mutés *RTEL1* [246]. L'âge au diagnostic était de 60 ans avec 57% d'homme et 50% d'ex-fumeurs. Les diagnostics pulmonaires étaient FPI (n=3), PPFE (n=2), fibrose inclassable (n=3), et PISA (n=1). A la différence des patients avec une mutation de *TERC*, aucun de ces patients ne présentait de thrombopénie ou de myélodysplasie (p=0,01 et p=0,04, respectivement).

Auteurs	<i>Cogan et al. [240]</i>	<i>Stuart et al.*[241]</i>	<i>Newton et al.*[246]</i>	<i>Petrovski et al.[247]</i>	<i>Cette série (incluant [238])</i>
			Laboratoire de Christine Garcia		
Fréquence dans les familles	9/188	5/99	<7/64	6/262**	15/110
Nombre de patients	47	17	14	10	35
Age au diagnostic, (ans)	64,8	65,7	60,0		55,2
Garçons (%)	28 (29,5%)	7 (41,1%)	8 (57,1%)	8 (80%)	21 (60,0%)
Anticipation	Inc	Oui	Oui	Inc	Peut-être
Tabac ou exposition fibrogenique	>19 (38,8%)	63,6%	>50%	Inc	29 (82,8%)
Diagnostic					
FPI *	67%	>50%	3 (30%)	10 (100%)	20 (57%)
PISA ou CTD-PID	Inc	Inc	1 (10%)	0	7 (17,4%)
Fibrose inclassable	Inc	Inc	3 (30%)	0	4 (11,4%)
PHS	Inc	Inc	1 (10%)	0	4 (5,7%)
Sarcoidose	Inc	Inc	0	0	1 (2,8%)
Pneumoconiose	Inc	Inc	0	0	1 (2,8%)
PPFE	Inc		2 (20%)	0	0 (0%)
Cancer bronchique	Inc	2	2 (14,3%)	0	1
Atteinte hématologique	0	4 (23,5%)	Inc	Inc	7 (20,0%)
Thrombopenie		1 (5,8%)	0 (0%)		4 (11,4%)
Macrocytose		2 (11,6%)	4 (28,6%)		5 (14,2%)
Anemie		2 (11,6%)	3 (21,2%)		5 (14,2%)
Atteinte hépatique	Inc	1 (5,8%)	1 (7,1%)	Inc	4 (11,4%)

TABLEAU 8 PATIENTS ATTEINTS DE PID ET PORTEURS D'UNE MUTATION DE RTEL1 RAPPORTES. INC INCONNU, CTD CONNECTIVITE ; * DE NOMBREUX PATIENTS ONT ETE INCLUS DANS LES 2 SERIE ; INCLUANT DES PID SPORADIQUES.**

Les patients présentant une mutation de *RTEL1*, présenterait une fréquence plus faible des manifestations hématologiques. Cependant plusieurs patients de notre série ont présenté des manifestations hématologiques graves. Une patiente porteuse d'une mutation entrainant un codon stop prématuré a présenté des complications hématologiques après la transplantation pulmonaire semblables à celles rapportées avec des mutations *TERT* ou *TERC* [125, 126]. Aucun des 3 autres patients n'a présenté de complications hématologiques inhabituelles. A défaut de la mise en oeuvre d'un test fonctionnel, certaines mutations (codon stop, décalage du cadre de lecture), pourraient être associées à un phénotype plus sévère.

Les résultats observés confirment les interactions entre gènes et environnement. La dernière observation illustre la possible augmentation de la cytotoxicité de certaines drogues après

la transplantation pulmonaire. Le taux de tabagisme ou d'exposition à des pneumotoxiques était de 71,7% dans la cohorte de patients présentant une mutation de *TERT* ou de *TERC* et de 82,8% dans la cohorte de patients mutés *RTEL1*. Les atteintes hépatiques du STC pourraient aussi résulter d'interactions entre les anomalies génétiques et l'environnement. Ainsi les 4 patients présentant une hépatopathie associée à une mutation *RTEL1* présentaient a priori une cause connue d'hépatopathie : hépatite auto-immune, alcool, hépatite C ou surpoids.

En plus du tabac, la proportion de patients présentant une PID non idiopathique paraît anormalement élevée, de 13% dans la cohorte de patients mutés *TERT* ou *TERC*, de 20,8% dans la cohorte de Newton et al. et jusqu'à à 22,8% dans la cohorte de patients mutés *RTEL1* [246]. Cela justifie au moins de ne pas limiter l'indication de l'analyse génétique aux formes idiopathiques de PID.

Plusieurs résultats suggèrent que les patients porteurs d'une mutation du complexe télomérase pourraient présenter un risque évolutif plus grave que les patients avec la même maladie sans mutation identifiée. La petite taille des télomères est un facteur indépendant de survie chez les patients atteints de FPI [93]. Nous avons rapportés un risque hématologique spécifique après transplantation pulmonaire chez les patients porteurs de mutations *TERT* ou *TERC* [125, 126]. Nous avons depuis modifié nos pratiques permettant d'observer une survie actualisée >3 ans après transplantation dans la cohorte de patients français mutés transplantés du poumon (n=27). Nous avons mis en évidence dans la cohorte de patients suspects de fibrose d'origine monogénique une diminution de la survie sans transplantation chez les patients porteurs de mutation *TERT* ou *TERC*. De plus Newton et al. ont rapporté un déclin de la CVF en moyenne de 300 mL par an, quel que soit le gène impliqué (*TERC*, *TERT*, *RTEL1* or *PARN*), et la PID (FPI ou non) [246]. Ce déclin est inhabituellement élevé comparé aux bras placebo des essais cliniques réalisés dans la FPI (130-210 mL/an) [249]. Sur des données préliminaires rétrospectives multicentriques européennes (n=35),

nous retrouvons un taux inhabituellement élevé du déclin de la CVF chez les patients mutes *TERT* ou *TERC* de 375 mL/an avant pirfenidone et de 426 ml/an après pirfenidone (Figure 17).

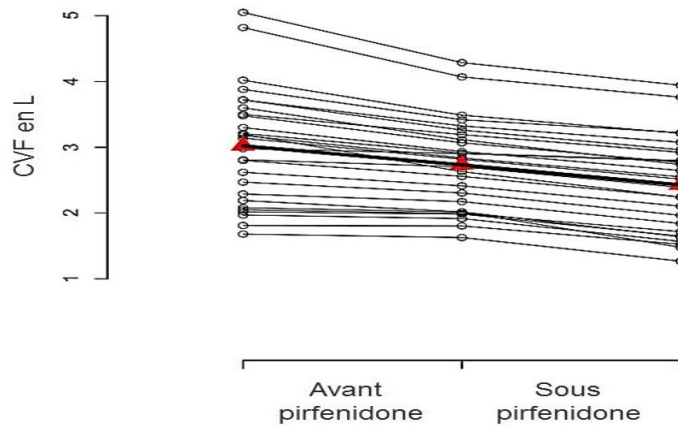


FIGURE 17 MODELISATION DU DECLIN DE LA CVF CHEZ LES PATIENTS PRESENTANT UN PID ASSOCIEE A UNE MUTATION TERT OU TERC ET TRAITES PAR PIRFENIDONE

Les résultats de la dernière cohorte de patients porteurs d'une mutation de *RTEL1* nuancent les résultats précédents. D'une part le déclin de la CVF n'est en moyenne que de 140 mL/an dans le groupe des patients porteurs d'une mutation *RTEL1*. D'autre part il existe une grande variabilité interindividuelle tant sur le plan évolutif que sur la réponse thérapeutique.

Au décours de la mise en évidence d'un risque d'emphysème pulmonaire chez la souris invalidée pour le gène *TERC*, l'équipe de M Armanios a décrit 3 mutations de *TERT*, dans une cohorte de 295 patients atteints de broncho-pneumopathie chronique obstructive [97, 250]. Il s'agissait de 3 femmes tabagiques présentant de l'emphysème et pas de fibrose. Cette équipe a récemment découvert l'implication du gène *NAF1*, autre gène associé au complexe télomérase, dans 2 familles de fibroses pulmonaires [13]. Une patiente porteuse de la mutation présentait un emphysème pulmonaire sans fibrose. Cependant ni notre expérience, ni celle de l'équipe de Christine Garcia ne suggère une augmentation du risque d'emphysème pulmonaire chez les patients porteurs de mutations du complexe télomérase. Ainsi 13% des patients porteurs de

mutations du complexe télomérase de la cohorte de Christine Garcia présentent un emphysème pulmonaire, ce qui est assez similaire aux taux d'emphysème des cohortes de FPI [246, 251].

Aucun des patients rapportés dans ces travaux n'a présenté de déficit immunitaire. Nous avons depuis pris en charge une patiente présentant une pneumocystose pulmonaire sans traitement immunosuppresseur révélant une mutation de *TERC*. Cette patiente présente une DKC qui est considérée comme un déficit immunitaire par la récente classification de l'union Internationale des sociétés Immunologiques (table 2 de [252]). En effet plusieurs cas de pneumocystoses pulmonaires chez des patients atteints de DKC avaient été rapportés au début des années 90 [253, 254]. Ainsi des patients atteints de DKC peuvent présenter une lymphopénie globale, centrée sur les B ou CD4 et les lymphocytes présenter un défaut de réponse aux mitogènes [254, 255]. Nous avons débuté une collaboration avec l'institut Imagine afin d'améliorer le phénotypage du déficit immunitaire des patients porteurs de mutations *TERT*, *TERC* ou *RTEL1* afin de sélectionner les patients qui devront bénéficier d'un traitement prophylactique, potentiellement cytotoxique.

4.2 IMPLICATION DES MUTATIONS DE *RTEL1*

Nous avons découvert l'implication de *RTEL1* dans les fibroses pulmonaires familiales. Seuls les variants rares *RTEL1* remplissaient les 2 critères de filtre d'analyse d'exome que nous avons retenus initialement : présence de variants rares sur un gène partagé entre plusieurs familles, et mise en évidence de variants rares sur un gène candidat en particulier associé aux télomères.

RTEL1 a initialement été découvert chez la souris en observant des différences de taille de télomères du simple au double entre les espèces *Mus musculus* et *Mus spretus*. La région du gène *RTEL1* a été mise en évidence par clonage positionnel en 1998, avant que le gène ne soit identifié en 2004 [56, 256].

Des mutations de *DKC1*, *TERC*, *TERT*, *TIN2*, *NOP10*, *NHP2*, *TCAB1* et *CTC1* avaient été mises en évidence dans la DKC ou le syndrome HH, mais environ 40% des patients restaient sans cause génétique identifiée [232]. En 2013, quatre études indépendantes regroupant au total 14 enfants atteints de syndrome HH ou de DKC et présentant des mutations homozygotes ou hétérozygotes composites ont été rapportées [232, 243, 244, 257]. Au moins une parente présentant une mutation hétérozygote de *RTEL1* présentait une fibrose pulmonaire [257].

RTEL1 était donc un gène candidat pour les fibroses pulmonaires familiales. La meilleure démonstration de son implication est la réplique de nos résultats par deux équipes américaines indépendantes. *RTEL1* est aujourd'hui le 2ème gène le plus fréquemment mis en évidence dans les fibroses pulmonaires familiales après *TERT*. De plus au cours des 3 dernières années d'autres gènes comme *SFTPA1*, *NAF1* ou *PARN* ont pu être mis en évidence dans les fibroses pulmonaires familiales et ont permis d'atteindre environ 40% de formes expliquées sur le plan génétique (Tableau 9 et Figure 18).

Fonction	Gene	Transmission	Age de début des manifestations pulmonaires	Signes associés
Telomerase	<i>TERT-TERC</i>	AD	Adultes, moyenne 51 ans	STC, Emphysème
	<i>TINF2</i>	AD	Enfants rares adultes <50 ans	STC [19]
	<i>DKC1</i>	X	Enfants, rares adultes <50 ans	STC [80]
Helicase	<i>RTEL1</i>	AD	Adults 35-60 years	STC
Regulation ARN	<i>PARN</i>	AD	Adultes 47-81 ans	Granulomatose pulmonaire, STC
	<i>NAF1</i>	AD	Adultes 45-60 ans	STC [13]
Surfactant	<i>SFTPA1-SFTPA2</i>	AD	Nouveau-né à 72 ans	Cancer bronchique [14, 145]
	<i>SFTPB</i>	AR	Nouveau-né	[258]
	<i>SFTPC</i>	AD	Enfants, rares adultes <50 ans	Emphysème [15]
	<i>ABCA3</i>	AR	Enfants, rares adultes <50 ans	Emphysème [170]
	<i>NKX-2.1 (TITF1)</i>	AD	Enfants, rares adultes <50 ans	Chorée, hypothyroïdie [16]
Suppresseur de Tumeur	<i>NF-1</i>	AD	Adultes	Neurofibromatosis de type 1 [17]
Lysosome	<i>HPS-1 to 8/AP-3B1</i>	AR	Adultes	Syndrome d'Hermansky Pudlak [18]
Stimulation de la synthèse d'interferon de type I	<i>TMEM173</i>	AD	Enfants, rares adultes <50 ans	Fièvre récurrente Alopécie, rash cutané Anticorps antinucléaires Vascularite [183, 259]
Stress du reticulum endoplasmique	<i>COPA</i>	AD	Enfants, rares adultes <50 ans	Arthrite, Anticorps antinucléaires, ANCA [184]
Inconnu	<i>FAM111B</i>	AD	7-30 ans	Myopathie, poikilodermie [182]
Mitochondrie	<i>NDUFAF6</i>	AR	19-50 ans	Variant acadien du syndrome de Fanconi [186]
Facteur de transcription	<i>GATA2</i>	AD	4-76 ans	Syndrome MonoMAC : Proteinose alvéolaire [260] Myélodysplasie

TABLEAU 9 PRINCIPAUX GENES POUR LESQUELS DES VARIANTES RARES ONT ÉTÉ ASSOCIÉ AUX FIBROSES PULMONAIRES. AR AUTOSOMIQUE RECESSIF, AD

AUTOSOMIQUE DOMINANT, X LIE A X STC SYNDROME DES TELOMERES COURTS

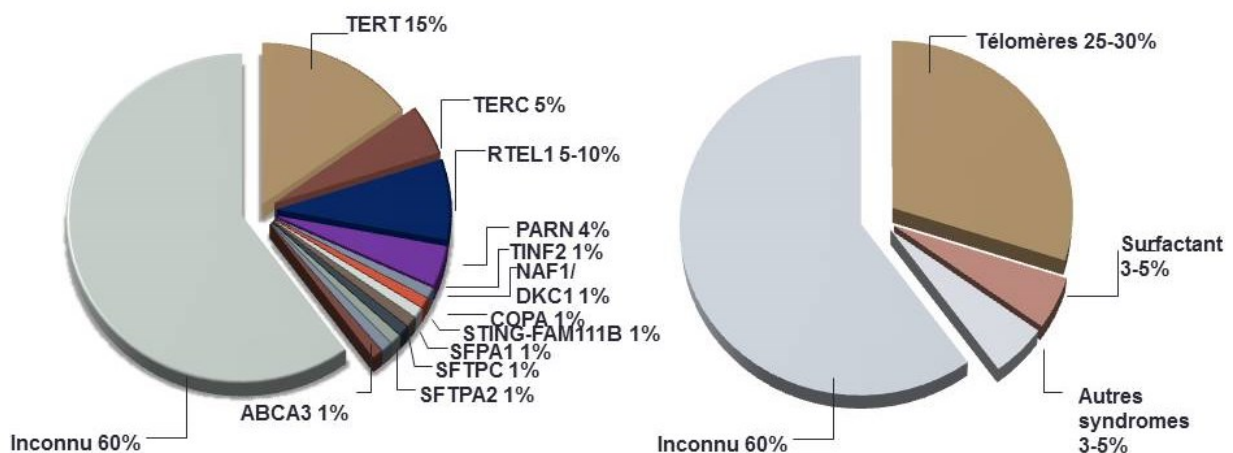


FIGURE 18 PREVALENCE RELATIVES DES DIFFERENTES MUTATIONS MISES EN EVIDENCE DANS LES FIBROSES PULMONAIRES SUPPOSEES D'ORIGINE MONOGENIQUE EN 2016, (A) GENE PAR GENE ET (B) GENES REGROUPES PAR FONCTIONS.

4.3 AUTO-IMMUNITE ET MUTATIONS DU COMPLEXE TELOMERASE

Les mutations du complexe télomérase pourraient être associées à une augmentation du risque de maladie auto-immune. Ces mutations pourraient entraîner une sénescence plus précoce de certaines populations lymphocytaires comme les lymphocytes T régulateurs [261, 262]. En effet de nombreuses maladies de transmission génétique sont associées à des marqueurs clinique ou biologique d'auto-immunité, notamment le syndrome IPEX (immunodéregulation, polyendocrinopathie, entéropathie liée à l'X) [263]. En effet dans cette maladie caractérisée par des manifestations cliniques et biologiques auto-immune, il existe un déficit en lymphocytes T régulateurs liés à une mutation de *FOXP3*. [263-265]. Parallèlement de nombreuses maladies auto-immunes ont associées à un déficit en lymphocytes T régulateurs permettant notamment la sélection négative des lymphocytes auto-réactifs dans le thymus [266]. Il est possible que les mutations du complexe télomérase modifient la répartition physiologique des populations

lymphocytaires. Cependant, à partir de données préliminaires (n=8), nous n'avons pas mis en évidence de déficit quantitatif en lymphocytes T régulateurs circulants.

De manière intéressante, la taille des télomères est en moyenne plus courte dans la plupart des maladies systémiques comme le lupus, la PR ou la granulomatose avec polyangéite [267-272]. La pré-existence de télomères courts n'est cependant pas un facteur de risque de développer une PR [273]. La longueur des télomères n'est pas modifiée par la durée d'évolution de la PR, mais pourrait être liée à des facteurs comme l'inflammation, les traitements utilisés, le stress oxydatif, une situation de stress psychologique, mais aussi une diminution de l'activité télomérase chez certains patients [274]. En effet les lymphocytes T CD4 naïfs de patients atteints de PR ont un défaut d'activation de la télomérase dû à une induction insuffisante de TERT indépendamment de la durée d'évolution de la maladie ou des traitements[275].

Des mutations de *TMEM173* ont récemment été décrites chez des patients présentant des arthralgies et des auto-anticorps [259]. Il s'agit cependant de mutations gains de fonction responsable d'une interféronopathie [183]. En l'occurrence la présence d'une fibrose pulmonaire est relativement inhabituelle alors que les autres interféronopathie sont surtout responsables d'atteintes rhumatologiques, cutanées ou neurologiques [276]. Il avait cependant été rapporté un risque d'exacerbation aigue après utilisation d'interféron à visée thérapeutique dans la FPI dont la physiopathologie est peut-être à rapprocher des mutations de *TMEM173* [277]. Le phénotype auto-immun des patients mutés *TERT* ou *RTEL1* paraît cependant différent, de plus aucun des patients analysé en exomes ne présentait de mutation de *TMEM173* associée. Nous n'avons cependant pas analysé la voie interféron sur le plan fonctionnel.

La physiopathologie de l'atteinte pulmonaire au cours des connectivites est très largement méconnue. Les facteurs de risque de PID au cours des PR rejoignent cependant les facteurs de risque de FPI : l'âge, le sexe masculin et le tabac [278]. Il a même été suggéré que le tabac soit responsable de la formation des anticorps anti-peptides citrullinés par une activation de la

citrullination des protéines pulmonaires et donc indirectement être responsable de la PR [279-281]. Le plus probable étant qu'à ce stade différents facteurs de risques s'associent de manière dépendantes les uns aux autres (tabac, hormone auto-immunité) et augmentent la pénétrance des PID chez les patients porteurs d'une mutation du complexe télomérase.

4.4 PERSPECTIVES

A MISE EN EVIDENCE DE NOUVEAU GENE

Il est probable que parmi les 60% de familles non expliquées sur le plan génétique certaines présentent des mutations sur un des gènes du tableau 9, que nous n'aurions pas mis en évidence avec les techniques utilisées.

Sur le plan génétique il est possible que des délétions n'aient pas été détectées en séquençage selon Sanger ou en séquençage d'exome. Ainsi de grandes délétions de PARN ont été mise en évidence dans chez des patients présentant une insuffisance médullaire [77]. Des analyses en puce d'hybridation génomique comparative chez 20 patients présentant un STC sans mutation mise en évidence sont en cours. Nous pourrions ainsi découvrir une délétion sur *TERT* qui n'aurait pas été détectée précédemment

Nous n'avons par ailleurs séquencé l'ADN extrait à partir des leucocytes circulants, sur laquelle la mutation germinale peut manquer. En effet en cas de mosaïcisme 50/50 de cellules avec ou sans mutation ou de réversion somatique, les cellules sans mutation auraient un gain de fonction leur permettant une prolifération plus rapide et une diminution de la répartition des cellules mutées. Ainsi dans une population à renouvellement rapide, comme les cellules sanguines, les cellules sans mutations deviennent majoritaires, et il peut être difficile de mettre en évidence la mutation germinale. Ce mécanisme de réversion somatique a déjà été décrit avec des mutations germinales de *TINF2* et de *TERC* [82, 282, 283]. Inversement l'équipe de C Garcia vient de rapporter l'acquisition de mutations somatiques gain de fonction en *cis* de mutations réduisant l'activité de

TERT [284]. Ceci démontre la difficulté d'interprétation du séquençage génétique et il faudrait idéalement contrôler en parallèle l'absence de mutation sur des cellules issues de tissus à renouvellement plus lent comme le poumon ou la peau.

Il faudra de plus combiner plusieurs facteurs de risque afin d'expliquer certaines la différence de pénétrance dans certaines familles. On peut déjà construire un score intégrant la présence d'une mutation pathogène voire à pénétrance plus faible comme H412Y dans *TERT*, la présence d'un ou de plusieurs polymorphismes à risque comme celui dans le promoteur de *MUC5B*, des données épigénétiques comme la longueur des télomères, et des facteurs de risque environnementaux comme le tabac. Il est probable que dans certaines familles il n'y ait pas un gène majeur à découvrir, mais une association de facteurs de risques en particulier chez les familles à 2 cas de patients âgés.

Les télomères courts pourraient de plus être à l'origine de phénocopie. Nous allons ainsi poursuivre l'exploration d'une famille avec probable phénocopie en présence d'un variant de *RTEL1* (p.Gly410Cys). En effet le variant découvert chez un cas index présentant une PID, n'était pas présent chez sa sœur atteinte de PID. Le variant est considéré comme de signification inconnue, et son caractère pathogène avec une phénocopie reste possible. La mesure de la longueur des télomères chez les 2 patients est en cours pour évaluer la possibilité d'une transmission de la maladie uniquement par la transmission de télomères courts.

Il est peu probable qu'un nouveau gène explique plus de 5% des familles de fibroses pulmonaires. En pratique, nous n'utilisons plus le filtre permettant de rechercher des variants sur un gène commun à plusieurs familles. Ainsi les derniers gènes à avoir été mis en évidence (*NAF1*, *SFTPA1*) l'ont été à partir d'une stratégie de gène candidat puis confirmée sur le plan fonctionnel. Nous allons poursuivre cette stratégie de gène candidat, et il faut s'ouvrir d'autres voies physiopathologiques, alors qu'une mutation de *NDUFAF6* codant pour une protéine de la chaîne

respiratoire de la mitochondrie vient récemment d'être mise en évidence dans un syndrome rare avec fibrose pulmonaire.

Il faudra probablement revenir à l'analyse de liaison qui a permis historiquement d'expliquer de très nombreuses maladies génétiques. Cependant une analyse de liaison ne sera pas réalisable pour la plupart de nos familles. En effet, la grande majorité de nos familles ne sont constituées que de 2 apparentés malades, et nous n'avons que très rarement l'ADN pour le reste de la famille. Il est de plus difficile d'affirmer l'absence de pénétrance de la maladie chez certains apparentés en particulier décédés ou chez les plus jeunes qui pourraient ne pas avoir encore développé la maladie.

B IMPACT THERAPEUTIQUE

Les données rétrospectives actuellement disponibles suggèrent que les patients présentant une mutation du complexe télomérase présentent un phénotype particulièrement sévère de fibrose associé : à un déclin accéléré de la CVF, une diminution de la survie sans transplantation, des complications hématologiques sévères après transplantation pulmonaire pouvant grever le pronostic et peut-être une moins bonne réponse à la pirfenidone [126, 239, 246, 285].

En revanche la mise en évidence d'une mutation pouvant expliquer un mécanisme majeur de la fibrose chez ces patients ouvre la voie à un ou des traitements ciblés qui pourraient bloquer ou inverser le mécanisme à l'origine de la fibrose.

La thérapie génique reste un Graal qui vient cependant de bénéficier d'un regain d'intérêt grâce aux travaux récents sur les cellules souches et à la technologie crispr-cas9 permettant une édition génétique [286, 287]. C'est cependant une technique de transfection qui a récemment été rapportée dans la drépanocytose [288].

On peut aussi espérer un traitement fonctionnel qu'il serait cependant nécessaire de prendre indéfiniment comme cela a récemment été illustré dans la mucoviscidose [289]. Les

androgènes sont de bons candidats, en particulier le danazol qui a récemment démontré sa capacité à allonger les télomères des patients porteurs de mutations du complexe télomérase . D'autres molécules ciblant l'homeostasie des télomères sont actuellement évaluée car ayant aussi potentiellement la capacité d'allonger la longueur des télomères comme la fluoxétine, le cycloastragenol, le resveratrol, la N-acétylcarnosine ou le AGS-499 [290-296].

Grace à l'identification de patients porteurs de mutations nous avons fait une demande de promotion par le programme hospitalier de recherche clinique afin de réaliser un essai clinique étudiant le danazol. En effet tous ces traitements pourraient être efficaces, mais aussi associés à des effets indésirables potentiellement sévères. Le danazol est associé à un risque de tumeur hépatique, de thrombose veineuse, et il paraît difficilement envisageable de traiter pendant plusieurs années une femme avec un androgène [104]. Il est de plus probable que certaines de ces drogues soient associées à un risque tumoral spécifique, alors que l'activation du complexe télomérase est un des mécanismes pro-oncotique connus. Ainsi l'augmentation de la taille des télomères un facteur de risque de lymphome, que certains polymorphismes de *TERT* et que des mutations somatiques activatrice de *TERT* peuvent être mise en évidence dans certains cancer de la thyroïde ou les glioblastomes [117, 297-299]

4.5 LIMITES DES TRAVAUX REALISES

A ABSENCE DE CONFIRMATION FONCTIONNELLE DES MUTATIONS

La principale limite de ce travail est l'absence de confirmation fonctionnelle au niveau protéique ou de transfection spécifique des variants mis en évidence [250, 300]. Nous nous sommes essentiellement basés sur une analyse *in silico* des variants pour conclure à leur pathogénicité [83, 84, 301]. La co-ségrégation du phénotype et du génotype a été recherchée. Les scores de prédiction (CADD et polyphen) étaient élevés. Les variants étaient absent ou très rares dans les bases de données.

Les mutations de *TERT* et de *TERC* sont considérées par certains comme une des maladies mendéliennes à révélation la plus tardive, certains cas-index présentant une PID après 70 ans [302]. Ainsi il est parfois difficile de récupérer le phénotype et génotype des ascendants de nos cas-index. De nombreux parents sont déjà décédés, au moment du diagnostic chez le cas-index. L'évaluation du phénotype chez les parents est souvent imprécise en raison de la méconnaissance de maladie liée à sa rareté, et de la confusion possible avec une autre cause d'insuffisance respiratoire chronique (insuffisance cardiaque, broncho-pneumopathie chronique obstructive,...). Inversement bien qu'il existe un phénomène d'anticipation, la prévalence des maladies varie en fonction de l'âge. Il a été rapporté dans une cohorte de patients mutés *TERT*, un taux de PID de 60% à 60 ans et de 0% à 40 ans. Ainsi il est parfois impossible de conclure à la ségrégation du phénotype et du génotype en analysant les descendants, s'ils sont asymptomatiques. Cela justifie notamment le refus d'analyse génétique chez les apparentés asymptomatiques, en l'absence d'analyse chez le cas-index.

Nous avons très récemment pour la première fois pu mettre en évidence une néomutation, (figure 19). Le cas-index présentait une PID à l'âge de 47 ans dans le cadre d'une DKC. Nous avons mis en évidence une mutation r.448A>U de *TERC*. Le fils de la patiente, âgé de 18 ans présente une DKC avec une atteinte hépatique et hématologique. Il est porteur de la même mutation. Les parents asymptomatiques de la patiente sont âgés de 71 ans. Ils ne sont pas porteurs de la mutation, sur l'analyse de prélèvements salivaires. La patiente II.1 présente donc une néomutation, bien qu'une réversion somatique n'ait pas été exclue chez les parents asymptomatiques.

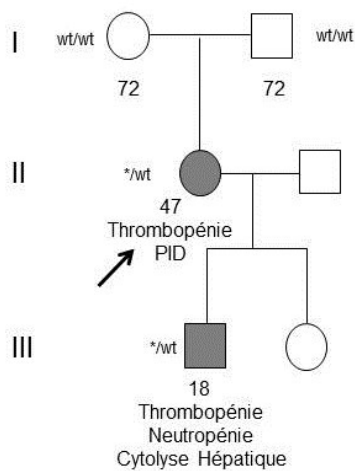


FIGURE 19 ARBRE GENEALOGIQUE D'UNE FAMILLE PRESENTANT UNE NEOMUTATION DE *TERC*.

Nous n'avons mesuré la taille des télomères que pour les patients porteurs de variants. Pour des raisons pratiques, nous n'avons pu mesurer la taille des télomères de tous les patients par Southern blot ou par Flow-Fish. Après plusieurs tentatives infructueuses, nous espérons qu'une nouvelle méthode en cours de mise au point, nous permettra la mesure de la taille des télomères par QPCR. Cela nous permettrait de mesurer la taille des télomères pour les patients. En effet, certaines équipes suggèrent de commencer par la mesure de la taille des télomères avant même de faire une analyse génétique [303]. Cependant, la taille des télomères peut être normale avec une mutation pathogène de *TERT*, ou chez certains patients atteints du syndrome HH [304]. La taille des télomères peut en particulier être normale chez les patients des premières générations, avant que la mutation n'induisse un raccourcissement des télomères des générations suivantes [89]. Par ailleurs, il n'existe pas de technique de référence, et la mesure de la taille des télomères n'est pas toujours reproductible d'une technique à une autre non seulement dans notre expérience, mais aussi par une équipe pionnière et la pointe de la recherche sur le sujet [104].

La transmission hétérozygote des maladies et l'absence de mutation activatrice rend aussi plus difficile la réalisation de tests fonctionnels simples [259]. L'expression pulmonaire de *RTEL1* était ainsi identique chez 3 patients porteurs d'une mutation de *RTEL1* et chez les contrôles.

Les tests fonctionnels utilisés actuellement ont cependant aussi leur limites comme cela est illustré pour le variant de *TERT* p.(His412Tyr). La fréquence de ce variant dans exome variant server est d'environ 0,5%. La prédiction par l'outil polyphen est délétère. La longueur des télomères des patients porteurs de ce variant peut être raccourcie à 4,76 kb [305]. Cependant la perte d'activité catalytique entraînée par ce variant a été mesurée entre 16% et 74% [90, 306]. En l'état actuel des connaissances, le caractère pathogène du variant ne peut être affirmé, et le plus probable étant qu'il s'agisse d'un variant hypomorphe.

La mise en évidence *in vivo* du caractère pathogène de chacune des mutations ou moins la démonstration de l'implication du gène d'intérêt comme *RTEL1* dans la fibrogénèse confirmerait l'implication de ce gène dans la fibrose pulmonaire et permettrait d'explorer la physiopathologie de la fibrose dans ce contexte.

Les modèles animaux illustrent la pleiotropie des gènes du complexe télomérase [222, 223]. Il a ainsi fallu créer des souris avec un KO conditionnel pulmonaire pour confirmer l'implication de *TERT* ou de *TRF1* dans la fibrogénèse pulmonaire murine. [224, 225]. D'autre part, les données humaines illustrent l'importance de l'environnement chez les patients porteurs de FPI sporadique ou de fibrose pulmonaire associée à une mutation du complexe télomérase. Ainsi, alors que les souris invalidée pour *RTEL1* ne sont cependant pas viables, à notre connaissance le phénotype pulmonaire des souris hétérozygotes *RTEL1 +/-*, n'a pas été étudié [56]. La première étape serait d'évaluer le modèle fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez ces souris, mais aussi d'autre types d'expositions épithéliales répétées comme le tabac.

Il existe cependant un risque de voir se développer chez la souris des pathologies différentes de celles de l'homme ne serait-ce qu'en raison de la taille de leur télomères 20 fois plus long que chez l'Homme. Après exposition à la fumée de tabac les souris invalidée pour le gène *TERC*, ne développe pas de fibrose pulmonaire, mais de l'emphysème pulmonaire [97]. Ainsi l'équipe de Mary Armanios, qui avait rapporté ces résultats, suggère que les mutations du complexe télomérase

soient associées à un risque d'emphysème et de syndrome emphysème-fibrose, ce qui ne correspond pour l'instant pas à notre expérience ni à celle de l'équipe de C Garcia [239, 284].

B ANALYSE MONOGENIQUE

Il est probable qu'en plus des mutations identifiées d'autres polymorphismes ou mutations soient impliqués dans les phénotypes observés, Dans la première partie du travail, seuls *TERT* et *TERC* ont été séquencés.

Le polymorphisme à risque de FPI dans le promoteur de *MUC5B* n'a été séquencé que chez les patients mutés *TERT* ou *TERC*. Alors que la prévalence de l'allèle à risque de FPI est habituellement supérieur à 30% dans les formes familiales de fibrose, et de 10% dans la population générale le taux n'était que de 25% dans le groupe des mutés *TERT* ou *TERC* [2]. Cela suggère que plusieurs gènes avec une pénétrance variable pourraient être associés.

Il a de plus été décrit chez un même patient l'association de plusieurs variants rares de *TERT* et de *TERC* [92]. Il est alors difficile d'évaluer l'impact respectif de chaque variant. Ainsi pour les patients ayant bénéficié d'un séquençage d'exome, nous avons pu étudier les autres gènes connus pour être associés aux fibroses pulmonaires familiales (Figure 18). Nous avons pu ainsi mettre en évidence un patient présentant une mutation de *TMEM173*, et un patient présentant une mutation de *PARN* [241, 307]. Nous n'avons cependant pas mis en évidence de mutation hétérozygote d'*ABCA3* pour lesquelles, il avait été suggéré qu'elles pourraient augmenter la pénétrance des mutations de *SFTPC* [163].

Il est ainsi difficile de conclure sur le plan génétique pour la famille présentant une cytopénie après la prescription de cyclophosphamide. Il est tentant d'expliquer la cytopénie par la mutation sur un gène de réparation de l'ADN. Cependant aucune autre famille n'a présenté une telle toxicité. *In vitro*, les fibroblastes de la sœur du cas index elle aussi porteuse de la mutation ne

présentaient pas de lésion inhabituelle de l'ADN après incubation avec du cyclophosphamide. Une autre anomalie génétique associée à la réparation de l'ADN est donc possible chez cette famille.

Le séquençage d'exome a aussi des limites techniques y compris sur le séquençage de l'ADN. Par définition, ce qui est en dehors de l'exome n'est pas séquencé. Nous n'avons donc pas pu analyser les polymorphismes associés à la FPI comme ceux dans *MUC5B* ou *TOLLIP*, qui n'étaient pas couverts par le séquençage [308]. La technique de séquençage peut être prise à défaut pour des gènes ayant une grande homologie, comme c'est le cas pour *SFTPA1* et *SFTPA2* [145]. Enfin nous n'avons pas réalisé tous les séquençages d'exome en même temps, alors que la couverture et la profondeur du séquençage s'est améliorée sur les derniers examens réalisés.

C ANALYSE DES PHENOTYPES

Une autre limite de nos études est l'analyse, pour partie, rétrospective des phénotypes. Ainsi le recueil des données repose initialement sur la feuille de demande (annexe 1). Le recueil des données a été complété dans chaque centre pour tous les patients de manière rétrospective en 2014. Une relecture des histologies et des scanners n'a pas cependant pas été réalisée, et reposait sur la conclusion de la discussion multidisciplinaire locale. Ainsi le diagnostic de PPFE a probablement initialement été sous-estimé. Certains patients ont été considérés comme présentant une fibrose inclassable ont depuis été reclassés en PPFE.

Malgré nos efforts, certaines données, comme la NFS ou l'aspect du scanner thoracique, sont restées manquantes. De plus les atteintes cutanées et hépatiques spécifiques des mutations sont difficiles à évaluer. La plupart des patients n'ayant pas bénéficié d'une évaluation spécialisée, la prévalence et la nature de ces atteintes devra être confirmée.

Nous pensons cependant que les travaux réalisés sont représentatifs de population française de patients porteurs de PID associées à une mutation du complexe télomérase, même si

de nombreux patients n'ont pas encore été diagnostiqués. En revanche, nous nous sommes affranchis d'un biais de mémorisation en interrogeant la base de données du laboratoire de génétique. En effet, il n'existait au moment où le travail a commencé qu'un seul laboratoire en France réalisant le séquençage de *TERT* et de *TERC*. Tous les patients adressés dans le laboratoire de génétique de l'hôpital Bichat ont été analysés, et tous les patients ont été inclus quand ils remplissaient les critères d'inclusion.

Il est cependant probable que la prévalence des mutations *RTEL1* dans les fibroses familiales soit plus faible que celle que nous avons rapportée. En effet, pour des raisons de moyens, nous avons sélectionné les cas-index pour lesquels la probabilité d'une forme monogénique de fibrose était la plus élevée : patients plus jeunes et familles avec le plus de patients atteints de PID.

5 CONCLUSION

Les mutations du complexe télomérase sont responsables d'au moins 20% des formes familiales de fibroses pulmonaires. Les mutations de *TERT* ou *TERC* sont associées à un risque plus élevé d'atteinte hématologique. Nous avons découvert l'implication de *RTEL1* dans 5 à 10% des formes familiales de fibrose. Les mutations de *RTEL1* pourraient être associées à un plus faible risque d'atteinte hématologique, mais peut-être à un risque plus élevé de maladie auto-immune et de PID associée à une maladie auto-immune. *RTEL1* est exprimé dans le poumon, sans différence d'expression évidente entre des patients présentant une mutation *TERT*, *RTEL1* ou une FPI sporadique. Nous n'avons cependant pas pu confirmer ces mutations au niveau fonctionnel, et la physiopathologie des PID associées aux mutations du complexe télomérase reste encore pour l'essentiel inconnue.

URL DES SITES WEB UTILISES

- 1000 genomes : <http://browser.1000genomes.org/index.html>
- Ensembl : <http://www.ensembl.org/index.html>
- ExAC Browser : <http://exac.broadinstitute.org/>
- Exome Variant Server : <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>
- GnomAD (version 120 000 exomes d'EXAC)
- Max EntScan 3' : http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq_acc.html
- MaxEntScan 5' : http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html
- NCBI : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>
- Polyphen : <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>
- Smart : <http://smart.embl-heidelberg.de/>
- Uniprot : <http://www.uniprot.org/>
- Splice variant : http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html
- Polyweb : <http://polyweb.fr/>
- Telomerase mutations database : <http://telomerase.asu.edu/>
- Broadinstitute : <http://www.broadinstitute.org/gatk/guide/topic?name=best-practices>).
- Homology detection : <https://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>
- Prédiction de fonction <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>

BIBLIOGRAPHIE

1. Yang IV, Fingerlin TE, Evans CM, Schwarz MI, Schwartz DA. MUC5B and Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Ann Am Thorac Soc* 2015; 12 Suppl 2: S193-199.
2. Seibold MA, Wise AL, Speer MC, Steele MP, Brown KK, Loyd JE, Fingerlin TE, Zhang W, Gudmundsson G, Groshong SD, Evans CM, Garantziotis S, Adler KB, Dickey BF, du Bois RM, Yang IV, Herron A, Kervitsky D, Talbert JL, Markin C, Park J, Crews AL, Slifer SH, Auerbach S, Roy MG, Lin J, Hennessy CE, Schwarz MI, Schwartz DA. A common MUC5B promoter polymorphism and pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2011; 364(16): 1503-1512.
3. Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, Colby TV, Cordier JF, Flaherty KR, Lasky JA, Lynch DA, Ryu JH, Swigris JJ, Wells AU, Ancochea J, Bouros D, Carvalho C, Costabel U, Ebina M, Hansell DM, Johkoh T, Kim DS, King TE, Jr., Kondoh Y, Myers J, Muller NL, Nicholson AG, Richeldi L, Selman M, Dudden RF, Griss BS, Protzko SL, Schunemann HJ. 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(6): 788-824.
4. Savarino E, Carbone R, Marabotto E, Furnari M, Sconfienza L, Ghio M, Zentilin P, Savarino V. Gastro-oesophageal reflux and gastric aspiration in idiopathic pulmonary fibrosis patients. *Eur Respir J* 2013; 42(5): 1322-1331.
5. Pardo A, Selman M. Lung Fibroblasts, Aging, and Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Ann Am Thorac Soc* 2016; 13(Supplement_5): S417-S421.
6. Borensztajn K, Crestani B, Kolb M. Idiopathic pulmonary fibrosis: from epithelial injury to biomarkers--insights from the bench side. *Respiration* 2013; 86(6): 441-452.
7. Borie R, Justet A, Beltramo G, Manali ED, Pradere P, Spagnolo P, Crestani B. Pharmacological management of IPF. *Respirology* 2016; 21(4): 615-625.
8. Raghu G, Weycker D, Edelsberg J, Bradford WZ, Oster G. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174(7): 810-816.
9. 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(4): 338-342.
10. Kropski JA, Pritchett JM, Zoz DF, Crossno PF, Markin C, Garnett ET, Degryse AL, Mitchell DB, Polosukhin VV, Rickman OB, Choi L, Cheng DS, McConaha ME, Jones BR, Gleaves LA, McMahon FB, Worrell JA, Solus JF, Ware LB, Lee JW, Massion PP, Zaynagetdinov R, White ES, Kurtis JD, Johnson JE, Groshong SD, Lancaster LH, Young LR, Steele MP, Phillips Iii JA, Cogan JD, Loyd JE, Lawson WE, Blackwell TS. Extensive Phenotyping of Individuals At-risk for Familial Interstitial Pneumonia Reveals Clues to the Pathogenesis of Interstitial Lung Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 191(4): 417-426.
11. Tsakiri KD, Cronkhite JT, Kuan PJ, Xing C, Raghu G, Weissler JC, Rosenblatt RL, Shay JW, Garcia CK. Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(18): 7552-7557.
12. Armanios MY, Chen JJ, Cogan JD, Alder JK, Ingersoll RG, Markin C, Lawson WE, Xie M, Vulto I, Phillips JA, 3rd, Lansdorp PM, Greider CW, Loyd JE. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2007; 356(13): 1317-1326.
13. Stanley SE, Gable DL, Wagner CL, Carlile TM, Hanumanthu VS, Podlevsky JD, Khalil SE, DeZern AE, Rojas-Duran MF, Applegate CD, Alder JK, Parry EM, Gilbert WV, Armanios M. Loss-of-function mutations in the RNA biogenesis factor NAF1 predispose to pulmonary fibrosis-emphysema. *Sci Transl Med* 2016; 8(351): 351ra107.
14. Wang Y, Kuan PJ, Xing C, Cronkhite JT, Torres F, Rosenblatt RL, DiMaio JM, Kinch LN, Grishin NV, Garcia CK. Genetic defects in surfactant protein A2 are associated with pulmonary fibrosis and lung cancer. *Am J Hum Genet* 2009; 84(1): 52-59.
15. Cottin V, Cordier JF. SFTPC mutations in patients with familial pulmonary fibrosis: combined with emphysema? *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183(8): 1113; author reply 1113-1114.

16. Hamvas A, Deterding RR, Wert SE, White FV, Dishop MK, Alfano DN, Halbower AC, Planer B, Stephan MJ, Uchida DA, Williams LD, Rosenfeld JA, Lebel RR, Young LR, Cole FS, Nogee LM. Heterogeneous pulmonary phenotypes associated with mutations in the thyroid transcription factor gene NKX2-1. *Chest* 2013; 144(3): 794-804.
17. Montani D, Coulet F, Girerd B, Eyries M, Bergot E, Mal H, Biondi G, Dromer C, Hugues T, Marquette C, O'Connell C, O'Callaghan DS, Savale L, Jais X, Dorfmuller P, Begueret H, Bertoletti L, Sitbon O, Bellanne-Chantelot C, Zalcman G, Simonneau G, Humbert M, Soubrier F. Pulmonary hypertension in patients with neurofibromatosis type I. *Medicine (Baltimore)* 2011; 90(3): 201-211.
18. O'Brien K, Troendle J, Gochuico BR, Markello TC, Salas J, Cardona H, Yao J, Bernardini I, Hess R, Gahl WA. Pirfenidone for the treatment of Hermansky-Pudlak syndrome pulmonary fibrosis. *Mol Genet Metab* 2011; 103(2): 128-134.
19. Alder JK, Stanley SE, Wagner CL, Hamilton M, Hanumanthu VS, Armanios M. Exome Sequencing Identifies Mutant TINF2 in a Family With Pulmonary Fibrosis. *Chest* 2015; 147(5): 1361-1368.
20. Travis WD, Costabel U, Hansell DM, King TE, Jr., Lynch DA, Nicholson AG, Ryerson CJ, Ryu JH, Selman M, Wells AU, Behr J, Bouros D, Brown KK, Colby TV, Collard HR, Cordeiro CR, Cottin V, Crestani B, Drent M, Dudden RF, Egan J, Flaherty K, Hogaboam C, Inoue Y, Johkoh T, Kim DS, Kitaichi M, Loyd J, Martinez FJ, Myers J, Protzko S, Raghu G, Richeldi L, Sverzellati N, Swigris J, Valeyre D. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 188(6): 733-748.
21. Steele MP, Speer MC, Loyd JE, Brown KK, Herron A, Slifer SH, Burch LH, Wahidi MM, Phillips JA, 3rd, Sporn TA, McAdams HP, Schwarz MI, Schwartz DA. Clinical and pathologic features of familial interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172(9): 1146-1152.
22. Reddy TL, Tominaga M, Hansell DM, von der Thusen J, Rassel D, Parfrey H, Guy S, Twentyman O, Rice A, Maher TM, Renzoni EA, Wells AU, Nicholson AG. Pleuroparenchymal fibroelastosis: a spectrum of histopathological and imaging phenotypes. *Eur Respir J* 2012; 40(2): 377-385.
23. Garcia-Sancho C, Buendia-Roldan I, Fernandez-Plata MR, Navarro C, Perez-Padilla R, Vargas MH, Loyd JE, Selman M. Familial pulmonary fibrosis is the strongest risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med* 2011; 105(12): 1902-1907.
24. Scholand MB, Coon H, Wolff R, Cannon-Albright L. Use of a genealogical database demonstrates heritability of pulmonary fibrosis. *Lung* 2013; 191(5): 475-481.
25. Okamoto T, Miyazaki Y, Tomita M, Tamaoka M, Inase N. A familial history of pulmonary fibrosis in patients with chronic hypersensitivity pneumonitis. *Respiration* 2013; 85(5): 384-390.
26. Rosas IO, Ren P, Avila NA, Chow CK, Franks TJ, Travis WD, McCoy JP, Jr., May RM, Wu HP, Nguyen DM, Arcos-Burgos M, MacDonald SD, Gochuico BR. Early interstitial lung disease in familial pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176(7): 698-705.
27. Leslie KO, Cool CD, Sporn TA, Curran-Everett D, Steele MP, Brown KK, Wahidi MM, Schwartz DA. Familial idiopathic interstitial pneumonia: histopathology and survival in 30 patients. *Arch Pathol Lab Med* 2012; 136(11): 1366-1376.
28. Lee HL, Ryu JH, Wittmer MH, Hartman TE, Lymp JF, Tazelaar HD, Limper AH. Familial idiopathic pulmonary fibrosis: clinical features and outcome. *Chest* 2005; 127(6): 2034-2041.
29. Lee HY, Seo JB, Steele MP, Schwarz MI, Brown KK, Loyd JE, Talbert JL, Schwartz DA, Lynch DA. High-resolution CT scan findings in familial interstitial pneumonia do not conform to those of idiopathic interstitial pneumonia. *Chest* 2012; 142(6): 1577-1583.
30. Fernandez BA, Fox G, Bhatia R, Sala E, Noble B, Denic N, Fernandez D, Duguid N, Dohey A, Kamel F, Edwards L, Mahoney K, Stuckless S, Parfrey PS, Woods MO. A Newfoundland cohort of familial and sporadic idiopathic pulmonary fibrosis patients: clinical and genetic features. *Respir Res* 2012; 13: 64.
31. Ravaglia C, Tomassetti S, Gurioli C, Piciocchi S, Dubini A, Casoni GL, Romagnoli M, Carloni A, Tantalocco P, Buccioli M, Chilosi M, Poletti V. Features and outcome of familial idiopathic pulmonary fibrosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2014; 31(1): 28-36.

32. Lee HK, Kim DS, Yoo B, Seo JB, Rho JY, Colby TV, Kitaichi M. Histopathologic pattern and clinical features of rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease. *Chest* 2005; 127(6): 2019-2027.
33. O'Sullivan RJ, Karlseder J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11(3): 171-181.
34. de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* 2005; 19(18): 2100-2110.
35. Sfeir A, Kosiyatrakul ST, Hockemeyer D, MacRae SL, Karlseder J, Schildkraut CL, de Lange T. Mammalian telomeres resemble fragile sites and require TRF1 for efficient replication. *Cell* 2009; 138(1): 90-103.
36. Martinez P, Thanasoula M, Munoz P, Liao C, Tejera A, McNees C, Flores JM, Fernandez-Capetillo O, Tarsounas M, Blasco MA. Increased telomere fragility and fusions resulting from TRF1 deficiency lead to degenerative pathologies and increased cancer in mice. *Genes Dev* 2009; 23(17): 2060-2075.
37. Benetti R, Schoeftner S, Munoz P, Blasco MA. Role of TRF2 in the assembly of telomeric chromatin. *Cell Cycle* 2008; 7(21): 3461-3468.
38. Touzot F, Le Guen T, de Villartay JP, Revy P. [Dyskeratosis congenita: short telomeres are not the rule]. *Med Sci (Paris)* 2012; 28(6-7): 618-624.
39. Surovtseva YV, Churikov D, Boltz KA, Song X, Lamb JC, Warrington R, Leehy K, Heacock M, Price CM, Shippen DE. Conserved telomere maintenance component 1 interacts with STN1 and maintains chromosome ends in higher eukaryotes. *Mol Cell* 2009; 36(2): 207-218.
40. Miyake Y, Nakamura M, Nabetani A, Shimamura S, Tamura M, Yonehara S, Saito M, Ishikawa F. RPA-like mammalian Ctc1-Stn1-Ten1 complex binds to single-stranded DNA and protects telomeres independently of the Pot1 pathway. *Mol Cell* 2009; 36(2): 193-206.
41. Price CM, Boltz KA, Chaiken MF, Stewart JA, Beilstein MA, Shippen DE. Evolution of CST function in telomere maintenance. *Cell Cycle* 2010; 9(16): 3157-3165.
42. Gu P, Min JN, Wang Y, Huang C, Peng T, Chai W, Chang S. CTC1 deletion results in defective telomere replication, leading to catastrophic telomere loss and stem cell exhaustion. *EMBO J* 2012; 31(10): 2309-2321.
43. Calado RT, Young NS. Telomere diseases. *N Engl J Med* 2009; 361(24): 2353-2365.
44. Greider CW, Blackburn EH. A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 1989; 337(6205): 331-337.
45. Lingner J, Hughes TR, Shevchenko A, Mann M, Lundblad V, Cech TR. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* 1997; 276(5312): 561-567.
46. Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, Adams RR, Chang E, Allsopp RC, Yu J, et al. The RNA component of human telomerase. *Science* 1995; 269(5228): 1236-1241.
47. Podlevsky JD, Chen JJ. It all comes together at the ends: telomerase structure, function, and biogenesis. *Mutat Res* 2012; 730(1-2): 3-11.
48. Blackburn EH, Collins K. Telomerase: an RNP enzyme synthesizes DNA. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 3(5).
49. Mitchell JR, Wood E, Collins K. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature* 1999; 402(6761): 551-555.
50. Meier UT. The many facets of H/ACA ribonucleoproteins. *Chromosoma* 2005; 114(1): 1-14.
51. Chen JL, Blasco MA, Greider CW. Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. *Cell* 2000; 100(5): 503-514.
52. Armanios M, Blackburn EH. The telomere syndromes. *Nat Rev Genet* 2012; 13(10): 693-704.
53. Venteicher AS, Abreu EB, Meng Z, McCann KE, Terns RM, Veenstra TD, Terns MP, Artandi SE. A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis. *Science* 2009; 323(5914): 644-648.
54. Moon DH, Segal M, Boyraz B, Guinan E, Hofmann I, Cahan P, Tai AK, Agarwal S. Poly(A)-specific ribonuclease (PARN) mediates 3'-end maturation of the telomerase RNA component. *Nat Genet* 2015; 47(12): 1482-1488.

55. Egan ED, Collins K. An enhanced H/ACA RNP assembly mechanism for human telomerase RNA. *Mol Cell Biol* 2012; 32(13): 2428-2439.
56. Ding H, Schertzer M, Wu X, Gertsenstein M, Selig S, Kammori M, Pourvali R, Poon S, Vulto I, Chavez E, Tam PP, Nagy A, Lansdorp PM. Regulation of murine telomere length by Rtel: an essential gene encoding a helicase-like protein. *Cell* 2004; 117(7): 873-886.
57. Vannier JB, Pavicic-Kaltenbrunner V, Petalcorin MI, Ding H, Boulton SJ. RTEL1 dismantles T loops and counteracts telomeric G4-DNA to maintain telomere integrity. *Cell* 2012; 149(4): 795-806.
58. Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de Lange T. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 1999; 97(4): 503-514.
59. Le Guen T, Jullien L, Schertzer M, Lefebvre A, Kermasson L, de Villartay JP, Londono-Vallejo A, Revy P. [RTEL1 (regulator of telomere elongation helicase 1), a DNA helicase essential for genome stability]. *Med Sci (Paris)* 2013; 29(12): 1138-1144.
60. Shay JW, Wright WE. Telomeres and telomerase in normal and cancer stem cells. *FEBS Lett* 2010; 584(17): 3819-3825.
61. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 1997; 33(5): 787-791.
62. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998; 279(5349): 349-352.
63. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 266(5193): 2011-2015.
64. Diede SJ, Gottschling DE. Telomerase-mediated telomere addition in vivo requires DNA primase and DNA polymerases alpha and delta. *Cell* 1999; 99(7): 723-733.
65. Marcand S, Brevet V, Mann C, Gilson E. Cell cycle restriction of telomere elongation. *Curr Biol* 2000; 10(8): 487-490.
66. Teixeira MT, Arneric M, Sperisen P, Lingner J. Telomere length homeostasis is achieved via a switch between telomerase- extendible and -nonextendible states. *Cell* 2004; 117(3): 323-335.
67. d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, Saretzki G, Carter NP, Jackson SP. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 2003; 426(6963): 194-198.
68. Zinsser F. Atrophia Cutis Reticularis cum Pigmentations, Dystrophia Unguium et Leukoplakis oris (Poikiodermia atrophicans vascularis Jacobi). *Ikongraphia Dermatologica* 1910; 5: 219-223.
69. Mialou V, Leblanc T, Peffault de Latour R, Dalle JH, Socie G. [Dyskeratosis congenita: an update]. *Arch Pediatr* 2013; 20(3): 299-306.
70. Heiss NS, Knight SW, Vulliamy TJ, Klauck SM, Wiemann S, Mason PJ, Poustka A, Dokal I. X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions. *Nat Genet* 1998; 19(1): 32-38.
71. Langston AA, Sanders JE, Deeg HJ, Crawford SW, Anasetti C, Sullivan KM, Flowers ME, Storb R. Allogeneic marrow transplantation for aplastic anaemia associated with dyskeratosis congenita. *Br J Haematol* 1996; 92(3): 758-765.
72. Connor JM, Gatherer D, Gray FC, Pirrit LA, Affara NA. Assignment of the gene for dyskeratosis congenita to Xq28. *Hum Genet* 1986; 72(4): 348-351.
73. Knight SW, Heiss NS, Vulliamy TJ, Aalfs CM, McMahon C, Richmond P, Jones A, Hennekam RC, Poustka A, Mason PJ, Dokal I. Unexplained aplastic anaemia, immunodeficiency, and cerebellar hypoplasia (Hoyeraal-Hreidarsson syndrome) due to mutations in the dyskeratosis congenita gene, DKC1. *Br J Haematol* 1999; 107(2): 335-339.
74. Vulliamy T, Marrone A, Goldman F, Dearlove A, Bessler M, Mason PJ, Dokal I. The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Nature* 2001; 413(6854): 432-435.

75. Walne AJ, Vulliamy T, Marrone A, Beswick R, Kirwan M, Masunari Y, Al-Qurashi FH, Aljurf M, Dokal I. Genetic heterogeneity in autosomal recessive dyskeratosis congenita with one subtype due to mutations in the telomerase-associated protein NOP10. *Hum Mol Genet* 2007; 16(13): 1619-1629.
76. Vulliamy T, Beswick R, Kirwan M, Marrone A, Digweed M, Walne A, Dokal I. Mutations in the telomerase component NHP2 cause the premature ageing syndrome dyskeratosis congenita. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(23): 8073-8078.
77. Dhanraj S, Gunja SM, Deveau AP, Nissbeck M, Boonyawat B, Coombs AJ, Renieri A, Mucciolo M, Marozza A, Buoni S, Turner L, Li H, Jarrar A, Sabanayagam M, Kirby M, Shago M, Pinto D, Berman JN, Scherer SW, Virtanen A, Dror Y. Bone marrow failure and developmental delay caused by mutations in poly(A)-specific ribonuclease (PARN). *J Med Genet* 2015; 52(11): 738-748.
78. Yamaguchi H, Calado RT, Ly H, Kajigaya S, Baerlocher GM, Chanock SJ, Lansdorp PM, Young NS. Mutations in TERT, the gene for telomerase reverse transcriptase, in aplastic anemia. *N Engl J Med* 2005; 352(14): 1413-1424.
79. Armanios M, Chen JL, Chang YP, Brodsky RA, Hawkins A, Griffin CA, Eshleman JR, Cohen AR, Chakravarti A, Hamosh A, Greider CW. Haploinsufficiency of telomerase reverse transcriptase leads to anticipation in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(44): 15960-15964.
80. Kropski JA, Mitchell DB, Markin C, Polosukhin VV, Choi L, Johnson JE, Lawson WE, Phillips JA, Cogan JD, Blackwell TS, Loyd JE. A novel dyskerin (DKC1) mutation is associated with familial interstitial pneumonia. *Chest* 2014; 146(1): e1-7.
81. Fukuhara A, Tanino Y, Ishii T, Inokoshi Y, Saito K, Fukuhara N, Sato S, Saito J, Ishida T, Yamaguchi H, Munakata M. Pulmonary fibrosis in dyskeratosis congenita with TINF2 gene mutation. *Eur Respir J* 2013; 42(6): 1757-1759.
82. Kannengiesser C, Borie R, Revy P. Pulmonary fibrosis associated with TINF2 gene mutation: is somatic reversion required? *Eur Respir J* 2014; 44(1): 269-270.
83. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehml HL, Committee ALQA. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015; 17(5): 405-424.
84. MacArthur DG, Manolio TA, Dimmock DP, Rehml HL, Shendure J, Abecasis GR, Adams DR, Altman RB, Antonarakis SE, Ashley EA, Barrett JC, Biesecker LG, Conrad DF, Cooper GM, Cox NJ, Daly MJ, Gerstein MB, Goldstein DB, Hirschhorn JN, Leal SM, Pennacchio LA, Stamatoyannopoulos JA, Sunyaev SR, Valle D, Voight BF, Winckler W, Gunter C. Guidelines for investigating causality of sequence variants in human disease. *Nature* 2014; 508(7497): 469-476.
85. <http://telomerase.asu.edu/diseases.html#tr>. [cited; Available from:
86. <http://telomerase.asu.edu/diseases.html#tert>.
87. Vulliamy T, Marrone A, Szydlo R, Walne A, Mason PJ, Dokal I. Disease anticipation is associated with progressive telomere shortening in families with dyskeratosis congenita due to mutations in TERC. *Nat Genet* 2004; 36(5): 447-449.
88. Reyniers E, Vits L, De Boule K, Van Roy B, Van Velzen D, de Graaff E, Verkerk AJ, Jorens HZ, Darby JK, Oostra B, et al. The full mutation in the FMR-1 gene of male fragile X patients is absent in their sperm. *Nat Genet* 1993; 4(2): 143-146.
89. Diaz de Leon A, Cronkhite JT, Katzenstein AL, Godwin JD, Raghu G, Glazer CS, Rosenblatt RL, Girod CE, Garrity ER, Xing C, Garcia CK. Telomere lengths, pulmonary fibrosis and telomerase (TERT) mutations. *PLoS One* 2010; 5(5): e10680.
90. Alder JK, Chen JJ, Lancaster L, Danoff S, Su SC, Cogan JD, Vulto I, Xie M, Qi X, Tudor RM, Phillips JA, 3rd, Lansdorp PM, Loyd JE, Armanios MY. Short telomeres are a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(35): 13051-13056.

91. Alder JK, Cogan JD, Brown AF, Anderson CJ, Lawson WE, Lansdorp PM, Phillips JA, 3rd, Loyd JE, Chen JJ, Armanios M. Ancestral mutation in telomerase causes defects in repeat addition processivity and manifests as familial pulmonary fibrosis. *PLoS Genet* 2011; 7(3): e1001352.
92. Collopy LC, Walne AJ, Cardoso S, de la Fuente J, Mohamed M, Toriello H, Tamary H, Ling AJ, Lloyd T, Kassam R, Tummala H, Vulliamy TJ, Dokal I. Triallelic and epigenetic-like inheritance in human disorders of telomerase. *Blood* 2015; 126(2): 176-184.
93. Stuart BD, Lee JS, Kozlitina J, Noth I, Devine MS, Glazer CS, Torres F, Kaza V, Girod CE, Jones KD, Elicker BM, Ma SF, Vij R, Collard HR, Wolters PJ, Garcia CK. Effect of telomere length on survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: an observational cohort study with independent validation. *Lancet Respir Med* 2014; 2(7): 557-565.
94. Cronkhite JT, Xing C, Raghu G, Chin KM, Torres F, Rosenblatt RL, Garcia CK. Telomere shortening in familial and sporadic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178(7): 729-737.
95. Haque S, Rakieh C, Marriage F, Ho P, Gorodkin R, Teh LS, Snowden N, Day PJ, Bruce IN. Shortened telomere length in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2013; 65(5): 1319-1323.
96. Hou L, Andreotti G, Baccarelli AA, Savage S, Hoppin JA, Sandler DP, Barker J, Zhu ZZ, Hoxha M, Dioni L, Zhang X, Koutros S, Freeman LE, Alavanja MC. Lifetime pesticide use and telomere shortening among male pesticide applicators in the Agricultural Health Study. *Environ Health Perspect* 2013; 121(8): 919-924.
97. Alder JK, Guo N, Kembou F, Parry EM, Anderson CJ, Gorgy AI, Walsh MF, Sussan T, Biswal S, Mitzner W, Tuder RM, Armanios M. Telomere length is a determinant of emphysema susceptibility. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184(8): 904-912.
98. Rode L, Nordestgaard BG, Bojesen SE. Peripheral blood leukocyte telomere length and mortality among 64,637 individuals from the general population. *J Natl Cancer Inst* 2015; 107(6): djv074.
99. Njajou OT, Cawthon RM, Damcott CM, Wu SH, Ott S, Garant MJ, Blackburn EH, Mitchell BD, Shuldiner AR, Hsueh WC. Telomere length is paternally inherited and is associated with parental lifespan. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(29): 12135-12139.
100. Poon SS, Martens UM, Ward RK, Lansdorp PM. Telomere length measurements using digital fluorescence microscopy. *Cytometry* 1999; 36(4): 267-278.
101. Rufer N, Dragowska W, Thornbury G, Roosnek E, Lansdorp PM. Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. *Nat Biotechnol* 1998; 16(8): 743-747.
102. Vaziri H, Schachter F, Uchida I, Wei L, Zhu X, Effros R, Cohen D, Harley CB. Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes. *Am J Hum Genet* 1993; 52(4): 661-667.
103. Bendix L, Horn PB, Jensen UB, Rubelj I, Kolvraa S. The load of short telomeres, estimated by a new method, Universal STELA, correlates with number of senescent cells. *Aging Cell* 2010; 9(3): 383-397.
104. Townsley DM, Dumitriu B, Liu D, Biancotto A, Weinstein B, Chen C, Hardy N, Mihalek AD, Lingala S, Kim YJ, Yao J, Jones E, Gochuico BR, Heller T, Wu CO, Calado RT, Scheinberg P, Young NS. Danazol Treatment for Telomere Diseases. *N Engl J Med* 2016; 374(20): 1922-1931.
105. Touzot F, Gaillard L, Vasquez N, Le Guen T, Bertrand Y, Bourhis J, Leblanc T, Fischer A, Soulier J, de Villartay JP, Revy P. Heterogeneous telomere defects in patients with severe forms of dyskeratosis congenita. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129(2): 473-482, 482 e471-473.
106. Uehara H, Nardone G, Nazarenko I, Hohman RJ. Detection of telomerase activity utilizing energy transfer primers: comparison with gel- and ELISA-based detection. *Biotechniques* 1999; 26(3): 552-558.
107. Wu YY, Hruszkewycz AM, Delgado RM, Yang A, Vortmeyer AO, Moon YW, Weil RJ, Zhuang Z, Remaley AT. Limitations on the quantitative determination of telomerase activity by the electrophoretic and ELISA based TRAP assays. *Clin Chim Acta* 2000; 293(1-2): 199-212.
108. Hou M, Xu D, Bjorkholm M, Gruber A. Real-time quantitative telomeric repeat amplification protocol assay for the detection of telomerase activity. *Clin Chem* 2001; 47(3): 519-524.
109. Chen JL, Greider CW. Template boundary definition in mammalian telomerase. *Genes Dev* 2003; 17(22): 2747-2752.

110. Drosopoulos WC, Dizenzo R, Prasad VR. Human telomerase RNA template sequence is a determinant of telomere repeat extension rate. *J Biol Chem* 2005; 280(38): 32801-32810.
111. El-Chemaly S, Ziegler SG, Calado RT, Wilson KA, Wu HP, Haughey M, Peterson NR, Young NS, Gahl WA, Moss J, Gochuico BR. Natural history of pulmonary fibrosis in two subjects with the same telomerase mutation. *Chest* 2011; 139(5): 1203-1209.
112. Diaz de Leon A, Cronkhite JT, Yilmaz C, Brewington C, Wang R, Xing C, Hsia CC, Garcia CK. Subclinical lung disease, macrocytosis, and premature graying in kindreds with telomerase (TERT) mutations. *Chest* 2011; 140(3): 753-763.
113. Casanova JL. Severe infectious diseases of childhood as monogenic inborn errors of immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112(51): E7128-7137.
114. Ball SE, Gibson FM, Rizzo S, Tooze JA, Marsh JC, Gordon-Smith EC. Progressive telomere shortening in aplastic anemia. *Blood* 1998; 91(10): 3582-3592.
115. Yamaguchi H, Baerlocher GM, Lansdorp PM, Chanock SJ, Nunez O, Sloand E, Young NS. Mutations of the human telomerase RNA gene (TERC) in aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. *Blood* 2003; 102(3): 916-918.
116. Parry EM, Alder JK, Qi X, Chen JJ, Armanios M. Syndrome complex of bone marrow failure and pulmonary fibrosis predicts germline defects in telomerase. *Blood* 2011; 117(21): 5607-5611.
117. Machiela MJ, Lan Q, Slager SL, Vermeulen RC, Teras LR, Camp NJ, Cerhan JR, Spinelli JJ, Wang SS, Nieters A, Vijai J, Yeager M, Wang Z, Ghesquieres H, McKay J, Conde L, de Bakker PI, Cox DG, Burdett L, Monnereau A, Flowers CR, De Roos AJ, Brooks-Wilson AR, Giles GG, Melbye M, Gu J, Jackson RD, Kane E, Purdue MP, Vajdic CM, Albanes D, Kelly RS, Zucca M, Bertrand KA, Zeleniuch-Jacquotte A, Lawrence C, Hutchinson A, Zhi D, Habermann TM, Link BK, Novak AJ, Dogan A, Asmann YW, Liebow M, Thompson CA, Ansell SM, Witzig TE, Tilly H, Haioun C, Molina TJ, Hjalgrim H, Glimelius B, Adami HO, Roos G, Bracci PM, Riby J, Smith MT, Holly EA, Cozen W, Hartge P, Morton LM, Severson RK, Tinker LF, North KE, Becker N, Benavente Y, Boffetta P, Brennan P, Foretova L, Maynadie M, Staines A, Lightfoot T, Crouch S, Smith A, Roman E, Diver WR, Offit K, Zelenetz A, Klein RJ, Villano DJ, Zheng T, Zhang Y, Holford TR, Turner J, Southey MC, Clavel J, Virtamo J, Weinstein S, Riboli E, Vineis P, Kaaks R, Boeing H, Tjonneland A, Angelucci E, Di Lollo S, Rais M, De Vivo I, Giovannucci E, Kraft P, Huang J, Ma B, Ye Y, Chiu BC, Liang L, Park JH, Chung CC, Weisenburger DD, Fraumeni JF, Jr., Salles G, Glenn M, Cannon-Albright L, Curtin K, Wu X, Smedby KE, de Sanjose S, Skibola CF, Berndt SI, Birmann BM, Chanock SJ, Rothman N. Genetically predicted longer telomere length is associated with increased risk of B-cell lymphoma subtypes. *Hum Mol Genet* 2016; 25(8): 1663-1676.
118. Calado RT, Regal JA, Kleiner DE, Schrupp DS, Peterson NR, Pons V, Chanock SJ, Lansdorp PM, Young NS. A spectrum of severe familial liver disorders associate with telomerase mutations. *PLoS One* 2009; 4(11): e7926.
119. Hartmann D, Srivastava U, Thaler M, Kleinhans KN, N'Kontchou G, Scheffold A, Bauer K, Kratzer RF, Kloos N, Katz SF, Song Z, Begus-Nahrman Y, Kleger A, von Figura G, Strnad P, Lechel A, Gunes C, Potthoff A, Deterding K, Wedemeyer H, Ju Z, Song G, Xiao F, Gillen S, Schrezenmeier H, Mertens T, Ziolk M, Friess H, Jarek M, Manns MP, Beaugrand M, Rudolph KL. Telomerase gene mutations are associated with cirrhosis formation. *Hepatology* 2011; 53(5): 1608-1617.
120. Calado RT, Brudno J, Mehta P, Kovacs JJ, Wu C, Zago MA, Chanock SJ, Boyer TD, Young NS. Constitutional telomerase mutations are genetic risk factors for cirrhosis. *Hepatology* 2011; 53(5): 1600-1607.
121. Gorgy AI, Jonassaint NL, Stanley SE, Koteish A, DeZern AE, Walter JE, Sopha SC, Hamilton JP, Hoover-Fong J, Chen AR, Anders RA, Kamel IR, Armanios M. Hepatopulmonary syndrome is a frequent cause of dyspnea in the short telomere disorders. *Chest* 2015; 148(4): 1019-1026.
122. Armanios M, Price C. Telomeres and disease: an overview. *Mutat Res* 2012; 730(1-2): 1-2.
123. Dokal I. Dyskeratosis congenita. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011; 2011: 480-486.

124. Cottin V, Crestani B, Valeyre D, Wallaert B, Cadranel J, Dalphin JC, Delaval P, Israel-Biet D, Kessler R, Reynaud-Gaubert M, Cordier JF, Aguilaniu B, Bouquillon B, Carre P, Danel C, Faivre JB, Ferreti G, Just N, Kouzan S, Lebargy F, Marchand Adam S, Philippe B, Prevot G, Stach B, Thivolet-Bejui F. [French practical guidelines for the diagnosis and management of idiopathic pulmonary fibrosis. From the National Reference and the Competence centers for rare diseases and the Societe de Pneumologie de Langue Francaise]. *Rev Mal Respir* 2013; 30(10): 879-902.
125. Silhan LL, Shah PD, Chambers DC, Snyder LD, Riise GC, Wagner CL, Hellstrom-Lindberg E, Orens JB, Mewton JF, Danoff SK, Arcasoy MO, Armanios M. Lung transplantation in telomerase mutation carriers with pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2014; 44(1): 178-187.
126. Borie R, Kannengiesser C, Hirschi S, Le Pavec J, Mal H, Bergot E, Jouneau S, Naccache JM, Revy P, Boutboul D, Peffault de la Tour R, Wemeau-Stervinou L, Philit F, Cordier JF, Thabut G, Crestani B, Cottin V, Groupe d'Etudes et de Recherche sur les Maladies "Orphelines P. Severe hematologic complications after lung transplantation in patients with telomerase complex mutations. *J Heart Lung Transplant* 2015; 34(4): 538-546.
127. Giri N, Lee R, Faro A, Huddleston CB, White FV, Alter BP, Savage SA. Lung transplantation for pulmonary fibrosis in dyskeratosis congenita: Case Report and systematic literature review. *BMC Blood Disord* 2011; 11: 3.
128. Peffault de Latour R, Peters C, Gibson B, Strahm B, Lankester A, de Heredia CD, Longoni D, Fioredda F, Locatelli F, Yaniv I, Wachowiak J, Donadieu J, Lawitschka A, Bierings M, Wlodarski M, Corbacioglu S, Bonanomi S, Samarasinghe S, Leblanc T, Dufour C, Dalle JH, Pediatric Working Party of the European Group for B, Marrow T, Severe Aplastic Anemia Working Party of the European Group for B, Marrow T. Recommendations on hematopoietic stem cell transplantation for inherited bone marrow failure syndromes. *Bone Marrow Transplant* 2015; 50(9): 1168-1172.
129. Camitta BM, Thomas ED, Nathan DG, Gale RP, Kopecky KJ, Rapoport JM, Santos G, Gordon-Smith EC, Storb R. A prospective study of androgens and bone marrow transplantation for treatment of severe aplastic anemia. *Blood* 1979; 53(3): 504-514.
130. Guo C, Armbruster BN, Price DT, Counter CM. In vivo regulation of hTERT expression and telomerase activity by androgen. *J Urol* 2003; 170(2 Pt 1): 615-618.
131. Calado RT, Yewdell WT, Wilkerson KL, Regal JA, Kajigaya S, Stratakis CA, Young NS. Sex hormones, acting on the TERT gene, increase telomerase activity in human primary hematopoietic cells. *Blood* 2009; 114(11): 2236-2243.
132. Whitsett JA, Wert SE, Weaver TE. Alveolar surfactant homeostasis and the pathogenesis of pulmonary disease. *Annu Rev Med* 2010; 61: 105-119.
133. Glasser JR, Mallampalli RK. Surfactant and its role in the pathobiology of pulmonary infection. *Microbes Infect* 2012; 14(1): 17-25.
134. Flamein F, Riffault L, Muselet-Charlier C, Pernelle J, Feldmann D, Jonard L, Durand-Schneider AM, Coulomb A, Maurice M, Nogee LM, Inagaki N, Amselem S, Dubus JC, Rigourd V, Bremont F, Marguet C, Brouard J, de Blic J, Clement A, Epaud R, Guillot L. Molecular and cellular characteristics of ABCA3 mutations associated with diffuse parenchymal lung diseases in children. *Hum Mol Genet* 2011.
135. Kishore U, Greenhough TJ, Waters P, Shrive AK, Ghai R, Kamran MF, Bernal AL, Reid KB, Madan T, Chakraborty T. Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors. *Mol Immunol* 2006; 43(9): 1293-1315.
136. Wang G, Guo X, Diangelo S, Thomas NJ, Floros J. Humanized SFTPA1 and SFTPA2 transgenic mice reveal functional divergence of SP-A1 and SP-A2: formation of tubular myelin in vivo requires both gene products. *J Biol Chem* 2010; 285(16): 11998-12010.
137. Borie R, Danel C, Debray MP, Taille C, Dombret MC, Aubier M, Epaud R, Crestani B. Pulmonary alveolar proteinosis. *Eur Respir Rev* 2011; 20(120): 98-107.
138. Hoover RR, Floros J. Organization of the human SP-A and SP-D loci at 10q22-q23. Physical and radiation hybrid mapping reveal gene order and orientation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 18(3): 353-362.

139. Floros J, Wang G, Mikerov AN. Genetic complexity of the human innate host defense molecules, surfactant protein A1 (SP-A1) and SP-A2--impact on function. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2009; 19(2): 125-137.
140. Maitra M, Wang Y, Gerard RD, Mendelson CR, Garcia CK. Surfactant protein A2 mutations associated with pulmonary fibrosis lead to protein instability and endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 2010; 285(29): 22103-22113.
141. Maitra M, Cano CA, Garcia CK. Mutant surfactant A2 proteins associated with familial pulmonary fibrosis and lung cancer induce TGF-beta1 secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109(51): 21064-21069.
142. Retraction for Maitra et al., Mutant surfactant A2 proteins associated with familial pulmonary fibrosis and lung cancer induce TGF-beta1 secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112(37): E5222.
143. Coghlan MA, Shifren A, Huang HJ, Russell TD, Mitra RD, Zhang Q, Wegner DJ, Cole FS, Hamvas A. Sequencing of idiopathic pulmonary fibrosis-related genes reveals independent single gene associations. *BMJ Open Respir Res* 2014; 1(1): e000057.
144. van Moorsel CH, Ten Klooster L, van Oosterhout MF, de Jong PA, Adams H, Wouter van Es H, Ruven HJ, van der Vis JJ, Grutters JC. SFTPA2 Mutations in Familial and Sporadic Idiopathic Interstitial Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2015; 192(10): 1249-1252.
145. Nathan N, Giraud V, Picard C, Nunes H, Dastot-Le Moal F, Copin B, Galeron L, De Ligniville A, Kuziner N, Reynaud-Gaubert M, Valeyre D, Couderc LJ, Chinet T, Borie R, Crestani B, Simansour M, Nau V, Tissier S, Duquesnoy P, Mansour-Hendili L, Legendre M, Kannengiesser C, Coulomb-L'Hermine A, Gouya L, Amselem S, Clement A. Germline SFTPA1 mutation in familial idiopathic interstitial pneumonia and lung cancer. *Hum Mol Genet* 2016; 25(8): 1457-1467.
146. Yusen RD, Cohen AH, Hamvas A. Normal lung function in subjects heterozygous for surfactant protein-B deficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159(2): 411-414.
147. Baekvad-Hansen M, Dahl M, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Surfactant protein-B 121ins2 heterozygosity, reduced pulmonary function, and chronic obstructive pulmonary disease in smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181(1): 17-20.
148. Nogee LM, Dunbar AE, 3rd, Wert SE, Askin F, Hamvas A, Whitsett JA. A mutation in the surfactant protein C gene associated with familial interstitial lung disease. *N Engl J Med* 2001; 344(8): 573-579.
149. Thomas AQ, Lane K, Phillips J, 3rd, Prince M, Markin C, Speer M, Schwartz DA, Gaddipati R, Marney A, Johnson J, Roberts R, Haines J, Stahlman M, Loyd JE. 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(9): 1322-1328.
150. Nathan N, Taam RA, Epaud R, Delacourt C, Deschildre A, Reix P, Chiron R, de Pontbriand U, Brouard J, Fayon M, Dubus JC, Giovannini-Chami L, Bremont F, Bessaci K, Schweitzer C, Dalphin ML, Marguet C, Houdouin V, Troussier F, Sardet A, Hullo E, Gibertini I, Mahloul M, Michon D, Priouzeau A, Galeron L, Vibert JF, Thouvenin G, Corvol H, Deblic J, Clement A. A national internet-linked based database for pediatric interstitial lung diseases: the French network. *Orphanet J Rare Dis* 2012; 7: 40.
151. Guillot L, Epaud R, Thouvenin G, Jonard L, Mohsni A, Couderc R, Counil F, de Blic J, Taam RA, Le Bourgeois M, Reix P, Flamein F, Clement A, Feldmann D. New surfactant protein C gene mutations associated with diffuse lung disease. *J Med Genet* 2009; 46(7): 490-494.
152. Thouvenin G, Abou Taam R, Flamein F, Guillot L, Le Bourgeois M, Reix P, Fayon M, Counil F, Depontbriand U, Feldmann D, Pointe HD, de Blic J, Clement A, Epaud R. Characteristics of disorders associated with genetic mutations of surfactant protein C. *Arch Dis Child* 2010; 95(6): 449-454.
153. Peca D, Boldrini R, Johannson J, Shieh JT, Citti A, Petrini S, Salerno T, Cazzato S, Testa R, Messina F, Onofri A, Cenacchi G, Westermark P, Ullmann N, Cogo P, Cutrera R, Danhaive O. Clinical and ultrastructural spectrum of diffuse lung disease associated with surfactant protein C mutations. *Eur J Hum Genet* 2015; 23(8): 1033-1041.

154. van Moorsel CH, van Oosterhout MF, Barlo NP, de Jong PA, van der Vis JJ, Ruven HJ, van Es HW, van den Bosch JM, Grutters JC. Surfactant protein C mutations are the basis of a significant portion of adult familial pulmonary fibrosis in a dutch cohort. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182(11): 1419-1425.
155. Lawson WE, Crossno PF, Polosukhin VV, Roldan J, Cheng DS, Lane KB, Blackwell TR, Xu C, Markin C, Ware LB, Miller GG, Loyd JE, Blackwell TS. 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(6): L1119-1126.
156. Mulugeta S, Nguyen V, Russo SJ, Muniswamy M, Beers MF. A surfactant protein C precursor protein BRICHOS domain mutation causes endoplasmic reticulum stress, proteasome dysfunction, and caspase 3 activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 32(6): 521-530.
157. Brasch F, Griese M, Tredano M, Johnen G, Ochs M, Rieger C, Mulugeta S, Muller KM, Bahauu M, Beers MF. Interstitial lung disease in a baby with a de novo mutation in the SFTPC gene. *Eur Respir J* 2004; 24(1): 30-39.
158. Lawson WE, Polosukhin VV, Stathopoulos GT, Zoia O, Han W, Lane KB, Li B, Donnelly EF, Holburn GE, Lewis KG, Collins RD, Hull WM, Glasser SW, Whitsett JA, Blackwell TS. Increased and prolonged pulmonary fibrosis in surfactant protein C-deficient mice following intratracheal bleomycin. *Am J Pathol* 2005; 167(5): 1267-1277.
159. Crossno PF, Polosukhin VV, Blackwell TS, Johnson JE, Markin C, Moore PE, Worrell JA, Stahlman MT, Phillips JA, 3rd, Loyd JE, Cogan JD, Lawson WE. Identification of early interstitial lung disease in an individual with genetic variations in ABCA3 and SFTPC. *Chest* 2010; 137(4): 969-973.
160. Lawson WE, Grant SW, Ambrosini V, Womble KE, Dawson EP, Lane KB, Markin C, Renzoni E, Lympny P, Thomas AQ, Roldan J, Scott TA, Blackwell TS, Phillips JA, 3rd, Loyd JE, du Bois RM. Genetic mutations in surfactant protein C are a rare cause of sporadic cases of IPF. *Thorax* 2004; 59(11): 977-980.
161. 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(1): 134-137.
162. Bridges JP, Xu Y, Na CL, Wong HR, Weaver TE. Adaptation and increased susceptibility to infection associated with constitutive expression of misfolded SP-C. *J Cell Biol* 2006; 172(3): 395-407.
163. Bullard JE, Nogee LM. Heterozygosity for ABCA3 mutations modifies the severity of lung disease associated with a surfactant protein C gene (SFTPC) mutation. *Pediatr Res* 2007; 62(2): 176-179.
164. Mechri M, Epaud R, Emond S, Coulomb A, Jaubert F, Tarrant A, Feldmann D, Flamein F, Clement A, de Blic J, Taam RA, Brunelle F, le Pointe HD. Surfactant protein C gene (SFTPC) mutation-associated lung disease: high-resolution computed tomography (HRCT) findings and its relation to histological analysis. *Pediatr Pulmonol* 2010; 45(10): 1021-1029.
165. Ono S, Tanaka T, Ishida M, Kinoshita A, Fukuoka J, Takaki M, Sakamoto N, Ishimatsu Y, Kohno S, Hayashi T, Senba M, Yasunami M, Kubo Y, Yoshida LM, Kubo H, Ariyoshi K, Yoshiura K, Morimoto K. Surfactant protein C G100S mutation causes familial pulmonary fibrosis in Japanese kindred. *Eur Respir J* 2011; 38(4): 861-869.
166. Cottin V, Reix P, Khouatra C, Thivolet-Bejui F, Feldmann D, Cordier JF. Combined pulmonary fibrosis and emphysema syndrome associated with familial SFTPC mutation. *Thorax* 2011; 66(10): 918-919.
167. Kroner C, Wittmann T, Reu S, Teusch V, Klemme M, Rauch D, Hengst M, Kappler M, Cobanoglu N, Sismanlar T, Aslan AT, Campo I, Proesmans M, Schaible T, Terheggen-Lagro S, Regamey N, Eber E, Seidenberg J, Schwerk N, Aslanidis C, Lohse P, Brasch F, Zarbock R, Griese M. Lung disease caused by ABCA3 mutations. *Thorax* 2016: [Epub ahead of print].
168. Thouvenin G, Nathan N, Epaud R, Clement A. Diffuse parenchymal lung disease caused by surfactant deficiency: dramatic improvement by azithromycin. *BMJ Case Rep* 2013: 2013.
169. Flamein F, Riffault L, Muselet-Charlier C, Pernelle J, Feldmann D, Jonard L, Durand-Schneider AM, Coulomb A, Maurice M, Nogee LM, Inagaki N, Amselem S, Dubus JC, Rigourou V, Bremont F, Marguet

- C, Brouard J, de Blic J, Clement A, Epaud R, Guillot L. Molecular and cellular characteristics of ABCA3 mutations associated with diffuse parenchymal lung diseases in children. *Hum Mol Genet* 2012; 21(4): 765-775.
170. Epaud R, Delestrain C, Louha M, Simon S, Fanen P, Tazi A. Combined pulmonary fibrosis and emphysema syndrome associated with ABCA3 mutations. *Eur Respir J* 2014; 43(2): 638-641.
171. Wambach JA, Casey AM, Fishman MP, Wegner DJ, Wert SE, Cole FS, Hamvas A, Nogee LM. Genotype-phenotype correlations for infants and children with ABCA3 deficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 189(12): 1538-1543.
172. Campo I, Zorzetto M, Mariani F, Kadija Z, Morbini P, Dore R, Kaltenborn E, Frixel S, Zarbock R, Liebisch G, Hegermann J, Wrede C, Griese M, Luisetti M. A large kindred of pulmonary fibrosis associated with a novel ABCA3 gene variant. *Respir Res* 2014; 15(1): 43.
173. Jovien S, Borie R, Doummar D, Clement A, Nathan N. Respiratory Distress, Congenital Hypothyroidism and Hypotonia in a Newborn. *Respiration* 2016; 92(3): 188-191.
174. Huizing M, Helip-Wooley A, Westbroek W, Gunay-Aygun M, Gahl WA. Disorders of lysosome-related organelle biogenesis: clinical and molecular genetics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2008; 9: 359-386.
175. Santiago Borrero PJ, Rodriguez-Perez Y, Renta JY, Izquierdo NJ, Del Fierro L, Munoz D, Molina NL, Ramirez S, Pagan-Mercado G, Ortiz I, Rivera-Caragol E, Spritz RA, Cadilla CL. Genetic testing for oculocutaneous albinism type 1 and 2 and Hermansky-Pudlak syndrome type 1 and 3 mutations in Puerto Rico. *J Invest Dermatol* 2006; 126(1): 85-90.
176. Gahl WA, Brantly M, Kaiser-Kupfer MI, Iwata F, Hazelwood S, Shotelersuk V, Duffy LF, Kuehl EM, Troendle J, Bernardini I. Genetic defects and clinical characteristics of patients with a form of oculocutaneous albinism (Hermansky-Pudlak syndrome). *N Engl J Med* 1998; 338(18): 1258-1264.
177. Pierson DM, Ionescu D, Qing G, Yonan AM, Parkinson K, Colby TC, Leslie K. Pulmonary fibrosis in hermansky-pudlak syndrome. a case report and review. *Respiration* 2006; 73(3): 382-395.
178. Gahl WA, Brantly M, Troendle J, Avila NA, Padua A, Montalvo C, Cardona H, Calis KA, Gochuico B. Effect of pirfenidone on the pulmonary fibrosis of Hermansky-Pudlak syndrome. *Mol Genet Metab* 2002; 76(3): 234-242.
179. Riccardi VM. Von Recklinghausen neurofibromatosis. *N Engl J Med* 1981; 305(27): 1617-1627.
180. Zamora AC, Collard HR, Wolters PJ, Webb WR, King TE. Neurofibromatosis-associated lung disease: a case series and literature review. *Eur Respir J* 2007; 29(1): 210-214.
181. Ryu JH, Parambil JG, McGrann PS, Aughenbaugh GL. Lack of evidence for an association between neurofibromatosis and pulmonary fibrosis. *Chest* 2005; 128(4): 2381-2386.
182. Mercier S, Kury S, Shaboodien G, Houniet DT, Khumalo NP, Bou-Hanna C, Bodak N, Cormier-Daire V, David A, Faivre L, Figarella-Branger D, Gherardi RK, Glen E, Hamel A, Laboisie C, Le Caignec C, Lindenbaum P, Magot A, Munnich A, Mussini JM, Pillay K, Rahman T, Redon R, Salort-Campana E, Santibanez-Koref M, Thauvin C, Barbarot S, Keavney B, Bezieau S, Mayosi BM. Mutations in FAM111B cause hereditary fibrosing poikiloderma with tendon contracture, myopathy, and pulmonary fibrosis. *Am J Hum Genet* 2013; 93(6): 1100-1107.
183. Jeremiah N, Neven B, Gentili M, Callebaut I, Maschalidi S, Stolzenberg MC, Goudin N, Fremont ML, Nitschke P, Molina TJ, Blanche S, Picard C, Rice GI, Crow YJ, Manel N, Fischer A, Bader-Meunier B, Rieux-Laucat F. Inherited STING-activating mutation underlies a familial inflammatory syndrome with lupus-like manifestations. *J Clin Invest* 2014; 124(12): 5516-5520.
184. Watkin LB, Jessen B, Wiszniewski W, Vece TJ, Jan M, Sha Y, Thamsen M, Santos-Cortez RL, Lee K, Gambin T, Forbes LR, Law CS, Stray-Pedersen A, Cheng MH, Mace EM, Anderson MS, Liu D, Tang LF, Nicholas SK, Nahmod K, Makedonas G, Canter DL, Kwok PY, Hicks J, Jones KD, Penney S, Jhangiani SN, Rosenblum MD, Dell SD, Waterfield MR, Papa FR, Muzny DM, Zaitlen N, Leal SM, Gonzaga-Jauregui C, Baylor-Hopkins Center for Mendelian G, Boerwinkle E, Eissa NT, Gibbs RA, Lupski JR, Orange JS, Shum AK. COPA mutations impair ER-Golgi transport and cause hereditary autoimmune-mediated lung disease and arthritis. *Nat Genet* 2015; 47(6): 654-660.

185. Wornell P, Crocker J, Wade A, Dixon J, Acott P. An Acadian variant of Fanconi syndrome. *Pediatr Nephrol* 2007; 22(10): 1711-1715.
186. Hartmannova H, Piherova L, Tauchmannova K, Kidd K, Acott PD, Crocker JF, Oussedik Y, Mallet M, Hodanova K, Stranecky V, Pristoupilova A, Baresova V, Jedlickova I, Zivna M, Sovova J, Hulkova H, Robins V, Vrbacky M, Pecina P, Kaplanova V, Houstek J, Mracek T, Thibeault Y, Bleyer AJ, Kmoch S. Acadian variant of Fanconi syndrome is caused by mitochondrial respiratory chain complex I deficiency due to a non-coding mutation in complex I assembly factor NDUFA6. *Hum Mol Genet* 2016.
187. Hodgson U, Pulkkinen V, Dixon M, Peyrard-Janvid M, Rehn M, Lahermo P, Ollikainen V, Salmenkivi K, Kinnula V, Kere J, Tukiainen P, Laitinen T. ELMOD2 is a candidate gene for familial idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Hum Genet* 2006; 79(1): 149-154.
188. Pulkkinen V, Bruce S, Rintahaka J, Hodgson U, Laitinen T, Alenius H, Kinnula VL, Myllarniemi M, Matikainen S, Kere J. ELMOD2, a candidate gene for idiopathic pulmonary fibrosis, regulates antiviral responses. *FASEB J* 2010; 24(4): 1167-1177.
189. Borie R, Crestani B, Dieude P, Nunes H, Allanore Y, Kannengiesser C, Airo P, Matucci-Cerinic M, Wallaert B, Israel-Biet D, Cadranet J, Cottin V, Gazal S, Peljto AL, Varga J, Schwartz DA, Valeyre D, Grandchamp B. The MUC5B variant is associated with idiopathic pulmonary fibrosis but not with systemic sclerosis interstitial lung disease in the European Caucasian population. *PLoS One* 2013; 8(8): e70621.
190. Horimasu Y, Hattori N, Ishikawa N, Tanaka S, Bonella F, Ohshimo S, Guzman J, Costabel U, Kohno N. MUC5B promoter polymorphism is significantly associated with idiopathic interstitial pneumonia in German but not in Japanese patients. *Eur Respir J* 2013; 42(S57): 475s.
191. Horimasu Y, Ohshimo S, Bonella F, Tanaka S, Ishikawa N, Hattori N, Kohno N, Guzman J, Costabel U. MUC5B promoter polymorphism in Japanese patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respirology* 2015; 20(3): 439-444.
192. Peljto AL, Selman M, Kim DS, Murphy E, Tucker L, Pardo A, Lee JS, Ji W, Schwarz MI, Yang IV, Schwartz DA, Fingerlin TE. The MUC5B promoter polymorphism is associated with idiopathic pulmonary fibrosis in a Mexican cohort but is rare among Asian ancestries. *Chest* 2015; 147(2): 460-464.
193. Wang C, Zhuang Y, Guo W, Cao L, Zhang H, Xu L, Fan Y, Zhang D, Wang Y. Mucin 5B promoter polymorphism is associated with susceptibility to interstitial lung diseases in Chinese males. *PLoS One* 2014; 9(8): e104919.
194. Stock CJ, Sato H, Fonseca C, Banya WA, Molyneaux PL, Adamali H, Russell AM, Denton CP, Abraham DJ, Hansell DM, Nicholson AG, Maher TM, Wells AU, Lindahl GE, Renzoni EA. Mucin 5B promoter polymorphism is associated with idiopathic pulmonary fibrosis but not with development of lung fibrosis in systemic sclerosis or sarcoidosis. *Thorax* 2013; 68(5): 436-441.
195. Nakano Y, Yang IV, Walts AD, Watson AM, Helling BA, Fletcher AA, Lara AR, Schwarz MI, Evans CM, Schwartz DA. MUC5B Promoter Variant rs35705950 Affects MUC5B Expression in the Distal Airways in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2016; 193(4): 464-466.
196. Plantier L, Crestani B, Wert SE, Dehoux M, Zweytick B, Guenther A, Whittsett JA. Ectopic respiratory epithelial cell differentiation in bronchiolised distal airspaces in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 2011; 66(8): 651-657.
197. Chung JH, Chawla A, Peljto AL, Cool CD, Groshong SD, Talbert JL, McKean DF, Brown KK, Fingerlin TE, Schwarz MI, Schwartz DA, Lynch DA. CT scan findings of probable usual interstitial pneumonitis have a high predictive value for histologic usual interstitial pneumonitis. *Chest* 2015; 147(2): 450-459.
198. Chung JH, Peljto AL, Chawla A, Talbert JL, McKean DF, Rho BH, Fingerlin TE, Schwarz MI, Schwartz DA, Lynch DA. CT Imaging Phenotypes of Pulmonary Fibrosis in the MUC5B Promoter Site Polymorphism. *Chest* 2016; 149(5): 1215-1222.
199. Conti C, Montero-Fernandez A, Borg E, Osadolor T, Viola P, De Lauretis A, Stock CJ, Bonifazi M, Bonini M, Caramori G, Lindahl G, Blasi FB, Nicholson AG, Wells AU, Sestini P, Renzoni E. Mucins MUC5B and MUC5AC in Distal Airways and Honeycomb Spaces: Comparison among Idiopathic Pulmonary

Fibrosis/Usual Interstitial Pneumonia, Fibrotic Nonspecific Interstitial Pneumonitis, and Control Lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 2016: 193(4): 462-464.

200. Roy MG, Livraghi-Butrico A, Fletcher AA, McElwee MM, Evans SE, Boerner RM, Alexander SN, Bellinghausen LK, Song AS, Petrova YM, Tuvim MJ, Adachi R, Romo I, Bordt AS, Bowden MG, Sisson JH, Woodruff PG, Thornton DJ, Rousseau K, De la Garza MM, Moghaddam SJ, Karmouty-Quintana H, Blackburn MR, Drouin SM, Davis CW, Terrell KA, Grubb BR, O'Neal WK, Flores SC, Cota-Gomez A, Lozupone CA, Donnelly JM, Watson AM, Hennessy CE, Keith RC, Yang IV, Barthel L, Henson PM, Janssen WJ, Schwartz DA, Boucher RC, Dickey BF, Evans CM. Muc5b is required for airway defence. *Nature* 2014: 505(7483): 412-416.

201. Roy MG, Livraghi-Butrico A, Fletcher AA, McElwee MM, Evans SE, Boerner RM, Alexander SN, Bellinghausen LK, Song AS, Petrova YM, Tuvim MJ, Adachi R, Romo I, Bordt AS, Bowden MG, Sisson JH, Woodruff PG, Thornton DJ, Rousseau K, De la Garza MM, Moghaddam SJ, Karmouty-Quintana H, Blackburn MR, Drouin SM, Davis CW, Terrell KA, Grubb BR, O'Neal WK, Flores SC, Cota-Gomez A, Lozupone CA, Donnelly JM, Watson AM, Hennessy CE, Keith RC, Yang IV, Barthel L, Henson PM, Janssen WJ, Schwartz DA, Boucher RC, Dickey BF, Evans CM. Muc5b is required for airway defence. *Nature* 2013.

202. Molyneaux PL, Cox MJ, Willis-Owen SA, Mallia P, Russell KE, Russell AM, Murphy E, Johnston SL, Schwartz DA, Wells AU, Cookson WO, Maher TM, Moffatt MF. The role of bacteria in the pathogenesis and progression of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2014: 190(8): 906-913.

203. Molyneaux PL, Willis Owen SA, Cox MJ, James P, Cowman S, Loebinger M, Blanchard A, Edwards LM, Stock C, Daccord C, Renzoni EA, Wells AU, Moffatt MF, Cookson WO, Maher TM. Host-Microbial Interactions in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2017.

204. Shulgina L, Cahn AP, Chilvers ER, Parfrey H, Clark AB, Wilson EC, Twentyman OP, Davison AG, Curtin JJ, Crawford MB, Wilson AM. Treating idiopathic pulmonary fibrosis with the addition of co-trimoxazole: a randomised controlled trial. *Thorax* 2013: 68(2): 155-162.

205. Peljto AL, Zhang Y, Fingerlin TE, Ma SF, Garcia JG, Richards TJ, Silveira LJ, Lindell KO, Steele MP, Loyd JE, Gibson KF, Seibold MA, Brown KK, Talbert JL, Markin C, Kossen K, Seiwert SD, Murphy E, Noth I, Schwarz MI, Kaminski N, Schwartz DA. Association between the MUC5B promoter polymorphism and survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *JAMA* 2013: 309(21): 2232-2239.

206. Oldham JM, Ma SF, Martinez FJ, Anstrom KJ, Raghu G, Schwartz DA, Valenzi E, Witt L, Lee C, Vij R, Huang Y, Streck ME, Noth I, Investigators IP. TOLLIP, MUC5B, and the Response to N-Acetylcysteine among Individuals with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2015: 192(12): 1475-1482.

207. van der Vis JJ, Snetselaar R, Kazemier KM, ten Klooster L, Grutters JC, van Moorsel CH. Effect of Muc5b promoter polymorphism on disease predisposition and survival in idiopathic interstitial pneumonias. *Respirology* 2016: 21(4): 712-717.

208. Korthagen NM, van Moorsel CH, Kazemier KM, Ruven HJ, Grutters JC. IL1RN genetic variations and risk of IPF: a meta-analysis and mRNA expression study. *Immunogenetics* 2012: 64(5): 371-377.

209. Bournazos S, Grinfeld J, Alexander KM, Murchison JT, Wallace WA, McFarlane P, Hirani N, Simpson AJ, Dransfield I, Hart SP. Association of FcγRIIIa R131H polymorphism with idiopathic pulmonary fibrosis severity and progression. *BMC Pulm Med* 2010: 10: 51.

210. Korthagen NM, van Moorsel CH, Barlo NP, Kazemier KM, Ruven HJ, Grutters JC. Association between variations in cell cycle genes and idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One* 2012: 7(1): e30442.

211. Fingerlin TE, Murphy E, Zhang W, Peljto AL, Brown KK, Steele MP, Loyd JE, Cosgrove GP, Lynch D, Groshong S, Collard HR, Wolters PJ, Bradford WZ, Kossen K, Seiwert SD, du Bois RM, Garcia CK, Devine MS, Gudmundsson G, Isaksson HJ, Kaminski N, Zhang Y, Gibson KF, Lancaster LH, Cogan JD, Mason WR, Maher TM, Molyneaux PL, Wells AU, Moffatt MF, Selman M, Pardo A, Kim DS, Crapo JD, Make BJ, Regan EA, Walek DS, Daniel JJ, Kamatani Y, Zelenika D, Smith K, McKean D, Pedersen BS, Talbert J, Kidd RN, Markin CR, Beckman KB, Lathrop M, Schwarz MI, Schwartz DA. Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for pulmonary fibrosis. *Nat Genet* 2013: 45(6): 613-620.

212. Codd V, Nelson CP, Albrecht E, Mangino M, Deelen J, Buxton JL, Hottenga JJ, Fischer K, Esko T, Surakka I, Broer L, Nyholt DR, Mateo Leach I, Salo P, Hagg S, Matthews MK, Palmen J, Norata GD, O'Reilly PF, Saleheen D, Amin N, Balmforth AJ, Beekman M, de Boer RA, Bohringer S, Braund PS, Burton PR, de Craen AJ, Denniff M, Dong Y, Douroudis K, Dubinina E, Eriksson JG, Garlaschelli K, Guo D, Hartikainen AL, Henders AK, Houwing-Duistermaat JJ, Kananen L, Karssen LC, Kettunen J, Klopp N, Lagou V, van Leeuwen EM, Madden PA, Magi R, Magnusson PK, Mannisto S, McCarthy MI, Medland SE, Mihailov E, Montgomery GW, Oostra BA, Palotie A, Peters A, Pollard H, Pouta A, Prokopenko I, Ripatti S, Salomaa V, Suchiman HE, Valdes AM, Verweij N, Vinuela A, Wang X, Wichmann HE, Widen E, Willemsen G, Wright MJ, Xia K, Xiao X, van Veldhuisen DJ, Catapano AL, Tobin MD, Hall AS, Blakemore AI, van Gilst WH, Zhu H, Consortium C, Erdmann J, Reilly MP, Kathiresan S, Schunkert H, Talmud PJ, Pedersen NL, Perola M, Ouwehand W, Kaprio J, Martin NG, van Duijn CM, Hovatta I, Gieger C, Metspalu A, Boomsma DI, Jarvelin MR, Slagboom PE, Thompson JR, Spector TD, van der Harst P, Samani NJ. Identification of seven loci affecting mean telomere length and their association with disease. *Nat Genet* 2013; 45(4): 422-427, 427e421-422.
213. Spagnolo P, Cottin V. Genetics of idiopathic pulmonary fibrosis: from mechanistic pathways to personalised medicine. *J Med Genet* 2017; 54(2): 93-99.
214. Breitling LP, Yang R, Korn B, Burwinkel B, Brenner H. Tobacco-smoking-related differential DNA methylation: 27K discovery and replication. *Am J Hum Genet* 2011; 88(4): 450-457.
215. Rabinovich EI, Kapetanaki MG, Steinfeld I, Gibson KF, Pandit KV, Yu G, Yakhini Z, Kaminski N. Global methylation patterns in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One* 2012; 7(4): e33770.
216. Yang IV, Coldren CD, Leach SM, Seibold MA, Murphy E, Lin J, Rosen R, Neidermyer AJ, McKean DF, Groshong SD, Cool C, Cosgrove GP, Lynch DA, Brown KK, Schwarz MI, Fingerlin TE, Schwartz DA. Expression of cilium-associated genes defines novel molecular subtypes of idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 2013; 68(12): 1114-1121.
217. Dakhallah D, Batte K, Wang Y, Cantemir-Stone CZ, Yan P, Nuovo G, Mikhail A, Hitchcock CL, Wright VP, Nana-Sinkam SP, Piper MG, Marsh CB. Epigenetic regulation of miR-17~92 contributes to the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 187(4): 397-405.
218. Cho JH, Gelinis R, Wang K, Etheridge A, Piper MG, Batte K, Dakhallah D, Price J, Bornman D, Zhang S, Marsh C, Galas D. Systems biology of interstitial lung diseases: integration of mRNA and microRNA expression changes. *BMC Med Genomics* 2011; 4: 8.
219. Das S, Kumar M, Negi V, Pattnaik B, Prakash YS, Agrawal A, Ghosh B. MicroRNA-326 regulates profibrotic functions of transforming growth factor-beta in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014; 50(5): 882-892.
220. Borie R, Fabre A, Prost F, Marchal-Somme J, Lebtahi R, Marchand-Adam S, Aubier M, Soler P, Crestani B. Activation of somatostatin receptors attenuates pulmonary fibrosis. *Thorax* 2008; 63(3): 251-258.
221. Strong MA, Vidal-Cardenas SL, Karim B, Yu H, Guo N, Greider CW. Phenotypes in mTERT(+)/(-) and mTERT(-)/(-) mice are due to short telomeres, not telomere-independent functions of telomerase reverse transcriptase. *Mol Cell Biol* 2011; 31(12): 2369-2379.
222. Liu T, Yu H, Ding L, Wu Z, Gonzalez De Los Santos F, Liu J, Ullenbruch M, Hu B, Martins V, Phan SH. Conditional Knockout of Telomerase Reverse Transcriptase in Mesenchymal Cells Impairs Mouse Pulmonary Fibrosis. *PLoS One* 2015; 10(11): e0142547.
223. Liu T, Chung MJ, Ullenbruch M, Yu H, Jin H, Hu B, Choi YY, Ishikawa F, Phan SH. Telomerase activity is required for bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *J Clin Invest* 2007; 117(12): 3800-3809.
224. Povedano JM, Martinez P, Flores JM, Mulero F, Blasco MA. Mice with Pulmonary Fibrosis Driven by Telomere Dysfunction. *Cell Rep* 2015; 12(2): 286-299.
225. Naikawadi RP, Disayabutr S, Mallavia B, Donne ML, Green G, La JL, Rock JR, Looney MR, Wolters PJ. Telomere dysfunction in alveolar epithelial cells causes lung remodeling and fibrosis. *JCI Insight* 2016; 1(14): e86704.

226. Simeonova I, Jaber S, Draskovic I, Bardot B, Fang M, Bouarich-Bourimi R, Lejour V, Charbonnier L, Soudais C, Bourdon JC, Huerre M, Londono-Vallejo A, Toledo F. Mutant mice lacking the p53 C-terminal domain model telomere syndromes. *Cell Rep* 2013; 3(6): 2046-2058.
227. Webb JA, Armstrong J. Chronic idiopathic pulmonary fibrosis in a West Highland white terrier. *Can Vet J* 2002; 43(9): 703-705.
228. Miele A, Dhaliwal K, Du Toit N, Murchison JT, Dhaliwal C, Brooks H, Smith SH, Hirani N, Schwarz T, Haslett C, Wallace WA, McGorum BC. Chronic pleuropulmonary fibrosis and elastosis of aged donkeys: similarities to human pleuroparenchymal fibroelastosis. *Chest* 2014; 145(6): 1325-1332.
229. Syrja P, Heikkila HP, Lilja-Maula L, Krafft E, Clercx C, Day MJ, Ronty M, Myllarniemi M, Rajamaki MM. 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(2-3): 303-313.
230. Roels E, Couvreur T, Farnir F, Clercx C, Verschakelen J, Bolen G. Comparison between Sedation and General Anesthesia for High Resolution Computed Tomographic Characterization of Canine Idiopathic Pulmonary Fibrosis in West Highland White Terriers. *Vet Radiol Ultrasound* 2017.
231. Pellegrino R, Viegi G, Brusasco V, Crapo RO, Burgos F, Casaburi R, Coates A, van der Grinten CP, Gustafsson P, Hankinson J, Jensen R, Johnson DC, MacIntyre N, McKay R, Miller MR, Navajas D, Pedersen OF, Wanger J. Interpretative strategies for lung function tests. *Eur Respir J* 2005; 26(5): 948-968.
232. Le Guen T, Jullien L, Touzot F, Schertzer M, Gaillard L, Perderiset M, Carpentier W, Nitschke P, Picard C, Couillault G, Soulier J, Fischer A, Callebaut I, Jabado N, Londono-Vallejo A, de Villartay JP, Revy P. Human RTEL1 deficiency causes Hoyeraal-Hreidarsson syndrome with short telomeres and genome instability. *Hum Mol Genet* 2013; 22(16): 3239-3249.
233. <http://www.broadinstitute.org/gatk/guide/topic?name=best-practices>. [cited; Available from:
234. Soding J, Biegert A, Lupas AN. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res* 2005; 33(Web Server issue): W244-248.
235. Zhang Y. Interplay of I-TASSER and QUARK for template-based and ab initio protein structure prediction in CASP10. *Proteins*; 82 Suppl 2: 175-187.
236. Faure G, Revy P, Schertzer M, Londono-Vallejo A, Callebaut I. The C-terminal extension of human RTEL1, mutated in Hoyeraal-Hreidarsson syndrome, contains harmonin-N-like domains. *Proteins* 2014; 82(6): 897-903.
237. Jullien L, Kannengiesser C, Kermasson L, Cormier-Daire V, Leblanc T, Soulier J, Londono-Vallejo A, de Villartay JP, Callebaut I, Revy P. Mutations of the RTEL1 Helicase in a Hoyeraal-Hreidarsson Syndrome Patient Highlight the Importance of the ARCH Domain. *Hum Mutat* 2016; 37(5): 469-472.
238. Kannengiesser C, Borie R, Menard C, Reocreux M, Nitschke P, Gazal S, Mal H, Taille C, Cadranel J, Nunes H, Valeyre D, Cordier JF, Callebaut I, Boileau C, Cottin V, Grandchamp B, Revy P, Crestani B. Heterozygous RTEL1 mutations are associated with familial pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2015; 46(2): 474-485.
239. Borie R, Tabeze L, Thabut G, Nunes H, Cottin V, Marchand-Adam S, Prevot G, Tazi A, Cadranel J, Mal H, Wemeau-Stervinou L, Bergeron Lafaurie A, Israel-Biet D, Picard C, Reynaud Gaubert M, Jouneau S, Naccache JM, Mankikian J, Menard C, Cordier JF, Valeyre D, Reocreux M, Grandchamp B, Revy P, Kannengiesser C, Crestani B. Prevalence and characteristics of TERT and TERC mutations in suspected genetic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2016; 48(6): 1721-1731.
240. Cogan JD, Kropski JA, Zhao M, Mitchell DB, Rives L, Markin C, Garnett ET, Montgomery KH, Mason WR, McKean DF, Powers J, Murphy E, Olson LM, Choi L, Cheng DS, Blue EM, Young LR, Lancaster LH, Steele MP, Brown KK, Schwarz MI, Fingerlin TE, Schwartz DA, Lawson WE, Loyd JE, Zhao Z, Phillips JA, 3rd, Blackwell TS. Rare variants in RTEL1 are associated with familial interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2015; 191(6): 646-655.
241. Stuart BD, Choi J, Zaidi S, Xing C, Holohan B, Chen R, Choi M, Dharwadkar P, Torres F, Girod CE, Weissler J, Fitzgerald J, Kershaw C, Klesney-Tait J, Mageto Y, Shay JW, Ji W, Bilguvar K, Mane S, Lifton RP,

- Garcia CK. Exome sequencing links mutations in PARN and RTEL1 with familial pulmonary fibrosis and telomere shortening. *Nat Genet* 2015; 47(5): 512-517.
242. Juge PA, Borie R, Kannengiesser C, Gazal S, Revy P, Wemeau-Stervinou L, Debray MP, Ottaviani S, Marchand Adam S, Nathan N, Thabut G, Richez C, Nunes H, Callebaut I, Justet A, Leulliot N, Bonnefond A, Salgado D, Richette P, Desvignes JP, Liote H, Froguel P, Allanore Y, Sand O, Dromer C, Flipo RM, Clement A, Beroud C, Sibilia J, Coustet B, Cottin V, Boissier MC, Wallaert B, Schaevebeke T, Dastot Le Moal F, Frazier A, Menard C, Soubrier M, Saidenberg N, Valeyre D, Amselem S, Boileau C, Crestani B, Dieude P. Shared genetic predisposition in rheumatoid-interstitial lung disease and familial pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2017: *In press*.
243. Walne AJ, Vulliamy T, Kirwan M, Plagnol V, Dokal I. Constitutional mutations in RTEL1 cause severe dyskeratosis congenita. *Am J Hum Genet* 2013; 92(3): 448-453.
244. Ballew BJ, Yeager M, Jacobs K, Giri N, Boland J, Burdett L, Alter BP, Savage SA. Germline mutations of regulator of telomere elongation helicase 1, RTEL1, in Dyskeratosis congenita. *Hum Genet* 2013; 132(4): 473-480.
245. Nathan N, Borie R, Kannengiesser C, Dastot Le Moal F, Nunes H, Valeyre D, Reynaud-Gaubert M, Marchand-Adam S, Naccache JM, Prevot G, Delacourt C, Marguet C, Israel Biet D, Thumerelle C, Deschildre A, Reix P, Cottin V, Dalphin ML, Gondouin A, Picard C, Girault V, Legendre M, Gouya L, Crestani B, Amselem S, Clement A. Contribution of Mutations in Genes Encoding Proteins of the Surfactant Metabolism to Idiopathic Interstitial Pneumonia and Idiopathic Pulmonary Fibrosis in a Cohort of 265 Families. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2016; 193: A2605.
246. Newton CA, Batra K, Torrealba J, Kozlitina J, Glazer CS, Aravena C, Meyer K, Raghu G, Collard HR, Garcia CK. Telomere-related lung fibrosis is diagnostically heterogeneous but uniformly progressive. *Eur Respir J* 2016; 48(6): 1710-1720.
247. Petrovski S, Todd JL, Durham MT, Wang Q, Chien JW, Kelly FL, Frankel C, Mebane CM, Ren Z, Bridgers J, Urban TJ, Malone CD, Finlen Copeland A, Brinkley C, Allen AS, O'Riordan T, McHutchison JG, Palmer SM, Goldstein DB. An Exome Sequencing Study to Assess the Role of Rare Genetic Variation in Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2017.
248. Tokman S, Singer JP, Devine MS, Westall GP, Aubert JD, Tamm M, Snell GI, Lee JS, Goldberg HJ, Kukreja J, Golden JA, Leard LE, Garcia CK, Hays SR. Clinical outcomes of lung transplant recipients with telomerase mutations. *J Heart Lung Transplant* 2015.
249. Karimi-Shah BA, Chowdhury BA. Forced vital capacity in idiopathic pulmonary fibrosis--FDA review of pirfenidone and nintedanib. *N Engl J Med* 2015; 372(13): 1189-1191.
250. Stanley SE, Chen JJ, Podlevsky JD, Alder JK, Hansel NN, Mathias RA, Qi X, Rafaels NM, Wise RA, Silverman EK, Barnes KC, Armanios M. Telomerase mutations in smokers with severe emphysema. *J Clin Invest* 2015; 125(2): 563-570.
251. Cottin V, Nunes H, Brillet PY, Delaval P, Devouassoux G, Tillie-Leblond I, Israel-Biet D, Court-Fortune I, Valeyre D, Cordier JF. Combined pulmonary fibrosis and emphysema: a distinct underrecognised entity. *Eur Respir J* 2005; 26(4): 586-593.
252. Bousfiha A, Jeddane L, Al-Herz W, Ailal F, Casanova JL, Chatila T, Conley ME, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Franco JL, Gaspar HB, Holland SM, Klein C, Nonoyama S, Ochs HD, Oksenhendler E, Picard C, Puck JM, Sullivan KE, Tang ML. The 2015 IUIS Phenotypic Classification for Primary Immunodeficiencies. *J Clin Immunol* 2015; 35(8): 727-738.
253. Rose C, Kern WV. Another case of *Pneumocystis carinii* pneumonia in a patient with dyskeratosis congenita (Zinsser-Cole-Engman syndrome). *Clin Infect Dis* 1992; 15(6): 1056-1057.
254. Lee BW, Yap HK, Quah TC, Chong A, Seah CC. T cell immunodeficiency in dyskeratosis congenita. *Arch Dis Child* 1992; 67(4): 524-526.
255. Jyonouchi S, Forbes L, Ruchelli E, Sullivan KE. Dyskeratosis congenita: a combined immunodeficiency with broad clinical spectrum--a single-center pediatric experience. *Pediatr Allergy Immunol* 2011; 22(3): 313-319.

256. Zhu L, Hathcock KS, Hande P, Lansdorp PM, Seldin MF, Hodes RJ. Telomere length regulation in mice is linked to a novel chromosome locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(15): 8648-8653.
257. Deng Z, Glousker G, Molczan A, Fox AJ, Lamm N, Dheekollu J, Weizman OE, Schertzer M, Wang Z, Vladimirova O, Schug J, Aker M, Londono-Vallejo A, Kaestner KH, Lieberman PM, Tzfati Y. Inherited mutations in the helicase RTEL1 cause telomere dysfunction and Hoyeraal-Hreidarsson syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110(36): E3408-3416.
258. Wegner DJ, Hertzberg T, Heins HB, Elmberger G, MacCoss MJ, Carlson CS, Nogee LM, Cole FS, Hamvas A. A major deletion in the surfactant protein-B gene causing lethal respiratory distress. *Acta Paediatr* 2007; 96(4): 516-520.
259. Liu Y, Jesus AA, Marrero B, Yang D, Ramsey SE, Montealegre Sanchez GA, Tenbrock K, Wittkowski H, Jones OY, Kuehn HS, Lee CC, DiMattia MA, Cowen EW, Gonzalez B, Palmer I, DiGiovanna JJ, Biancotto A, Kim H, Tsai WL, Trier AM, Huang Y, Stone DL, Hill S, Kim HJ, St Hilaire C, Gurprasad S, Plass N, Chapelle D, Horkayne-Szakaly I, Foell D, Barysenka A, Candotti F, Holland SM, Hughes JD, Mehmet H, Issekutz AC, Raffeld M, McElwee J, Fontana JR, Minniti CP, Moir S, Kastner DL, Gadina M, Steven AC, Wingfield PT, Brooks SR, Rosenzweig SD, Fleisher TA, Deng Z, Boehm M, Paller AS, Goldbach-Mansky R. Activated STING in a vascular and pulmonary syndrome. *N Engl J Med* 2014; 371(6): 507-518.
260. Ballerie A, Nimubona S, Meunier C, Gutierrez FL, Desrues B, Delaval P, Jouneau S. Association of pulmonary alveolar proteinosis and fibrosis: patient with GATA2 deficiency. *Eur Respir J* 2016; 48(5): 1510-1514.
261. Kotsianidis I, Nakou E, Bouchliou I, Tzouveleakis A, Spanoudakis E, Steiropoulos P, Sotiriou I, Aidinis V, Margaritis D, Tsatalas C, Bouros D. Global impairment of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179(12): 1121-1130.
262. Mellanby RJ, Thomas DC, Lamb J. Role of regulatory T-cells in autoimmunity. *Clin Sci (Lond)* 2009; 116(8): 639-649.
263. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 2001; 27(1): 20-21.
264. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299(5609): 1057-1061.
265. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4(4): 330-336.
266. Kim CH. FOXP3 and its role in the immune system. *Adv Exp Med Biol* 2009; 665: 17-29.
267. Lee YH, Jung JH, Seo YH, Kim JH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Association between shortened telomere length and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Lupus* 2017; 26(3): 282-288.
268. Georgin-Lavialle S, Aouba A, Lepelletier Y, Gabet AS, Hermine O. [Telomeres and telomerase: relevance and future prospects in systemic lupus erythematosus]. *Rev Med Interne* 2010; 31(5): 345-352.
269. Schonland SO, Lopez C, Widmann T, Zimmer J, Bryl E, Goronzy JJ, Weyand CM. Premature telomeric loss in rheumatoid arthritis is genetically determined and involves both myeloid and lymphoid cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(23): 13471-13476.
270. Colmegna I, Diaz-Borjon A, Fujii H, Schaefer L, Goronzy JJ, Weyand CM. Defective proliferative capacity and accelerated telomeric loss of hematopoietic progenitor cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2008; 58(4): 990-1000.
271. Steer SE, Williams FM, Kato B, Gardner JP, Norman PJ, Hall MA, Kimura M, Vaughan R, Aviv A, Spector TD. Reduced telomere length in rheumatoid arthritis is independent of disease activity and duration. *Ann Rheum Dis* 2007; 66(4): 476-480.
272. Vogt S, Iking-Konert C, Hug F, Andrassy K, Hansch GM. Shortening of telomeres: Evidence for replicative senescence of T cells derived from patients with Wegener's granulomatosis. *Kidney Int* 2003; 63(6): 2144-2151.

273. Prescott J, Karlson EW, Orr EH, Zee RY, De Vivo I, Costenbader KH. A Prospective Study Investigating Prediagnostic Leukocyte Telomere Length and Risk of Developing Rheumatoid Arthritis in Women. *J Rheumatol* 2016; 43(2): 282-288.
274. von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci* 2002; 27(7): 339-344.
275. Fujii H, Shao L, Colmegna I, Goronzy JJ, Weyand CM. Telomerase insufficiency in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(11): 4360-4365.
276. Picard C, Belot A. [Type I interferonopathies. Literature review]. *Rev Med Interne* 2016.
277. Honore I, Nunes H, Groussard O, Kambouchner M, Chambellan A, Aubier M, Valeyre D, Crestani B. Acute respiratory failure after interferon-gamma therapy of end-stage pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167(7): 953-957.
278. Aubart F, Crestani B, Nicaise-Roland P, Tubach F, Bollet C, Dawidowicz K, Quintin E, Hayem G, Palazzo E, Meyer O, Chollet-Martin S, Dieude P. High levels of anti-cyclic citrullinated peptide autoantibodies are associated with co-occurrence of pulmonary diseases with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2011; 38(6): 979-982.
279. Costenbader KH, Karlson EW. Cigarette smoking and autoimmune disease: what can we learn from epidemiology? *Lupus* 2006; 15(11): 737-745.
280. Rangel-Moreno J, Hartson L, Navarro C, Gaxiola M, Selman M, Randall TD. Inducible bronchus-associated lymphoid tissue (iBALT) in patients with pulmonary complications of rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 2006; 116(12): 3183-3194.
281. Atkins SR, Turesson C, Myers JL, Tazelaar HD, Ryu JH, Matteson EL, Bongartz T. Morphologic and quantitative assessment of CD20+ B cell infiltrates in rheumatoid arthritis-associated nonspecific interstitial pneumonia and usual interstitial pneumonia. *Arthritis Rheum* 2006; 54(2): 635-641.
282. Jongmans MC, Verwiel ET, Heijdra Y, Vulliamy T, Kamping EJ, Hehir-Kwa JY, Bongers EM, Pfundt R, van Emst L, van Leeuwen FN, van Gassen KL, Geurts van Kessel A, Dokal I, Hoogerbrugge N, Ligtenberg MJ, Kuiper RP. Revertant somatic mosaicism by mitotic recombination in dyskeratosis congenita. *Am J Hum Genet* 2012; 90(3): 426-433.
283. Vulliamy TJ, Knight SW, Heiss NS, Smith OP, Poustka A, Dokal I, Mason PJ. Dyskeratosis congenita caused by a 3' deletion: germline and somatic mosaicism in a female carrier. *Blood* 1999; 94(4): 1254-1260.
284. Maryoung L, Yue Y, Young A, Newton CA, Barba C, van Oers NS, Wang RC, Garcia CK. Somatic mutations in telomerase promoter counterbalance germline loss-of-function mutations. *J Clin Invest* 2017; 127(3): 982-986.
285. Newton CA, Kozlitina J, Lines JR, Kaza V, Torres F, Garcia CK. Telomere length in patients with pulmonary fibrosis associated with chronic lung allograft dysfunction and post-lung transplantation survival. *J Heart Lung Transplant* 2017.
286. Suzuki T, Arumugam P, Sakagami T, Lachmann N, Chalk C, Sallese A, Abe S, Trapnell C, Carey B, Moritz T, Malik P, Lutzko C, Wood RE, Trapnell BC. Pulmonary macrophage transplantation therapy. *Nature* 2014; 514(7523): 450-454.
287. Xu J, Songyang Z, Liu D, Kim H. Analysis of Average Telomere Length in Human Telomeric Protein Knockout Cells Generated by CRISPR/Cas9. *Methods Mol Biol* 2017; 1587: 15-28.
288. Ribeil JA, Hacein-Bey-Abina S, Payen E, Magnani A, Semeraro M, Magrin E, Caccavelli L, Neven B, Bourget P, El Nemer W, Bartolucci P, Weber L, Puy H, Meritet JF, Grevent D, Beuzard Y, Chretien S, Lefebvre T, Ross RW, Negre O, Veres G, Sandler L, Soni S, de Montalembert M, Blanche S, Leboulch P, Cavazzana M. Gene Therapy in a Patient with Sickle Cell Disease. *N Engl J Med* 2017; 376(9): 848-855.
289. Hubert D, Chiron R, Camara B, Grenet D, Prevotat A, Bassinet L, Dominique S, Rault G, Macey J, Honore I, Kanaan R, Leroy S, Desmazes Dufeu N, Burgel PR. Real-life initiation of lumacaftor/ivacaftor combination in adults with cystic fibrosis homozygous for the Phe508del CFTR mutation and severe lung disease. *J Cyst Fibros* 2017.

290. Bernardes de Jesus B, Schneeberger K, Vera E, Tejera A, Harley CB, Blasco MA. The telomerase activator TA-65 elongates short telomeres and increases health span of adult/old mice without increasing cancer incidence. *Aging Cell* 2011; 10(4): 604-621.
291. Fauce SR, Jamieson BD, Chin AC, Mitsuyasu RT, Parish ST, Ng HL, Kitchen CM, Yang OO, Harley CB, Effros RB. Telomerase-based pharmacologic enhancement of antiviral function of human CD8+ T lymphocytes. *J Immunol* 2008; 181(10): 7400-7406.
292. Dow CT, Harley CB. Evaluation of an oral telomerase activator for early age-related macular degeneration - a pilot study. *Clin Ophthalmol* 2016; 10: 243-249.
293. Pearce VP, Sherrell J, Lou Z, Kopelovich L, Wright WE, Shay JW. Immortalization of epithelial progenitor cells mediated by resveratrol. *Oncogene* 2008; 27(17): 2365-2374.
294. Babizhayev MA, Yegorov YE. Telomere attrition in lens epithelial cells - a target for N-acetylcarnosine therapy. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2010; 15: 934-956.
295. Eitan E, Tichon A, Gazit A, Gitler D, Slavin S, Priel E. Novel telomerase-increasing compound in mouse brain delays the onset of amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO Mol Med* 2012; 4(4): 313-329.
296. Bersani FS, Lindqvist D, Mellon SH, Penninx BW, Verhoeven JE, Revesz D, Reus VI, Wolkowitz OM. Telomerase activation as a possible mechanism of action for psychopharmacological interventions. *Drug Discov Today* 2015; 20(11): 1305-1309.
297. Su X, Jiang X, Wang W, Wang H, Xu X, Lin A, Teng X, Wu H, Teng L. Association of telomerase reverse transcriptase promoter mutations with clinicopathological features and prognosis of thyroid cancer: a meta-analysis. *Onco Targets Ther* 2016; 9: 6965-6976.
298. Gudmundsson J, Thorleifsson G, Sigurdsson JK, Stefansdottir L, Jonasson JG, Gudjonsson SA, Gudbjartsson DF, Masson G, Johannsdottir H, Halldorsson GH, Stacey SN, Helgason H, Sulem P, Senter L, He H, Liyanarachchi S, Ringel MD, Aguillo E, Panadero A, Prats E, Garcia-Castano A, De Juan A, Rivera F, Xu L, Kiemeny LA, Eyjolfsson GI, Sigurdardottir O, Olafsson I, Kristvinsson H, Netea-Maier RT, Jonsson T, Mayordomo JI, Plantinga TS, Hjartarson H, Hrafnkelsson J, Sturgis EM, Thorsteinsdottir U, Rafnar T, de la Chapelle A, Stefansson K. A genome-wide association study yields five novel thyroid cancer risk loci. *Nat Commun* 2017; 8: 14517.
299. Yang P, Cai J, Yan W, Zhang W, Wang Y, Chen B, Li G, Li S, Wu C, Yao K, Li W, Peng X, You Y, Chen L, Jiang C, Qiu X, Jiang T, project C. Classification based on mutations of TERT promoter and IDH characterizes subtypes in grade II/III gliomas. *Neuro Oncol* 2016; 18(8): 1099-1108.
300. Marrone A, Sokhal P, Walne A, Beswick R, Kirwan M, Killick S, Williams M, Marsh J, Vulliamy T, Dokal I. Functional characterization of novel telomerase RNA (TERC) mutations in patients with diverse clinical and pathological presentations. *Haematologica* 2007; 92(8): 1013-1020.
301. Claustres M, Kozich V, Dequeker E, Fowler B, Hehir-Kwa JY, Miller K, Oosterwijk C, Peterlin B, van Ravenswaaij-Arts C, Zimmermann U, Zuffardi O, Hastings RJ, Barton DE, European Society of Human G. Recommendations for reporting results of diagnostic genetic testing (biochemical, cytogenetic and molecular genetic). *Eur J Hum Genet* 2014; 22(2): 160-170.
302. Stanley SE, Armanios M. The short and long telomere syndromes: paired paradigms for molecular medicine. *Curr Opin Genet Dev* 2015; 33: 1-9.
303. Kropski JA, Young LR, Cogan JD, Mitchell DB, Lancaster LH, Worrell JA, Markin C, Liu N, Mason WR, Fingerlin TE, Schwartz DA, Lawson WE, Blackwell TS, Phillips Iii JA, Loyd JE. Genetic Evaluation and Testing of Patients and Families with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2016; [Epub ahead of print].
304. Glousker G, Touzot F, Revy P, Tzfati Y, Savage SA. Unraveling the pathogenesis of Hoyeraal-Hreidarsson syndrome, a complex telomere biology disorder. *Br J Haematol* 2015; 170(4): 457-471.
305. Marchand-Adam S, Diot B, Magro P, De Muret A, Guignabert C, Kannengiesser C, Londono-Vallejo A, Draskovic I, Toutain A, Diot P. Pulmonary alveolar proteinosis revealing a telomerase disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 188(3): 402-404.

306. Du HY, Pumbo E, Manley P, Field JJ, Bayliss SJ, Wilson DB, Mason PJ, Bessler M. Complex inheritance pattern of dyskeratosis congenita in two families with 2 different mutations in the telomerase reverse transcriptase gene. *Blood* 2008; 111(3): 1128-1130.
307. Picard C, Thouvenin G, Kannengiesser C, Dubus JC, Jeremiah N, Rieux-Laucat F, Crestani B, Belot A, Thivolet-Bejui F, Secq V, Menard C, Reynaud-Gaubert M, Reix P. Severe Pulmonary Fibrosis as the First Manifestation of Interferonopathy (TMEM173 Mutation). *Chest* 2016; 150(3): e65-71.
308. Fingerlin TE, Zhang W, Yang IV, Ainsworth HC, Russell PH, Blumhagen RZ, Schwarz MI, Brown KK, Steele MP, Loyd JE, Cosgrove GP, Lynch DA, Groshong S, Collard HR, Wolters PJ, Bradford WZ, Kossen K, Seiwert SD, du Bois RM, Garcia CK, Devine MS, Gudmundsson G, Isaksson HJ, Kaminski N, Zhang Y, Gibson KF, Lancaster LH, Maher TM, Molyneaux PL, Wells AU, Moffatt MF, Selman M, Pardo A, Kim DS, Crapo JD, Make BJ, Regan EA, Walek DS, Daniel JJ, Kamatani Y, Zelenika D, Murphy E, Smith K, McKean D, Pedersen BS, Talbert J, Powers J, Markin CR, Beckman KB, Lathrop M, Freed B, Langefeld CD, Schwartz DA. Genome-wide imputation study identifies novel HLA locus for pulmonary fibrosis and potential role for auto-immunity in fibrotic idiopathic interstitial pneumonia. *BMC Genet* 2016; 17(1): 74.

ANNEXE 1 DEMANDE D'EXPLORATION MOLECULAIRE DES FORMES
GENETIQUES DE FIBROSES PULMONAIRES

ANNEXE 2 PREDISPOSITIONS GENETIQUES AUX PID ASSOCIEES A LA PR



CrossMark

Heterozygous *RTEL1* mutations are associated with familial pulmonary fibrosis

Caroline Kannengiesser^{1,2,16}, Raphael Borie^{3,16}, Christelle Ménard¹, Marion Réocreux¹, Patrick Nitschké^{2,4}, Steven Gazal^{2,5,6}, Hervé Mal⁷, Camille Taillé³, Jacques Cadranel^{8,9}, Hilario Nunes^{10,11}, Dominique Valeyre^{10,11}, Jean François Cordier^{12,13}, Isabelle Callebaut¹⁴, Catherine Boileau^{1,2}, Vincent Cottin^{12,13}, Bernard Grandchamp^{1,2}, Patrick Revy^{4,15} and Bruno Crestani^{2,3}

Affiliations: ¹APHP Service de Génétique, Hôpital Bichat, Paris, France. ²Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France. ³APHP, Hôpital Bichat, Service de Pneumologie A, DHU FIRE Centre de compétence des maladies pulmonaires rares, Paris, France. ⁴Imagine Institute, Paris, France. ⁵Inserm, IAME, UMR 1137, Paris, France. ⁶Plateforme de Génétique constitutionnelle-Nord (PFGC-Nord), Paris, France. ⁷APHP Service de Pneumologie B, Hôpital Bichat, Paris, France. ⁸APHP, Service de Pneumologie, Centre de compétence des maladies pulmonaires rares, Hôpital Tenon, Paris, France. ⁹Université Paris 6, Paris, France. ¹⁰APHP, Service de Pneumologie, Hôpital Avicenne, Centre de Compétence des Maladies Pulmonaires Rares, Bobigny, France. ¹¹Université Paris 13, Paris, France. ¹²Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France. ¹³Service de Pneumologie, Centre national de référence des maladies pulmonaires rares, Hôpital Louis Pradel, Lyon, France. ¹⁴IMPMC, Sorbonne Universités - UPMC Univ Paris 06, UMR CNRS 7590, Museum National d'Histoire Naturelle, IRD UMR 206, IUC, Paris, France. ¹⁵Laboratory of Genome Dynamics in the Immune System, INSERM UMR1163, Université Paris Descartes Sorbonne Paris Cité, Institut Imagine, Paris, France. ¹⁶These authors contributed equally to this work.

Correspondence: Caroline Kannengiesser, Hôpital Bichat, Service de Génétique, 46 rue Henri Huchard, 75018 Paris, France. E-mail: caroline.kannengiesser@bch.aphp.fr

ABSTRACT Pulmonary fibrosis is a fatal disease with progressive loss of respiratory function. Defective telomere maintenance leading to telomere shortening is a cause of pulmonary fibrosis, as mutations in the telomerase component genes *TERT* (reverse transcriptase) and *TERC* (RNA component) are found in 15% of familial pulmonary fibrosis (FPF) cases. However, so far, about 85% of FPF remain genetically uncharacterised.

Here, in order to identify new genetic causes of FPF, we performed whole-exome sequencing, with a candidate-gene approach, of 47 affected subjects from 35 families with FPF without *TERT* and *TERC* mutations.

We identified heterozygous mutations in regulator of telomere elongation helicase 1 (*RTEL1*) in four families. *RTEL1* is a DNA helicase with roles in DNA replication, genome stability, DNA repair and telomere maintenance. The heterozygous *RTEL1* mutations segregated as an autosomal dominant trait in FPF, and were predicted by structural analyses to severely affect the function and/or stability of *RTEL1*. In agreement with this, *RTEL1*-mutated patients exhibited short telomeres in comparison with age-matched controls.

Our results provide evidence that heterozygous *RTEL1* mutations are responsible for FPF and, thereby, extend the clinical spectrum of *RTEL1* deficiency. Thus, *RTEL1* enlarges the number of telomere-associated genes implicated in FPF.



@ERSpublications

Whole-exome sequencing reveals heterozygous *RTEL1* mutations in familial pulmonary fibrosis with short telomeres <http://ow.ly/LHvor>

For editorial comments see *Eur Respir J* 2015; 46: 312–314 [DOI: 10.1183/13993003.00710-2015]

This article has supplementary material available from erj.ersjournals.com

Received: March 12 2015 | Accepted after revision: April 11 2015 | First published online: May 28 2015

Support statement: This work (exome sequencing) was supported by a grant “FPI-SPC” from Université Sorbonne Paris Cité and the Chancellerie des Universités de Paris (legs Poix). P. Revy and I. Callebaut are supported by institutional grants from INSERM, Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe Labellisée La Ligue), INCa/Cancéropôle Ile de France, Institut Imagine and the European Research Council (PIDIMMUN grant number 249816). P. Revy is a scientist from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

Conflict of interest: Disclosures can be found alongside the online version of this article at erj.ersjournals.com

Copyright ©ERS 2015

Introduction

Pulmonary fibrosis is a general term used to describe a group of fibrosing interstitial lung diseases (ILDs) characterised by accumulation of extracellular matrix and fibroblasts in the distal lung. Pulmonary fibrosis can result from environmental exposures such as inhalation of fibrogenic dust or aerosolised organic antigens, drug toxicity, or systemic diseases such as connective tissue diseases, or occur as an isolated, sporadic disease without extrapulmonary involvement (idiopathic interstitial pneumonia). Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is the most frequent (60%) and severe presentation, with a median age at diagnosis of 66 years and median survival of 3–5 years [1, 2].

Most cases of pulmonary fibrosis are sporadic and occur in people with no familial history of the disorder, but the occurrence of pulmonary fibrosis in two or more members of the same family is increasingly recognised and accounts for 5–10% of cases. The most frequent pattern of genetic transmission of pulmonary fibrosis is autosomal dominance. Familial and sporadic pulmonary fibrosis diseases are clinically and histologically indistinguishable, but familial pulmonary fibrosis (FPF) tends to present at an earlier age and might differ slightly in radiological pattern [3].

FPF has been linked to mutations in two main groups of genes [4] involved in surfactant metabolism (*SFTPC* (surfactant protein C), *SFTPA2* (surfactant protein A2) and *ABCA3* (ATP-binding cassette subfamily A, member 3) [5, 6]) or telomere maintenance (*TERT* (reverse transcriptase), *TERC* (RNA component), *DKC1* (dyskerin) and *TINF2* (TRF1-interacting nuclear protein 2 (TIN2)) [7–10]). Mutations of *SFTPC* have rarely been described in FPF [11] and no pathogenic variants of *SFTPC* were found in 73 Newfoundland probands [12]. Heterozygous mutations of *TERT* are the most frequently evidenced mutations, observed in about 15% of FPF, while heterozygous mutations of *TERC* are more rare (a few per cent) [7, 8, 12]. *DKC1* represents the third telomere-related gene recently identified as a genetic cause of FPF in two male probands [13]. Notably, *TERT*, *TERC* and *DKC1* mutations were primarily described being as responsible for dyskeratosis congenita, a bone marrow failure disease associated with short telomeres. Interestingly, more recently, pulmonary disease is found in about 20% of dyskeratosis congenita patients with mutations in *TERT*, *TERC*, *DKC1* and *TINF2* [10, 14], further arguing for a link between telomere deficiency and IPF pathogenesis. As short telomeres are a hallmark of many IPF cases, genes involved in telomere maintenance can be theoretically considered as candidates for IPF. Overall, mutations are identified in about 15% of FPF cases, whereas 85% of cases remain genetically uncharacterised. To uncover new molecular causes of FPF, we performed whole-exome sequencing (WES) analysis of 47 patients from 35 families featuring FPF but without *TERT* and *TERC* mutations. We identified heterozygous mutations in regulator of telomere elongation helicase 1 (*RTEL1*) in four patients (10% of FPF families), identifying *RTEL1* deficiency as a major genetic cause of FPF in our cohort. *RTEL1* is an ATP-dependent DNA helicase [15] that participates in DNA replication, genome stability, DNA repair and telomere maintenance [16]. Very recently, using the same approach, COGAN *et al.* [17] identified heterozygous mutations of *RTEL1* in nine FPF families. Furthermore, a locus containing *RTEL1* has been associated with mean telomere length [18]. Our findings reinforce the link between telomere maintenance and lung fibrosis, and suggest that mutations in genes implicated in telomere maintenance may collectively account for up to 25% of cases of FPF.

Methods

Subjects

200 probands with FPF and their relatives were referred for molecular exploration of *TERT* and *TERC* genes by rare pulmonary disease expert centres in France from 2008 to 2013. The genetics department of Bichat hospital was the only French laboratory that performed this genetic test during this period. All patients gave signed consent for genetic analysis including for research. An institutional review board of the French learned society for respiratory medicine, Société de Pneumologie de Langue française, approved the study protocol. By bidirectional Sanger sequencing, we identified 22 heterozygous *TERT* mutations in 24 patient and four heterozygous variations of *TERC* in six patients [19]. *TERT* and *TERC* mutations were ruled out in 170 probands from 170 independent families. As an exploratory step, we selected 35 “unexplained” families without mutations identified within the telomerase complex for WES analysis. The clinical charts for patients were reviewed and data were collected on a standardised, anonymised collection form. Clinical data, chest computed tomography (CT) scan and lung histology findings were systematically reviewed, analysed by a multidisciplinary team, and classified according to the 2011 American Thoracic Society (ATS)/European Respiratory Society (ERS)/Japanese Respiratory Society/Latin American Thoracic Society statement on IPF and the 2013 ATS/ERS classification of idiopathic interstitial pneumonias [2, 20]. Families with the largest number of affected cases were included and/or families with a DNA sample available for several affected individuals in order to retain the variants that cosegregate between both individuals. 35 unexplained families of European origin were selected for exome sequencing analysis according to several criteria: confirmation of FPF (at least two cases of pulmonary fibrosis), and availability of clinical data, chest CT scan and lung histology findings. For 12 families among the 35

selected, a DNA sample was also available for another affected subject. The 35 unexplained families included 14 families with two known cases of pulmonary fibrosis, 17 families with three cases, three families with four cases, and one family with five cases. DNA of the 47 affected subjects (35 male and 10 female) were submitted for WES.

WES and bioinformatic analysis

Whole human exome sequencing was performed by Otogenetics (Norcross, GA, USA), which used Agilent V5 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) and PE Illumina HiSeq2000 (Illumina, San Diego, CA, USA) sequencing with an estimated 50-fold average coverage. Sequences were aligned to the reference human genome hg19 by using the Burrows–Wheeler Aligner. Downstream processing involved the Genome Analysis Toolkit (GATK) (<https://www.broadinstitute.org/gatk/>), SAMtools (www.htslib.org) and Picard (<http://broadinstitute.github.io/picard/>), following documented best practises [21]. Creation of variant calls involved the GATK Unified Genotyper. All variants were annotated with use of a software system developed by the Paris Descartes University Bioinformatics platform (Paris, France). The annotation process was based on the ENSEMBL v72 database (www.ensembl.org). Querying and filtering involved use of POLYWEB, an in-house bioinformatics tool (Imagine Institute, Université Paris Descartes). We combined WES with a candidate-gene approach to identify novel FPF genes.

RTEL1 variants were retained as disease-causing mutations according to several criteria: the absence or rare frequency of the mutations (<1%) in a database such as the Exome Variant Server (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) or 1000 Genome database (<http://browser.1000genomes.org/index.html>); the presence of rare variants in all affected individuals of several independent families; and prediction of the variants as being pathogenic based on structure prediction after molecular modelling (e.g. frameshift mutation; nonsynonymous mutation affecting a conserved amino acid, and predicted to affect the three-dimensional (3D) structure and the function of the protein).

Analysis of WES data from the 35 families confirmed the absence of mutations in *TERT* and *TERC*, and did not reveal any mutations in the telomerase-associated genes *DKC1* and *TINF2*, nor in the *SFTPC*, *SFTPA2* and *ABCA3* genes.

RTEL1 sequencing

To confirm the presence of mutations identified by WES of proband DNA and to study cosegregation of the mutation with the phenotype in families, we sequenced exons carrying *RTEL1* mutations by bidirectional fluorescent sequencing (primer sequences are available on request) and compared them to reference sequences for the two main *RTEL1* transcripts expressed in human cells [22] (1219 amino acid (aa) isoform: NM_016434.3/NP_057518.1; 1300-aa isoform: NM_032957.4/NP_116575.3), which differ in exons 34 and 35. For the cDNA sequence NM_032957.4, some sequence discrepancies exist between the reference databases.

Telomere length measurement

Telomere length was measured by telomeric restriction fragment (TRF) assay. Genomic DNA (800 ng) extracted from whole-blood cells was digested with *HinfI* and *RsaI* enzymes, resolved on a 0.7% agarose gel, transferred onto a nylon membrane, and hybridised using EasyHyb solution (Roche, Basel, Switzerland) with a γ -³²P-labelled (TTAGGG)₄ probe. After washes, telomere-probed Southern blots were exposed over a phosphorimager, and analysed with ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Digitised signal data were then transferred to Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) for calculating mean TRF length with the formula:

$$\text{Length} = \frac{\sum OD_i}{\sum \frac{OD_i}{L_i}}$$

where OD_{*i*} is the integrated signal intensity at position *i* and *L_{*i*}* is the length of the DNA fragment in position *i*. Healthy, age-matched controls (n=13) were recruited in France and gave consent. Measurement of telomere length of the controls was performed using anonymised DNA samples.

Molecular modelling and 3D structure visualisation

We used the sequence of the N-terminal Rad3-related DNA helicase core of *RTEL1* to search for similarities with known 3D structures using HH-PRED [23], Phyre2 [24] and I-TASSER [25]. Based on their results, we created a model of the 3D structure for this core, using Modeller v9.14 [26] and the *Thermoplasma acidophilum* XPD (taXPD) as a template (Protein Data Bank entries 2vsf and 4a15 [27, 28]; HH-PRED E-value 1.1×10⁻⁷⁴, Phyre 2 confidence 100 and I-TASSER C-score -0.73). Although the two sequences share only 21% sequence identity, the DNA helicase core is well conserved (see the online supplementary material

for the details of the alignment). The RTEL1 sequence displays some large insertions within loops not present in the archaeal template. Moreover, the alignment of archaeal XPD and eukaryotic RTEL1 ARCH domains displays higher sequence divergence, and could be refined only by using sensitive methods of alignment (our unpublished results). The quality of the 3D model was assessed by examining various structural features and stereochemical properties (data not shown). However, it should be noted that the variability between *Homo sapiens* RTEL1 and taXPD sequences did not affect the reliability of our analysis because mutations are in regions that are highly conserved between the two proteins (see the online supplementary material). The 3D structure model for the first harmonin-N-like domain was from FAURE *et al.* [29].

Results

Heterozygous RTEL1 mutations identified in FPF patients

To identify new genetic causes of FPF, we performed WES analysis of 47 patients with FPF from 35 families. Before performing the WES, Sanger sequencing had been used to exclude mutations of the main known FPF-associated genes, namely *TERT* and *TERC*. The filters and query used were rare variants predicted to be pathogenic in genes related to telomere biology. Thus, we identified heterozygous *RTEL1* mutations in four probands from four independent families (families A, B, C and D) (fig. 1a and table 1). Three of the four *RTEL1* mutations were missense mutations, corresponding in patient AII.2 to the c.146C>T, p.(Thr49Met) substitution in exon 3; in patient BII.1, to the c.637C>T, p.(Arg213Trp) substitution in exon 8; and in patient CII.2, to the c.2890T>p.(Phe964Leu) substitution in exon 30. The fourth *RTEL1* mutation, identified in patient DII.1, was the duplication of 1 bp in exon 33, leading to a frameshift and a premature stop codon (c.3493dupC, p.(Gln1165Profs*22)) (fig. 1b). The heterozygous amino acid change p.Phe964Leu found in patient CII.2 was previously reported in a homozygous state in a patient with Hoyeraal-Hreidarsson (HH) syndrome [30] with an alternative nomenclature based on a different *RTEL1* splice variant (c.2964T>G, p.(Phe988Leu)) and corresponding to a different nucleotide change (nomenclature in the 1219- and 1300-aa isoforms: 2890T>C in our patient and c.2892T>G in the

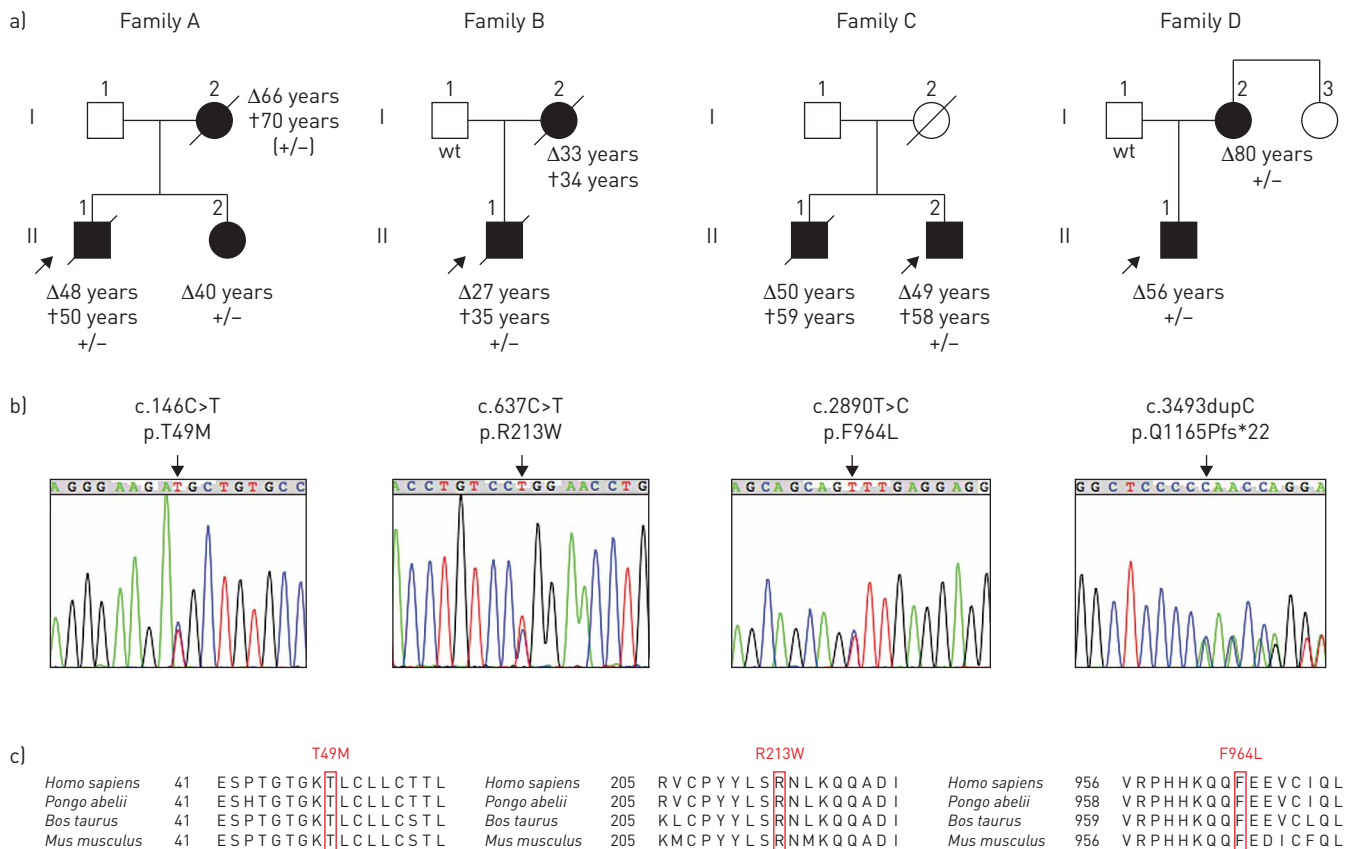


FIGURE 1 Segregation of regulator of telomere elongation helicase 1 (*RTEL1*) mutations in familial pulmonary fibrosis and conservation of altered *RTEL1* amino acids. a) Pedigree of four families with familial pulmonary fibrosis and heterozygous *RTEL1* mutation. Individuals with pulmonary fibrosis are indicated by black symbols. Heterozygosity for the mutation is indicated by +/- . The symbol +/- in parentheses indicates the obligate carrier. Δ: age at diagnosis; wt: wild-type status (not carrier of the mutation); †: age at death. b) Presence of *RTEL1* mutations confirmed by Sanger sequencing. c) Alignment generated with protein reference sequences: human (*Homo sapiens* RTEL1, RefSeq NP_116575.3/NP_057518.1); orangutan (*Pongo abelii* RTEL1, RefSeq NP_001124929); cow (*Bos taurus* RTEL1, RefSeq NP_001091044); mouse (*Mus musculus* RTEL1, RefSeq NP_001001882.3).

TABLE 1 Clinical data in families with familial pulmonary fibrosis and patients with mutations in regulator of telomere elongation helicase 1 (*RTEL1*)

Family	<i>RTEL1</i> mutation [#]	Individual	Age at presentation years	Sex	Smoking pack-years/fibrogenic exposure or aerocontaminants	Pulmonary function at presentation FVC/D _{lco} % predicted	Chest CT scan diagnosis	Other manifestations	Follow-up months	Status
A	c.146C>T, p.(Thr49Met)	I.2 [¶]	66	F	0/no	86/56	UIP pattern	Cyclophosphamide-induced neutropenia	48	Dead
		II.1 [*]	48	M	35/no	77/28	UIP pattern	Cyclophosphamide-induced neutropenia	21	Dead
		II.2 [*]	40	F	5/no	94/61	Possible UIP pattern	Sarcoidosis in remission	12	Alive
B	c.637C>T, p.(Arg213Trp)	I.2 [¶]	33	F	0/no	NA	NA	No	30	Dead
		II.1 [*]	27	M	2/mould	43/17	Possible UIP pattern	Osteopenia	69	Dead after lung transplantation
C	c.2890T>C, p.(Phe964Leu)	II.1 [¶]	50	M	30/no	72/67	Possible UIP pattern	Cholesteatoma	109	Dead
		II.2 [*]	49	M	30/painter	87/NA	UIP pattern	Rheumatoid arthritis Lung cancer	107	Dead
D	c.3493dupC, p.(Gln1165Profs*22)	I.2 [*]	80	F	0/no	60/NA	UIP pattern	Autoimmune hepatitis	64	Alive
		II.1 [*]	56	M	30/mould	63/50	Possible UIP pattern	Finger agenesis Short left femur	52	Alive

FVC: forced vital capacity; D_{lco}: diffusing capacity of the lung for carbon monoxide; CT: computed tomography; F: female; M: male; UIP: usual interstitial pneumonia; NA: not available. #: mutation nomenclature follows the recommended cDNA numbering (www.hgvs.org/mutnomen); the genomic locations of the p.(Thr49Met), p.(Arg213Trp), p.(Phe964Leu) and c.(3493dupC) mutations are Chr20 (Hg19/GRCh37) g.62292694, g.62298844, g.62324534 and g.62326565, respectively. ¶: confirmation by Sanger sequencing impossible because DNA and consent were not available for deceased patients. *: confirmation of the *RTEL1* mutation by Sanger sequencing.

previous patient [30]). Recently, biallelic mutations in *RTEL1* were reported in patients with HH syndrome, a severe variant of dyskeratosis congenita, characterised by early-onset bone-marrow failure, immunodeficiency and developmental defect associated with abnormally short telomeres [22, 30–33]. This clearly demonstrates the pathogenicity of the p.(Phe964Leu) mutation.

None of the four *RTEL1* mutations was present in the Exome Variant Server (>6500 individuals), in the 1000 Genomes (www.1000genomes.org) database or in our in-house database (4237 individuals). Moreover, the three *RTEL1* substitutions (p.(Thr49Met), p.(Arg213Trp) and p.(Phe964Leu)) were located in highly conserved regions (fig. 1c) and predicted to be highly deleterious by prediction tools for amino acid substitutions such as Polyphen-2 [34], SIFT [35] and MutationTaster [36]. Combined annotation-dependent depletion score analysis was also performed for each mutation and high scores were obtained in favour of a conclusion of pathogenic mutations (online supplementary material). Genomic evolutionary rate profiling to assess conservation of the regions targeted by the mutations showed that nucleotides targeted by missense mutations are very conserved (online supplementary material).

Finally, we confirmed, by fluorescent sequencing, the cosegregation of the *RTEL1* mutations with the pulmonary fibrosis phenotype in the three families with affected available first-degree relatives (that were not first included in the exome sequencing project because they were not available at that time) (fig. 1a). The genetic hypothesis in family B was that the disease-causing mutation was dominantly transmitted by the affected mother (BI.2) but she could not be analysed because of a lack of biological material. As expected, the healthy father (BI.1) did not carry the p.(Arg213Trp) *RTEL1* mutation. Analysis of WES data for the four families carrying an *RTEL1* mutation confirmed the absence of mutations in *TERT* and *TERC*, as well as other genes involved in telomere maintenance and previously implicated in human diseases, such as *DKC1*, *TINF2* (encoding TIN2), *NOP10* (nucleolar protein 10), *NHP2* (encoding a ribonucleoprotein (RNP)), *WRAP53* (encoding telomerase and Cajal body protein 1) [14], *CTC1* (conserved telomere capping protein 1) [37] and *ACD* (encoding tripeptidyl peptidase 1) [38] (data not shown).

Clinical review

Clinical data were complete for eight out of nine patients with FPF from four families (fig. 1 and table 1). *RTEL1* mutation present in all six patients with available DNA samples.

Family A

The proband from family A was a 48-year-old male smoker with a diagnosis of IPF (fig. 2c). He initially received azathioprine, steroids and *N*-acetylcysteine. Azathioprine was well tolerated. An acute exacerbation of IPF was treated with steroids and cyclophosphamide. The patient presented with neutropenia ($<0.5 \text{ G}\cdot\text{L}^{-1}$) 1 week after the first infusion of cyclophosphamide, which resolved spontaneously. He died of pulmonary fibrosis progression 21 months after the initial diagnosis. His mother was a 66-year-old nonsmoker with a diagnosis of IPF. She received oral cyclophosphamide and steroids, and neutropenia developed ($<0.5 \text{ G}\cdot\text{L}^{-1}$), which resolved after cyclophosphamide was stopped. She received azathioprine without blood cytopenia and died of respiratory failure 48 months after the diagnosis. His sister was a 40-year-old smoker with stage 2 pulmonary sarcoidosis that was actually in remission but still presenting with interstitial pneumonia. The first CT scan of the sister showed micronodules with lymphatic distribution, which disappeared on further CT scanning, superimposed over basal subpleural reticulations and mild ground-glass opacities, which persisted on further CT scanning; an initial bronchial biopsy showed granulomas and bronchial biopsies were not further reassessed (fig. 2d). The patient was asymptomatic and received no treatment until 2 years of follow-up.

Family B

The proband from family B was a 27-year-old mild smoker with a diagnosis of IPF (possible usual interstitial pneumonia (UIP) pattern on CT, UIP pattern on lung biopsy). He received bosentan or placebo in the BUILD-3 trial. The patient had an acute exacerbation of IPF (fig. 2b) and underwent lung transplantation, then received combined therapy with mycophenolate mofetil, cyclosporin and corticosteroids. He developed chronic rejection and received a new transplant 19 months later, with rejection of the second graft. He died 51 and 69 months after the first lung transplantation and diagnosis, respectively. He did not have myelodysplasia. His mother was a 33-year-old nonsmoker, with, according to her family, lung fibrosis. Medical files were not available for review. The patient died of respiratory failure 30 months after the initial diagnosis.

Family C

The proband from family C was a 49-year-old male smoker with rheumatoid arthritis and lung involvement (UIP pattern on CT with emphysema in the upper lobes). He experienced a slow decline in lung function despite therapy with azathioprine and steroids, without cytopenia. Lung cancer (adenocarcinoma) developed. He died 107 months after the diagnosis of ILD.

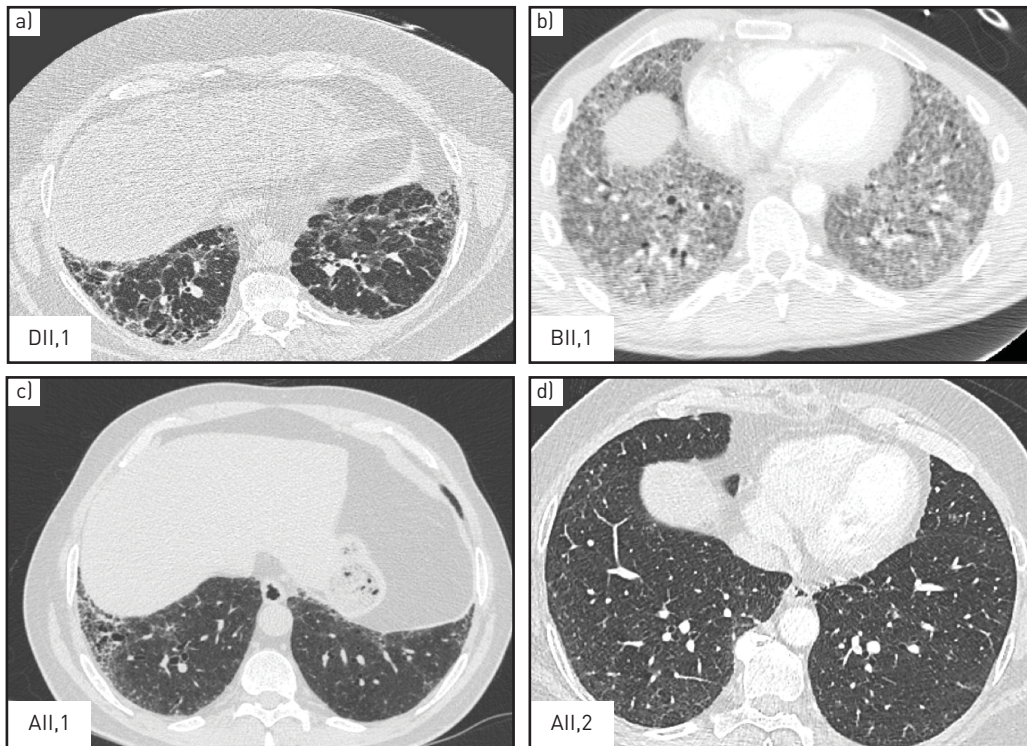


FIGURE 2 Thoracic computed tomography (CT) of four probands, heterozygous carriers of regulator of telomere elongation helicase 1 (*RTEL1*) mutations. a) Subpleural, basal predominance of reticular abnormalities without honeycombing, considered a possible usual interstitial pneumonia (UIP) pattern. b) CT image obtained during acute exacerbation showing new ground-glass infiltrates superimposed on reticular abnormalities, considered acute exacerbation of possible UIP. c) Subpleural, basal predominance of reticular abnormalities and honeycombing with traction bronchiectasis, classified as definite UIP pattern. d) Small bilateral micronodules, subpleural reticulations and ground-glass opacities without predominance, considered an atypical UIP pattern.

His brother was a 50-year-old smoker with lung fibrosis (possible UIP pattern on CT, lung biopsy not performed). He received corticosteroids and experienced a slow decline of lung function. He had an acute exacerbation but did not receive specific therapy and died 109 months after the diagnosis of lung fibrosis. Their father presented digital clubbing but his pulmonary status was unknown.

Family D

The proband from family D was a 56-year-old male smoker with lung fibrosis and a possible UIP pattern on CT scan (fig. 2a); lung biopsy was not performed. He presented skeletal abnormalities: agenesis of two fingers on the left hand and three fingers on the right hand, and a 10-cm shorter left femur. He experienced a slow decline of lung function despite receiving nintedanib or placebo in the TOMORROW trial, then pirfenidone. Lung transplantation was not considered because of coronary artery disease and obesity. He was alive 52 months after diagnosis. His mother was an 80-year-old nonsmoker. She had lung fibrosis with a UIP pattern on CT and autoimmune hepatitis. The diagnosis of autoimmune hepatitis was confirmed by cytolysis, the presence of autoantibodies (anti-RNP, anti-smooth muscle and anti-nuclear) and polyclonal hypergammaglobulinaemia. She received azathioprine and did not present with cytopenia but experienced a slow decline of lung function until the last follow-up 64 months after diagnosis. Neither the mother nor the two daughters of the proband, who all carried the mutation, presented skeletal abnormalities.

Predicted impact of *RTEL1* mutations on protein structure and function

RTEL1 belongs to the subclass of iron–sulfur cluster-containing DNA helicases within the SF2 DEAH subfamily including XPD (xeroderma pigmentosum), FANCI (Fanconi anaemia) and ChlR1 (Warsaw breakage syndrome) [39–42]. Common to all proteins of this family is an N-terminal Rad3-related DNA helicase core of four domains (two RecA-like motor domains; helicase domain (HD)1 and HD2; a 4Fe–4S cluster; and an ARCH domain) (fig. 3a). This catalytic core is followed by an *RTEL1*-specific C-terminal region that contains a tandem of harmonin-like domains that may have a critical role in interacting with yet-unidentified partners [43] as well as a RING finger domain, which is likely to have ubiquitin ligase

activity [22]. In addition, the C-terminal extension contains a proliferating-cell nuclear antigen (PCNA) interaction motif (PIP box) through which RTEL1 associates with the replisome [44].

Two of the described missense *RTEL1* mutations are located in the Rad3-related DNA helicase core and the third is located within the first harmonin-like domain (fig. 3a).

p.Phe964 (p.F964) belongs to the fifth α -helix of the first harmonin-like domain (fig. 3b). It corresponds to a highly conserved position within harmonin-N-like domains, which is always occupied by an aromatic amino acid (phenylalanine or tyrosine [29]). It is conserved for structural reasons, because its side-chain is buried within the core of the domain. The substitution of this aromatic amino acid with leucine (p.F964L) may

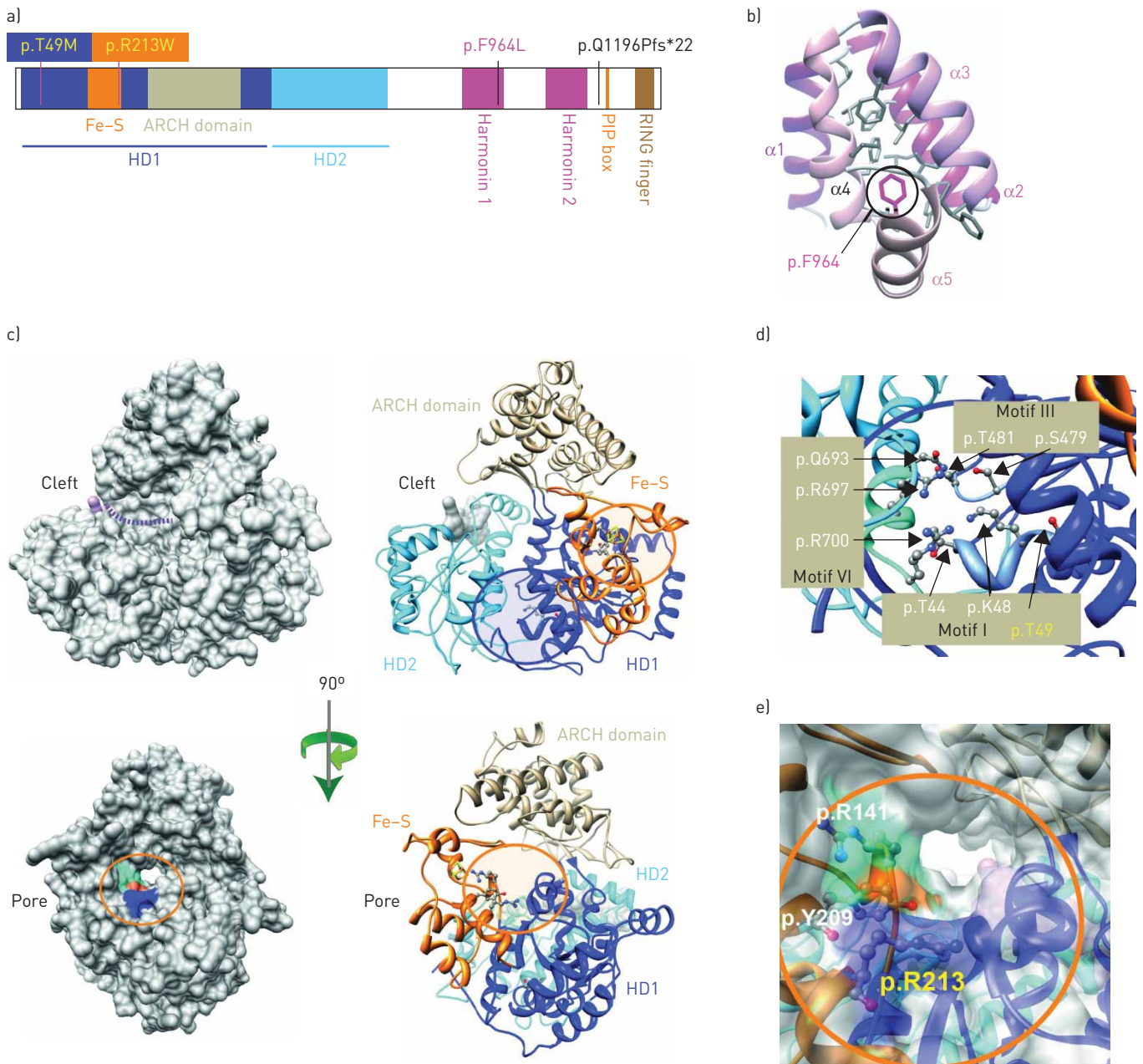


FIGURE 3 Molecular modelling of regulator of telomere elongation helicase 1 (*RTEL1*) missense mutations. a) Schematic representation of *RTEL1* protein, highlighting the domain architecture and the position of mutations. b) Position of p.F964 on the model of the three-dimensional structure of the first harmonin-N-like domain [29]. The amino acid side-chains shown form the hydrophobic core; the hydrophobic character is conserved across the whole harmonin-N-like family. c) Two orthogonal views of the solvent-accessible surface and ribbon representations of the *RTEL1* catalytic core, highlighting the positions of the two mutated amino acids. A short DNA strand is represented as a reference within its binding cleft. The predicted translocation path (groove) leading to the pore is indicated by a purple dashed line. d) Enlarged ATP binding domain at the interface between helicase domain (HD)1 and HD2 (p.T49 position). e) Enlarged pore exit (p.R213 position).

directly affect the folding or fold stability, even though the hydrophobic character is not lost. The p.(Phe964Leu) mutation was reported in an HH patient, which demonstrates its deleterious impact on RTEL1 function [30].

p.Thr49 (p.T49) belongs to conserved helicase motif I (Walker A) within HD1 (figs 3c and d). This amino acid is located within the ATP-binding pocket near the magnesium ion, one amino acid downstream of p.K48, which binds the ATP γ -phosphate. Thus, the p.T49M mutation likely disrupts the catalytic activity of the helicase domain.

p.Arg213 (p.R213) is located at the end of the 4Fe–4S cluster, within the helix α 8. In the crystal structure of taXPD, this basic residue (corresponding to p.170K) is predicted to form a hydrogen bond with a sulfate molecule, together with the conserved p.Y209 and p.R141 (p.Y166 and p.R88, respectively, in taXPD). As observed in our 3D model of the RTEL1 catalytic core (figs 3c and e), p.R213, together with p.Y209 and p.R141, occupies a critical position within the basic groove at the exit of the pore created by the ARCH domain, HD1 and the Fe–S domain, which was suggested to be part of the path for the translocated DNA [27]. The taXPD p.K170A mutation was associated with a large reduction (\sim 30-fold) in DNA binding, even when artefacts due to misfolding were ruled out [28]. This finding suggests that p.R123 in RTEL1 plays an active role within the path followed by single-stranded DNA, which stretches over the complete length of the protein from a cleft to the pore exit [28].

Patient DII.1 carried a mutation leading to a frameshift and a premature stop codon (p.Gln1165Profs*22). This mutation results in the expression of a truncated RTEL1 protein lacking the PIP box and RING finger domain [22]. Although the function of this RING domain is still unknown, a homozygous substitution mutation in this domain causes the HH syndrome, demonstrating its relevance for RTEL1 activity [33]. The importance of the PIP box has been demonstrated by accelerated senescence, replication fork instability, reduced replication fork extension rates and increased origin usage in mouse cells disrupted for RTEL1–PCNA interaction (PIP mutant) [44].

Overall, the structural analysis supported that the *RTEL1* mutations identified in FPF patients strongly affected the function and/or stability of the protein.

***RTEL1*-mutated FPF patients show shortened telomeres**

Knowing that RTEL1 participates in telomere maintenance [15], and that patients with HH syndrome and biallelic *RTEL1* mutations show shortened telomeres, we assessed the telomere length in FPF patients carrying a heterozygous *RTEL1* mutation. A TRF assay of DNA from whole-blood cells revealed shorter telomeres in *RTEL1*-mutated FPF patients than in 13 healthy age-matched controls (fig. 4a and b). The heterozygous *RTEL1* mutations identified in FPF patients may be associated with defective telomere maintenance.

Discussion

We performed WES analysis in a cohort of 47 patients from 35 families with unexplained familial FPF and found four (11%) out of 35 families to have heterozygous *RTEL1* mutations. All four *RTEL1* mutations identified in FPF patients were predicted to be highly detrimental to the function and/or stability of the protein. Indeed, one mutation leads to a frameshift and a premature stop codon, and three others modify highly conserved residues in functional domains of the protein. The p.(Phe964Leu) mutation identified in a heterozygous status in the two FPF patients from family C was recently reported in an homozygous status in two siblings with HH syndrome [30], demonstrating its pathogenicity. Moreover, the telomeres were shorter in *RTEL1*-mutated FPF patients than in controls, a phenotype previously observed in some heterozygous carriers of *RTEL1* mutations from families with HH syndrome [31, 32]. This finding confirms that RTEL1 tightly regulates telomere length [15, 18], and that *RTEL1* haploinsufficiency is sufficient to lead to telomere shortening and predispose to pulmonary disease. DENG *et al.* [32] reported pulmonary fibrosis in a 58-year-old male carrying a heterozygous *RTEL1* mutation and COGAN *et al.* [17] identified heterozygous mutations of *RTEL1* in nine FPF families.

A defect in telomere maintenance has been consistently observed in sporadic pulmonary fibrosis and FPF. Up to 25% of IPF patients and 40% of FPF patients exhibit shortened telomeres, only half of the FPF patients being carriers of *TERT* or *TERC* mutations [45, 46]; patients' short leukocyte telomeres are associated with worse survival in IPF [47]. In addition, four genes involved in telomere length regulation (*TERT*, *TERC*, *TINF2* and *DKC1* [7–10]) have been implicated in monogenic FPF. These genes were primarily identified as responsible for dyskeratosis congenita, a disease of bone-marrow failure associated with short telomeres. Pulmonary disease is found in about 20% of dyskeratosis congenita patients [10, 14]. Recently, homozygous mutant mice expressing a p53 lacking the C-terminal domain exhibited increased p53 activity and downregulation of *RTEL1*, had short telomeres, and suffered from aplastic anaemia and pulmonary fibrosis [48]. Our findings show that *RTEL1* deficiency could explain half of the unexplained FPF patients with shortened telomeres without identified genetic causes.

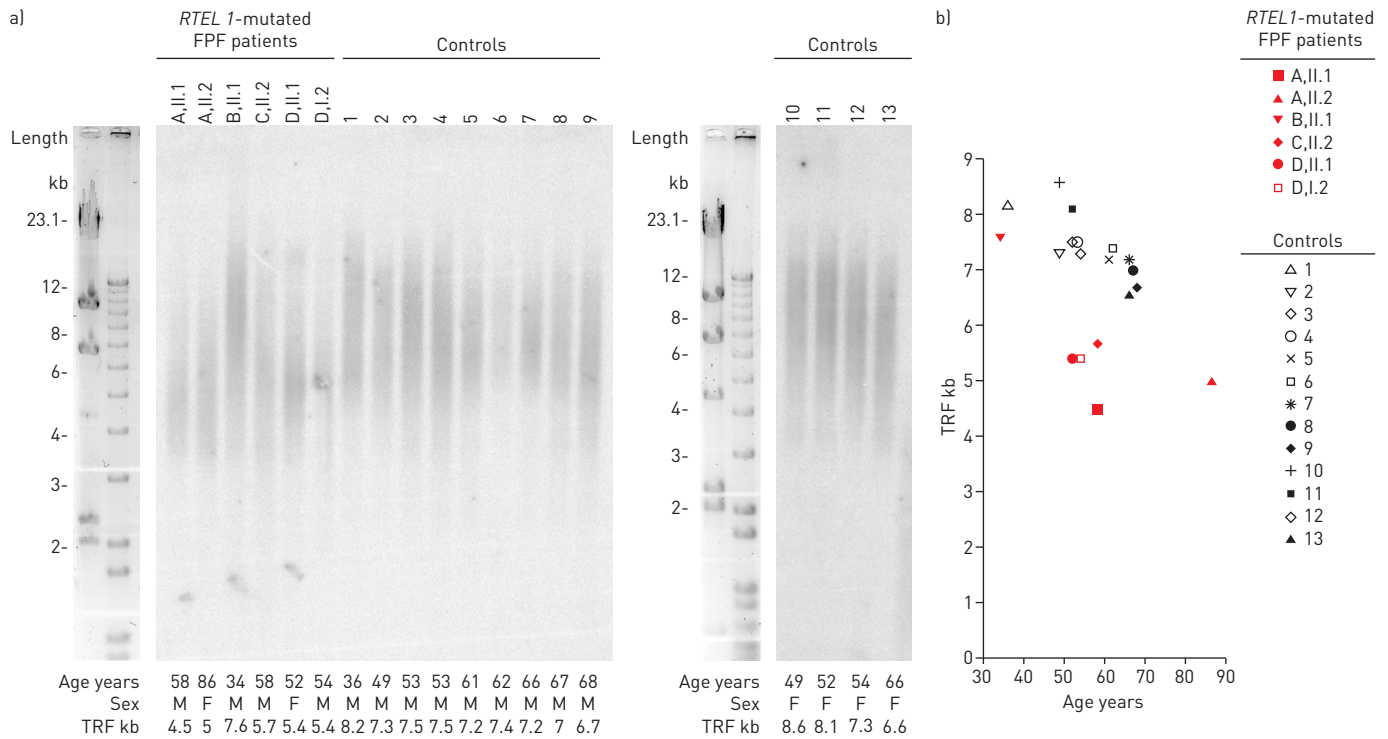


FIGURE 4 Telomere length in whole-blood cells from regulator of telomere elongation helicase 1 (*RTEL1*)-mutated patients with familial pulmonary fibrosis (FPF) and age-matched controls. a) The mean telomere length of whole-blood cells from patients with FPF and *RTEL1* mutations (A.II.1, A.II.2, B.II.1, C.II.2, D.II.1 and D.II.2) and 13 age-matched controls (1–13; 36–68 years old) estimated by the telomeric restriction fragment (TRF) method. The estimated mean TRF length is indicated, as is the sex and age of the individuals. b) TRF length by age of subjects.

As described in telomerase disease [49], all *RTEL1*-mutated FPF families showed a decrease in the age of onset of pulmonary disease through generations (genetic anticipation). Similar to *TERT* mutation carriers, in whom the median age at diagnosis is 57 years, the median age at diagnosis of pulmonary fibrosis for families A, C and D (excluding family B) was 56 years [50], whereas the mean age of patients with sporadic IPF is 65–70 years [1]. The diagnosis was made at a younger age in patients from family B than those from the other families. It cannot be excluded that other genetic factors may contribute to earlier disease occurrence. For example, digenism explains some Mendelian diseases [51].

Interestingly, six out of nine patients were smokers and/or were exposed to inhaled aerocontaminants. A similar high rate of exposure to smoking and fibrogenic contaminants has been reported in patients with lung fibrosis associated with *TERT* mutations [20, 50], and may insult the alveolar epithelium, initiating the fibrotic process. Hence, pulmonary disease in *RTEL1* heterozygous carriers may result from the combination of a genetic defect and environmental factors such as smoking.

At diagnosis, none of the patients in this series had comorbidities commonly associated with the telomere syndrome observed in *TERT*, *TERC* and *DKC1* mutation carriers, such as cryptogenic liver disease, thrombocytopenia, macrocytosis or hyperpigmented rash with an erythematous dyskeratotic rash [13, 52, 53]. In family D, we could not exclude that the liver disease would be related to *RTEL1* deficiency. However, early hair greying was not specifically assessed. Two patients had early reversible neutropenia after cyclophosphamide treatment, whereas azathioprine was well tolerated. *RTEL1* is a helicase involved in DNA repair. *Rtel1*-deficient mouse embryonic stem cells show higher sensitivity to DNA-altering agents such as methyl methanesulfonate and ultraviolet light [16]. These data suggest that some drugs, and particularly alkylating agents, should be used with caution in patients with *RTEL1* mutations. Myelodysplasia secondary to immunosuppressants was recently reported in patients with *TERT* or *TERC* mutations [54, 55].

Three patients presented with an autoimmune disease (autoimmune hepatitis and rheumatoid arthritis) or sarcoidosis, thus excluding idiopathic interstitial pneumonia. This could suggest that fibrosis results from the combination of a monogenic defect, environmental factors and autoimmune diseases in *RTEL1* heterozygous carriers. Determining whether mutations of genes associated with telomere maintenance may be connected with the development of lung fibrosis in autoimmune conditions requires further study because this finding may be due to chance. Alternatively, telomere shortening may promote the development of autoimmune diseases with ageing [56].

One patient had skeletal abnormalities, which could possibly be related to *RTEL1* mutations. Osteoporosis and osteonecrosis have been reported to be associated with *TERT* or *DKC* mutations [50, 57]. No skeletal phenotype was described in the *Rtel1*-deficient mouse, despite the lethality of the homozygous mutation in mice [15].

The phenotype–genotype cosegregation is complete in this study. However, identification of more *RTEL1* carriers is needed to evaluate the penetrance of pulmonary fibrosis in *RTEL1* mutation carriers. Penetrance may depend upon several factors, including environmental exposures, as described for pulmonary fibrosis caused by *TERT* and *TERC* mutations [50]. Interestingly, families of Ashkenazi Jewish ancestry had a recurrent *RTEL1*-associated HH mutation, at a high frequency of 1% [33, 58]. *RTEL1* mutation carriers in these families could be followed up to determine whether they are at risk of developing early-onset pulmonary disease. Despite these limitations, our results have major implications for genetic counselling of FPF and HH families with mutations in *RTEL1*. *RTEL1* mutation carriers may warrant follow-up by a pulmonologist and should be advised to avoid all of the aforementioned environmental exposures.

In conclusion, our study identifies heterozygous *RTEL1* mutations as a novel major genetic cause of FPF and broadens the clinical spectrum of *RTEL1* deficiency. Mutations in genes implicated in telomere maintenance may collectively account for up to 20–25% of cases of FPF.

Acknowledgements

We thank Laurent Abel (Imagine Institute, Paris, France) for advice about the variants analyses, Nathalie Moyal-Zafrani (Service de Génétique, Hôpital Bichat, Paris, France), Grégoire Prévot (Pneumologie, CHU de Toulouse, Toulouse, France) and Réza Azarian (Pneumologie, Hôpital Mignot, Le Chesnay, France) for collecting clinical charts for patients.

References

- Nathan SD, Shlobin OA, Weir N, *et al.* Long-term course and prognosis of idiopathic pulmonary fibrosis in the new millennium. *Chest* 2011; 140: 221–229.
- Travis WD, Costabel U, Hansell DM, *et al.* An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 188: 733–748.
- Spagnolo P, Grunewald J, du Bois RM. Genetic determinants of pulmonary fibrosis: evolving concepts. *Lancet Respir Med* 2014; 2: 416–428.
- Kropski JA, Blackwell TS, Loyd JE. The genetic basis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2015; 45: 1717–1727.
- Wang Y, Kuan PJ, Xing C, *et al.* Genetic defects in surfactant protein A2 are associated with pulmonary fibrosis and lung cancer. *Am J Hum Genet* 2009; 84: 52–59.
- Nathan N, Taam RA, Epaud R, *et al.* A national internet-linked based database for pediatric interstitial lung diseases: the French network. *Orphanet J Rare Dis* 2012; 7: 40.
- Tsakiri KD, Cronkhite JT, Kuan PJ, *et al.* Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 7552–7557.
- Armanios MY, Chen JJ, Cogan JD, *et al.* Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2007; 356: 1317–1326.
- Alder JK, Parry EM, Yegnasubramanian S, *et al.* Telomere phenotypes in females with heterozygous mutations in the dyskeratosis congenita 1 (*DKC1*) gene. *Hum Mutat* 2013; 34: 1481–1485.
- Fukuhara A, Tanino Y, Ishii T, *et al.* Pulmonary fibrosis in dyskeratosis congenita with *TINF2* gene mutation. *Eur Respir J* 2013; 42: 1757–1759.
- Kuse N, Abe S, Hayashi H, *et al.* Familial interstitial pneumonia in an adolescent boy with surfactant protein C gene (Y104H) mutation. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2013; 30: 73–77.
- Fernandez BA, Fox G, Bhatia R, *et al.* A Newfoundland cohort of familial and sporadic idiopathic pulmonary fibrosis patients: clinical and genetic features. *Respir Res* 2012; 13: 64.
- Kropski JA, Mitchell DB, Markin C, *et al.* A novel dyskerin (*DKC1*) mutation is associated with familial interstitial pneumonia. *Chest* 2014; 146: e1–e7.
- Dokal I. Dyskeratosis congenita. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program* 2011; 2011: 480–486.
- Ding H, Schertzer M, Wu X, *et al.* Regulation of murine telomere length by Rtel: an essential gene encoding a helicase-like protein. *Cell* 2004; 117: 873–886.
- Uringa EJ, Lisaingo K, Pickett HA, *et al.* *RTEL1* contributes to DNA replication and repair and telomere maintenance. *Mol Biol Cell* 2012; 23: 2782–2792.
- Cogan JD, Kropski JA, Zhao M, *et al.* Rare variants in *RTEL1* are associated with familial interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2015; 191: 646–655.
- Codd V, Nelson CP, Albrecht E, *et al.* Identification of seven loci affecting mean telomere length and their association with disease. *Nat Genet* 2013; 45: 422–427.
- Kannengiesser C, Revy P, Borie R, *et al.* Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis: 23 new mutations of *TERT* and *TERC*. *Eur J Hum Genet* 2013; 21: Suppl. 2, 451.
- Raghu G, Collard HR, Egan JJ, *et al.* An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183: 788–824.
- GATK. GATK Best Practices. <https://www.broadinstitute.org/gatk/guide/best-practices>
- Le Guen T, Jullien L, Touzot F, *et al.* Human *RTEL1* deficiency causes Hoyeraal-Hreidarsson syndrome with short telomeres and genome instability. *Hum Mol Genet* 2013; 22: 3239–3249.
- Soding J, Biegert A, Lupas AN. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: W244–W248.
- Kelley LA, Sternberg MJ. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc* 2009; 4: 363–371.

- 25 Yang J, Yan R, Roy A, *et al.* The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods* 2015; 12: 7–8.
- 26 Marti-Renom MA, Stuart AC, Fiser A, *et al.* Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2000; 29: 291–325.
- 27 Wolski SC, Kuper J, Hanzelmann P, *et al.* Crystal structure of the FeS cluster-containing nucleotide excision repair helicase XPD. *PLoS Biol* 2008; 6: e149.
- 28 Kuper J, Wolski SC, Michels G, *et al.* Functional and structural studies of the nucleotide excision repair helicase XPD suggest a polarity for DNA translocation. *EMBO J* 2012; 31: 494–502.
- 29 Faure G, Revy P, Schertzer M, *et al.* The C-terminal extension of human RTEL1, mutated in Hoyeraal-Hreidarsson syndrome, contains harmonin-N-like domains. *Proteins* 2014; 82: 897–903.
- 30 Walne AJ, Vulliamy T, Kirwan M, *et al.* Constitutional mutations in *RTEL1* cause severe dyskeratosis congenita. *Am J Hum Genet* 2013; 92: 448–453.
- 31 Ballew BJ, Yeager M, Jacobs K, *et al.* Germline mutations of regulator of telomere elongation helicase 1, *RTEL1*, in dyskeratosis congenita. *Hum Genet* 2013; 132: 473–480.
- 32 Deng Z, Glousker G, Molczan A, *et al.* Inherited mutations in the helicase *RTEL1* cause telomere dysfunction and Hoyeraal-Hreidarsson syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110: E3408–E3416.
- 33 Ballew BJ, Joseph V, De S, *et al.* A recessive founder mutation in regulator of telomere elongation helicase 1, *RTEL1*, underlies severe immunodeficiency and features of Hoyeraal-Hreidarsson syndrome. *PLoS Genet* 2013; 9: e1003695.
- 34 Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 2010; 7: 248–249.
- 35 Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc* 2009; 4: 1073–1081.
- 36 Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, *et al.* MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods* 2014; 11: 361–362.
- 37 Keller RB, Gagne KE, Usmani GN, *et al.* CTC1 Mutations in a patient with dyskeratosis congenita. *Pediatr Blood Cancer* 2012; 59: 311–314.
- 38 Kocak H, Ballew BJ, Bisht K, *et al.* Hoyeraal-Hreidarsson syndrome caused by a germline mutation in the TEL patch of the telomere protein TPP1. *Genes Dev* 2014; 28: 2090–2102.
- 39 Singleton MR, Dillingham MS, Wigley DB. Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. *Annu Rev Biochem* 2007; 76: 23–50.
- 40 Uringa EJ, Youds JL, Lisaingo K, *et al.* *RTEL1*: an essential helicase for telomere maintenance and the regulation of homologous recombination. *Nucleic Acids Res* 2011; 39: 1647–1655.
- 41 Wu Y, Brosh RM Jr. DNA helicase and helicase-nuclease enzymes with a conserved iron-sulfur cluster. *Nucleic Acids Res* 2012; 40: 4247–4260.
- 42 Vannier JB, Sarek G, Boulton SJ. *RTEL1*: functions of a disease-associated helicase. *Trends Cell Biol* 2014; 24: 416–425.
- 43 Faure G, Revy P, Schertzer M, *et al.* The C-terminal extension of human *RTEL1*, mutated in Hoyeraal-Hreidarsson syndrome, contains harmonin-N-like domains. *Proteins* 2013; 82: 897–903.
- 44 Vannier JB, Sandhu S, Petalcorin MI, *et al.* *RTEL1* is a replisome-associated helicase that promotes telomere and genome-wide replication. *Science* 2013; 342: 239–242.
- 45 Alder JK, Chen JJ, Lancaster L, *et al.* Short telomeres are a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 13051–13056.
- 46 Cronkhite JT, Xing C, Raghu G, *et al.* Telomere shortening in familial and sporadic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178: 729–737.
- 47 Stuart BD, Lee JS, Kozlitina J, *et al.* Effect of telomere length on survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: an observational cohort study with independent validation. *Lancet Respir Med* 2014; 2: 557–565.
- 48 Simeonova I, Jaber S, Draskovic I, *et al.* Mutant mice lacking the p53 C-terminal domain model telomere syndromes. *Cell Rep* 2013; 3: 2046–2058.
- 49 Armanios M, Blackburn EH. The telomere syndromes. *Nat Rev Genet* 2012; 13: 693–704.
- 50 Diaz de Leon A, Cronkhite JT, Katzenstein AL, *et al.* Telomere lengths, pulmonary fibrosis and telomerase (*TERT*) mutations. *PLoS One* 2010; 5: e10680.
- 51 Lupski JR. Digenic inheritance and Mendelian disease. *Nat Genet* 2012; 44: 1291–1292.
- 52 Diaz de Leon A, Cronkhite JT, Yilmaz C, *et al.* Subclinical lung disease, macrocytosis, and premature graying in kindreds with telomerase (*TERT*) mutations. *Chest* 2011; 140: 753–763.
- 53 Calado RT, Regal JA, Kleiner DE, *et al.* A spectrum of severe familial liver disorders associate with telomerase mutations. *PLoS One* 2009; 4: e7926.
- 54 Silhan LL, Shah PD, Chambers DC, *et al.* Lung transplantation in telomerase mutation carriers with pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2014; 44: 178–187.
- 55 Borie R, Kannengiesser C, Hirschi S, *et al.* Severe hematologic complications after lung transplantation in patients with telomerase complex mutations. *J Heart Lung Transplant* 2015; 34: 538–546.
- 56 Goronzy JJ, Fujii H, Weyand CM. Telomeres, immune aging and autoimmunity. *Exp Gerontol* 2006; 41: 246–251.
- 57 Walne AJ, Marrone A, Dokal I. Dyskeratosis congenita: a disorder of defective telomere maintenance? *Int J Hematol* 2005; 82: 184–189.
- 58 Fedick AM, Shi L, J alas C, *et al.* Carrier screening of *RTEL1* mutations in the Ashkenazi Jewish population. *Clin Genet* 2014 [In press DOI: 10.1111/cge.12459].

Supplementary Data

CADD score analysis

CADD analysis (Scaled C-score) [1] was performed.

RTEL1 variants identified by WES in FPF families

FAMILY A : scaled C-score=**28.4**

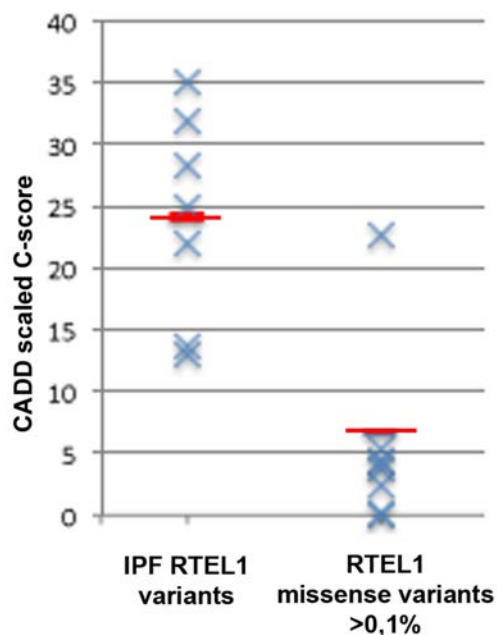
FAMILY B : scaled C-score=**35**

FAMILY C : scaled C-score=**12,95**

FAMILY D : scaled C-score=**25**

RTEL1 missense variants >0.1% in EA population (> 8 variants found in 8000 individuals)

20:62322290		rs190887884		G>A	A=113/G=8185
#Chrom	Pos	Ref	Alt	RawScore	PHRED
20	62322290	G	A	0.010755	2.497
20:62293272		rs3848668		A>G	G=712/A=7888
#Chrom	Pos	Ref	Alt	RawScore	PHRED
20	62293272	A	G	-1.792082	0.002
20:62293862		rs41297642		C>T	T=43/C=8555
#Chrom	Pos	Ref	Alt	RawScore	PHRED
20	62293862	C	T	0.183848	4.293
20:62309621		rs143550996		T>C	C=9/T=8591
#Chrom	Pos	Ref	Alt	RawScore	PHRED
20	62309621	T	C	-0.637851	0.073
20:62321128		rs35640778		G>A	A=152/G=8430
#Chrom	Pos	Ref	Alt	RawScore	PHRED
20	62321128	G	A	3.329118	22.7
20:62324290		rs61736615		G>A	A=318/G=8266
#Chrom	Pos	Ref	Alt	RawScore	PHRED
20	62324290	G	A	0.189811	4.359
20:62325833		rs115610405		C>A	A=163/C=8391
#Chrom	Pos	Ref	Alt	RawScore	PHRED
20	62325833	C	A	0.274745	5.283
20:62326110		rs3208008		A>C	C=6574/A=1972
#Chrom	Pos	Ref	Alt	RawScore	PHRED
20	62326110	A	C	0.143789	3.855



Supplementary reference :

1. Kircher M, Witten DM, Jain P, O'Roak BJ, Cooper GM, Shendure J. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet.* **2014** Mar;46:310-315.

Molecular modelling and 3D structure visualisation

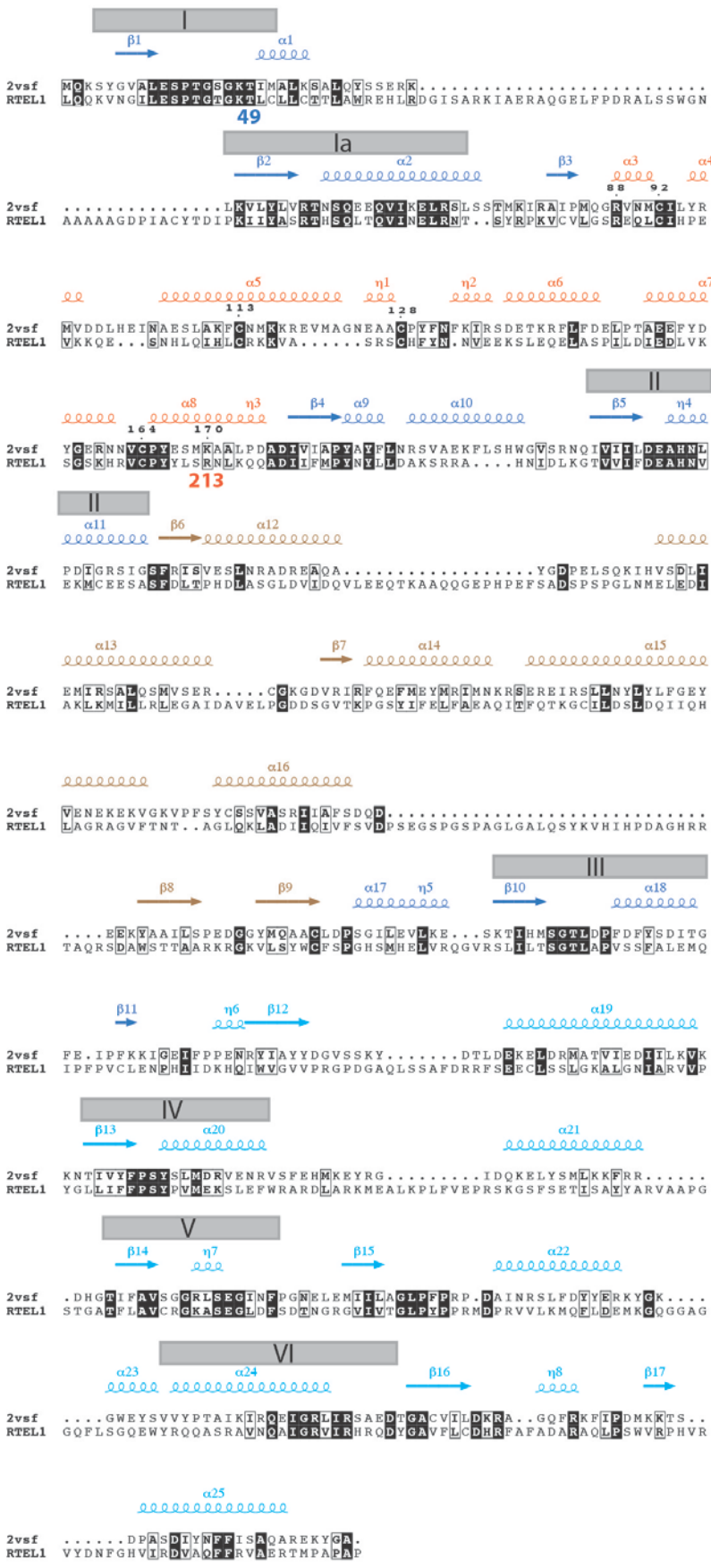
Alignment of the human RTEL1 sequence with that of the *T. acidophilum* XPD, whose 3D structure is known (pdb 2vsf and 4a15). Secondary structures are indicated above the alignment and are colored according to their domains (indicated at top), as reported in [1]. The two mutations reported here are indicated below the RTEL1 sequence. They belong to highly conserved regions.

The alignment was deduced from the results of HH-PRED [2], Phyre2 [3] and I-TASSER [4], and was refined for the most divergent regions (especially the ARCH domain) using Hydrophobic Cluster Analysis [5] (and our unpublished results).

Supplementary references :

1. Wolski SC, Kuper J, Hanzelmann P, Truglio JJ, Croteau DL, Van Houten B, Kisker C. Crystal structure of the FeS cluster-containing nucleotide excision repair helicase XPD. *PLoS Biol* 2008; 6: e149.
2. Soding J, Biegert A, Lupas AN. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: W244-248.
3. Kelley LA, Sternberg MJ. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc* 2009; 4: 363-371.
4. Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods* 2015; 12: 7-8.
5. Callebaut I, Labesse G, Durand P, Poupon A, Canard L, Chomilier J, Henrissat B, Mornon JP. Deciphering protein sequence information through hydrophobic cluster analysis (HCA): current status and perspectives. *Cell Mol Life Sci* 1997; 53: 621-645.

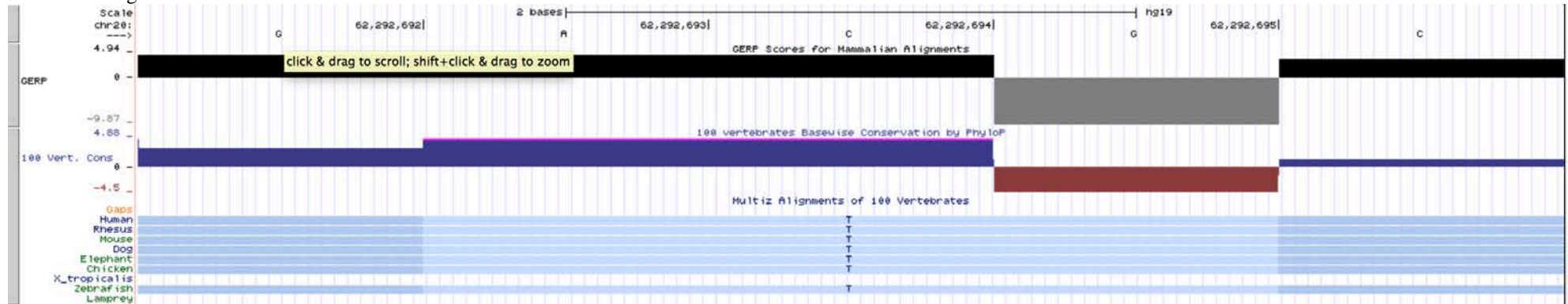
HD1 Fe-S ARCH HD2



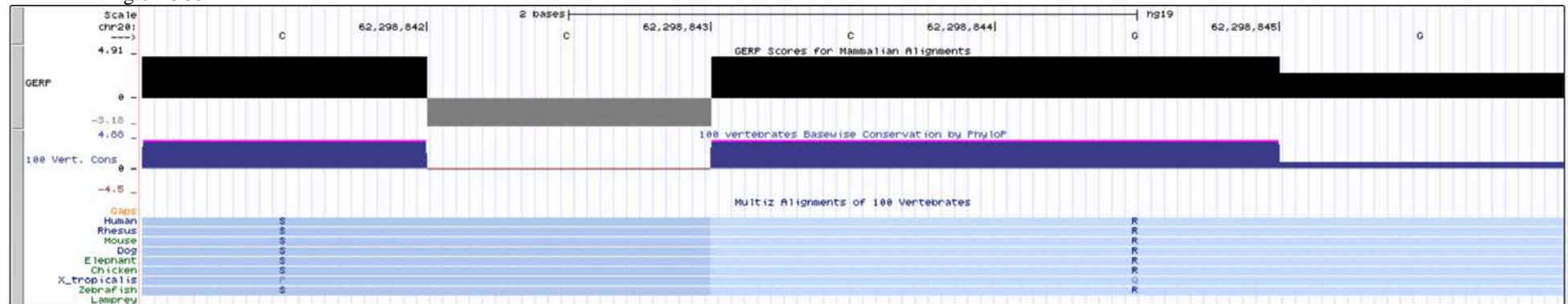
Conservation

GERP scores analysis of nucleotides targeted by RTEL1 mutations were obtained on UCSC genome browser based on their position in hg 19 human genome version. Chr20 (Hg19/GRCh37)

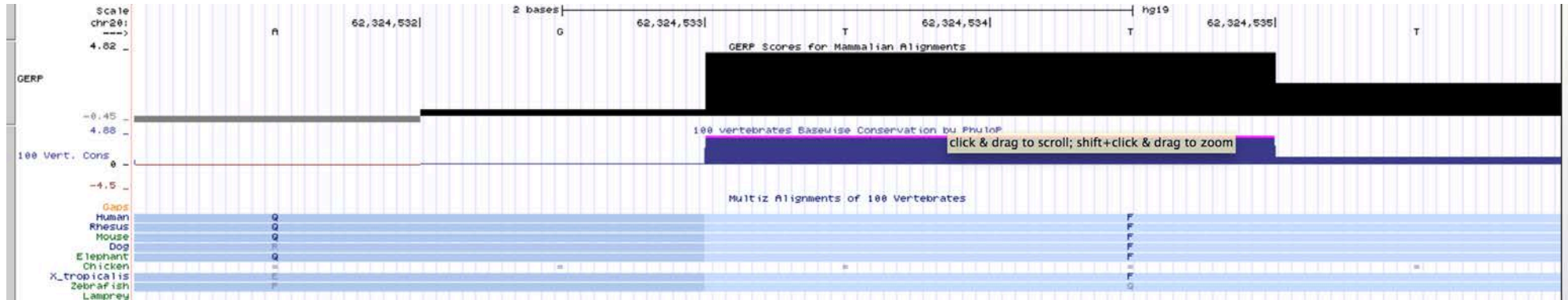
FAMILY A : g.62292694



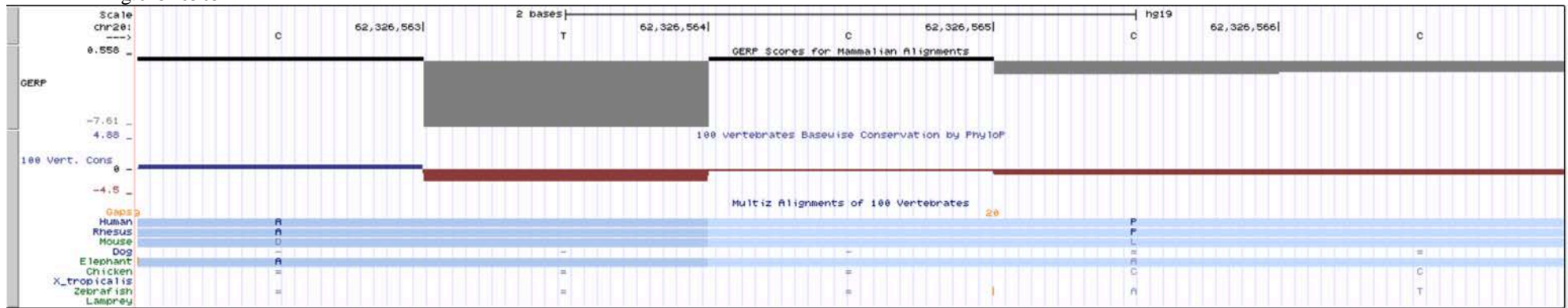
FAMILY B : g.62298844



FAMILY C : g.62324534



FAMILY D : g.62326565





Prevalence and characteristics of *TERT* and *TERC* mutations in suspected genetic pulmonary fibrosis

Raphael Borie^{1,2}, Laure Tabèze^{1,2}, Gabriel Thabut^{2,3}, Hilario Nunes⁴, Vincent Cottin⁵, Sylvain Marchand-Adam⁶, Grégoire Prevot⁷, Abdellatif Tazi⁸, Jacques Cadranel⁹, Herve Mal³, Lidwine Wemeau-Stervinou¹⁰, Anne Bergeron Lafaurie⁸, Dominique Israel-Biet¹¹, Clement Picard¹², Martine Reynaud Gaubert¹³, Stephane Jouneau¹⁴, Jean-Marc Naccache⁹, Julie Mankikian⁶, Christelle Ménard¹⁵, Jean-François Cordier⁵, Dominique Valeyre⁴, Marion Reocreux¹⁵, Bernard Grandchamp¹⁵, Patrick Revy¹⁶, Caroline Kannengiesser^{15,17} and Bruno Crestani^{1,2,17}

Affiliations: ¹APHP, Hôpital Bichat, Service de Pneumologie A, DHU FIRE, Centre de compétence des maladies pulmonaires rares, Paris, France. ²INSERM, Unité 1152; Université Paris Diderot, Paris, France. ³Service de Pneumologie B, APHP, Hôpital Bichat, Paris, France. ⁴APHP, Service de Pneumologie, Hôpital Avicenne, Bobigny, France. ⁵Service de Pneumologie, Centre national de référence des maladies pulmonaires rares, Hôpital Louis Pradel, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France. ⁶Service de Pneumologie, CHRU de Tours, Tours, France. ⁷Service de Pneumologie, Hôpital Larrey, Toulouse, France. ⁸APHP, Hôpital Saint-Louis, Service de Pneumologie, Paris, France. ⁹APHP, Service de Pneumologie, Centre de compétence des maladies pulmonaires rares, Hôpital Tenon, Paris, France. ¹⁰Service de Pneumologie, Centre de compétence des maladies pulmonaires rares, CHRU de Lille, Lille, France. ¹¹APHP, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service de Pneumologie, Paris, France. ¹²Service de Pneumologie, Hôpital Foch, Suresnes, France. ¹³Service de Pneumologie, Hôpital Nord, Marseille, France. ¹⁴Service de Pneumologie, Centre de compétence des maladies pulmonaires rares, Hôpital Pontchaillou; IRSET UMR 1085, université de Rennes 1, Rennes, France. ¹⁵Département de Génétique, APHP, Hôpital Bichat, Paris, France; Université Paris Diderot, Paris, France. ¹⁶INSERM UMR 1163, Laboratory of Genome Dynamics in the Immune System, Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité University, Imagine Institute, Paris, France. ¹⁷Both authors contributed equally to this work. Additional collaborators are listed in the Acknowledgements section.

Correspondence: Bruno Crestani, Service de pneumologie A, Hôpital Bichat, 46 rue Henri Huchard, 75877 Paris Cedex 18, France. E-mail: bruno.crestani@aphp.fr

ABSTRACT Telomerase reverse transcriptase (*TERT*) or telomerase RNA (*TERC*) gene mutation is a major monogenic cause of pulmonary fibrosis. Sequencing of *TERT/TERC* genes is proposed to patients with familial pulmonary fibrosis. Little is known about the possible predictors of this mutation and its impact on prognosis.

We retrospectively analysed all the genetic diagnoses made between 2007–2014 in patients with pulmonary fibrosis. We evaluated the prevalence of *TERT/TERC* disease-associated variant (DAV), factors associated with a DAV, and the impact of the DAV on survival.

237 patients with pulmonary fibrosis (153 with familial pulmonary fibrosis, 84 with telomere syndrome features without familial pulmonary fibrosis) were tested for *TERT/TERC* DAV. DAV was diagnosed in 40 patients (16.8%), including five with non-idiopathic interstitial pneumonia. Prevalence of *TERT/TERC* DAV did not significantly differ between patients with familial pulmonary fibrosis or with only telomere syndrome features (18.2% versus 16.4%). Young age, red blood cell macrocytosis, and low platelet count were associated with the presence of DAV; the probability of DAV was increased for patients 40–60 years. Transplant-free survival was lower with than without *TERT/TERC* DAV (4.2 versus 7.2 years; $p=0.046$).

TERT/TERC DAV were associated with specific clinical and biological features and reduced transplant-free survival.



@ERSpublications

Pulmonary fibrosis patients with *TERT/TERC* disease-associated variants show reduced transplant-free survival <http://ow.ly/EmYs304atGl>

Introduction

The genetic background of interstitial lung disease (ILD) features the prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), which is 0.02% in the general population; however, 2–20% of IPF patients are from families with ILD [1, 2]. Genetic studies of familial forms of IPF led to the discovery of mutations within telomerase reverse transcriptase (*TERT*) and telomerase RNA (*TERC*), both required for normal telomerase activity [3, 4]. Heterozygous mutations in *TERT/TERC* are detected in ~15% of patients with familial ILD but rarely in sporadic IPF (<3%) [3–5]. Mutations in *TERT/TERC* are also associated with extra-pulmonary abnormalities, assessed as telomere syndrome, involving skin, liver and haematological abnormalities [6–8]. The phenotype may be heterogeneous, even in patients with the same mutation [9]. In addition, a polymorphism in *MUC5B* is strongly associated with IPF, whether sporadic or familial [5, 10, 11].

International guidelines for IPF in 2011 did not recommend genetic testing in the state of understanding, but international guidelines for idiopathic interstitial pneumonia in 2013 and French practical guidelines suggest searching for genetic abnormalities in patients with familial pulmonary fibrosis (FPF) [12–14]. However, *TERT/TERC* mutation testing indications need to be clarified, as does the clinical impact of these mutations. The aim of this study was to evaluate the prevalence of *TERT/TERC* mutation in a national cohort of ILD with suspected *TERT/TERC* mutation in France, to search for factors predicting these mutations and to evaluate their impact on survival.

Methods

Patients

This was a retrospective, observational, non-interventional study. All patients referred for *TERT/TERC* sequencing in the genetic laboratory of Bichat Hospital (Paris, France) between 2007 and January 2014 were screened for the study. This laboratory is the reference facility in France for *TERT/TERC* mutation testing and belongs to a network including adult and paediatric centres with a special interest in rare lung diseases. For this study, we included all probands with ILD and suspected *TERT/TERC* mutation. All patients were referred by a pulmonologist for a genetic diagnosis of the ILD. Patients referred for dyskeratosis congenita were not included; however, when reviewing the clinical chart, one patient fulfilled the dyskeratosis congenita criteria and was not excluded [15]. Patients with hepato-pulmonary syndrome were not included in the study.

The clinical charts for patients were reviewed and data were collected by use of a standardised and anonymous collection form. Personal and family history of pulmonary diseases (particularly ILD), haematological disorders (including abnormal blood count), liver abnormalities (repeated unexplained elevated liver enzyme levels or liver disease) and personal cutaneous abnormalities (hair greying before the age of 30, skin hyperpigmentation, oral leukoplakia, and nail dystrophy) were specifically assessed. The results of standard biological tests were collected at the diagnosis of ILD. Red blood cell macrocytosis was defined by mean corpuscular volume >100 fL and thrombocytopenia by platelet count <150 g·L⁻¹ according to the World Health Organization definition [16]. In this study, personal or familial hepatic or haematological diseases and personal cutaneous signs were considered extra-pulmonary involvement.

Lung diagnosis was based on a multidisciplinary team discussion including clinical data, lung high-resolution computed tomography (HRCT) and pathological evaluation, according to the 2011 official American Thoracic Society (ATS)/European Respiratory Society (ERS)/Japanese Respiratory Society (JRS)/Latin American Thoracic Association (ALAT) statement for IPF [14, 17] and the revised classification of idiopathic interstitial pneumonia [13]. Patient with possible usual interstitial pneumonia pattern on computed tomography scan without available histology who were given a working diagnosis of IPF after multidisciplinary discussion were classified as such in this study. Professional or domestic exposure to inhaled fibrogenic particles (such as asbestos) or antigens possibly associated with chronic hypersensitivity pneumonitis (such as chronic exposure to birds or moulds) (see online data supplement) was systematically considered, as was the use of drugs associated with pulmonary fibrosis according to publicly available databases (www.pneumotox.com). Tobacco smoke exposure was quantified. The results of lung function tests obtained at the diagnosis of ILD were collected. Death and lung transplantation data were collected up to September 1, 2015, except for cases lost to follow-up.

Editorial comment in: *Eur Respir J* 2016; 48: 1556–1558.

This article has supplementary material available from erj.ersjournals.com

Received: Dec 14 2015 | Accepted after revision: Sept 03 2016 | First published online: Nov 11 2016

Support statement: This work was supported by the Chancellerie des Universités de Paris (legs Poix) and by a grant “FPI-SPC” from Université Sorbonne Paris Cité.

Conflict of interest: Disclosures can be found alongside this article at erj.ersjournals.com

According to national rules in France, all patients or relatives gave a signed consent for germline genetic analysis. The Institutional Review Board of the French Society for Respiratory Medicine (*Société de Pneumologie de Langue Française*) approved this study (CEPRO 2015–020).

Genetic analysis

Methods for sequencing are presented in the online data supplement. Patients with *TERT* and *TERC* rare variants were classified according to the American College of Genetics and Genomics guidelines and European Society for Human Genetics recommendations [18, 19]. Briefly, there are five head categories of variants: pathogenic, likely pathogenic, uncertain significance (VUS), likely benign and benign. The following supporting, moderate or strong criteria were used when available: nature of the variant (very strong to supporting), previous report (strong), population data (moderate), segregation data (strong to supporting), telomere length as functional data (supporting), computational and predictive data such as polyphen or combined annotation-dependent depletion (CADD) scores (supporting) and specific phenotype (supporting). The combination of one moderate criteria and four or more supporting criteria for pathogenicity leads to a conclusion of likely pathogenic [18]. Within the group of VUS, variants with one moderate criteria and three supporting criteria were considered as VUS possibly disease associated (VUSD). All other VUS were considered as VUS possibly benign (VUSB). Variants classified as pathogenic, likely pathogenic and VUSD were retained as disease-associated variant (DAV).

Statistical analysis

Continuous variables are expressed as median (range) and were compared by t-test. Categorical variables are expressed as n (%) and were compared by Chi-squared test. Comparison of patients with *TERT/TERC* mutation involved non-parametric tests because of the small sample sizes.

Because a substantial number of patients underwent lung transplantation, traditional survival analyses in which patients undergoing lung transplantation would be censored at the time of transplant would provide biased estimates (informative censoring). Therefore, we used time to death or transplant (transplant-free survival) as our primary end-point. The starting point was the date of ILD diagnosis. Univariate and multivariate Cox models were used to assess the impact of baseline covariates on transplant-free survival with hazard ratios. The correlation of observations within centres was accounted for by use of a grouped Jackknife estimator [20].

Factors associated with *TERT/TERC* DAV were tested by comparing carriers and non-carriers and by fitting univariate and multivariate logistic regression models. The centre-effect was accounted for by using generalised estimating equation models. The *coxph* function (survival package) with the cluster option was used to compute Cox models, and the *gee* function (*gee* package) was used to compute logistic models. All tests were two-sided, with $p=0.05$ indicating statistical significance. All analyses involved use of R software (version 2.15.2; www.r-project.org).

Results

Patients

On January 1, 2014, DNA from 237 probands with ILD (153 with FPF and 84 non-FPF with extra-pulmonary involvement) was tested for suspected *TERT/TERC* mutation, including 11 patients previously reported [21–23] (figure 1). The mean age was 61.3 years (21.4–92.6), with a male predominance (71.4%) (table 1). The final pulmonary diagnosis was IPF (n=97), probable, possible IPF or working diagnosis of IPF (n=73), suspected idiopathic nonspecific interstitial pneumonia (n=12), chronic hypersensitivity pneumonitis (n=13), drug-induced pneumonitis (n=4), desquamative interstitial pneumonia (n=3), respiratory bronchiolitis with ILD (n=1), collagen vascular disease associated ILD (n=17: rheumatoid arthritis, n=6; Sjögren's syndrome, n=5; undifferentiated connective tissue disease, n=2; systemic sclerosis, n=1; fibrosis with antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis, n=2; systemic lupus erythematosus, n=1), pneumoconiosis (n=3), idiopathic pleuroparenchymal fibroelastosis (n=2), cryptogenic organising pneumonia (n=1), pulmonary fibrosis associated with alveolar proteinosis (n=1) and nonclassifiable fibrosis (n=10). Thus 195 patients with idiopathic ILD, including 170 with IPF and 42 with secondary ILD, were included.

Details on the hepatic and haematological diseases and cutaneous signs are in the online data supplement.

Carriers of *TERT/TERC* mutation

Genetics

We identified 31 (13.0%) probands with pathogenic or likely pathogenic *TERT/TERC* variants, 26 (10.9%) within *TERT* and five (2.1%) within *TERC* (tables 2 and E1). Nine variants were classified as VUSD and 11 as VUSB. As the group of patient carriers of pathogenic or likely pathogenic *TERT/TERC* variants did

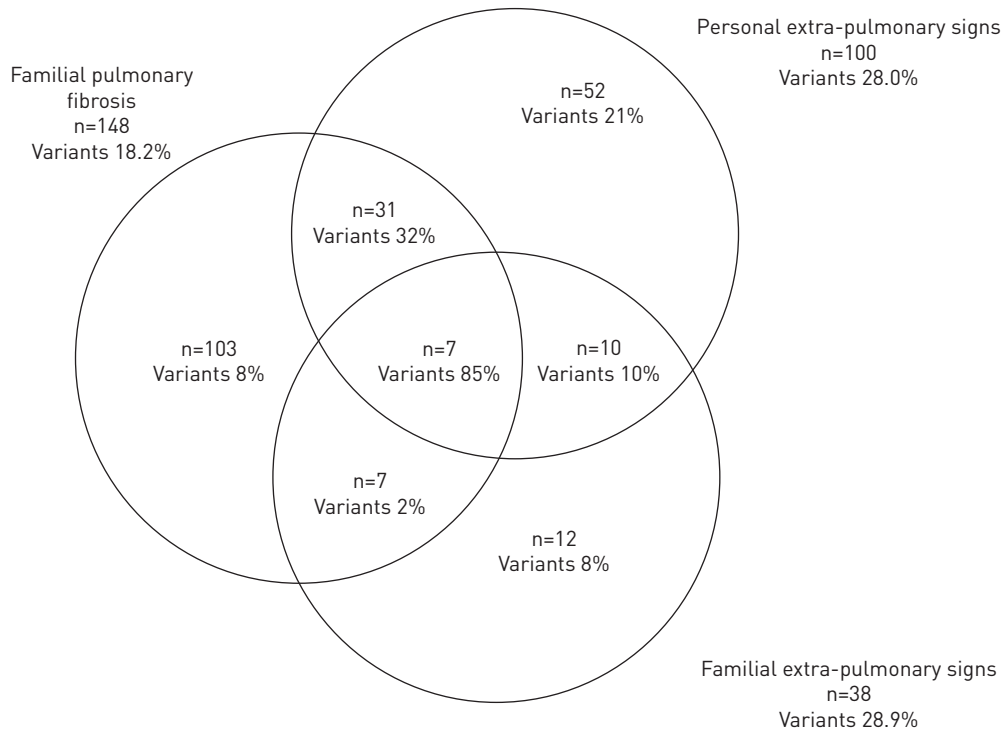


FIGURE 1 Probands included in the study by what led to suspicion of a mutation and percentage of patient carriers of disease-associated variant in each group.

not differ significantly from the group of patient carriers of VUSD, both groups were gathered, called patients with *TERT/TERC* DAV and compared with the group without any variant. Carriers of VUSB within *TERT* or *TERC* were not included in further analysis. Four ultra-rare variants were found several times in three, two, two and two probands, respectively (table E1). As far as we know, none of them were relatives as they did not share the same name nor did they come from the same area.

Figure 1 displays the proportion of patients with *TERT/TERC* DAV by presence of FPF and/or extra-pulmonary involvement. Among FPF patients, the proportion with mutation was 18.2%. The highest proportion with mutation was for those with FPF and extra-pulmonary signs (16 (42.1%) out of 38).

Patients with *TERT/TERC* DAV were genotyped for the *MUC5B* rs35705950 polymorphism. The frequency of the minor-allele (at-risk) *MUC5B* polymorphism was 19 (25%) out of 74 for those with *TERT/TERC* DAV and was greater than for controls (n=1229, 10.8%; $p=8 \times 10^{-66}$) but lower than for a French IPF cohort (n=142, 41.9%; $p=0.02$) [5].

Mean length of telomere was significantly reduced in *TERC* DAV carriers when compared to *TERT* DAV carriers or to controls at 4.7 kb, 7.1 kb and 7.6 kb respectively ($p=0.01$ and $p=0.002$) (figure E1a). When compared with the normal values, all patients with *TERC* DAV and 11 patients with pathogenic or likely pathogenic *TERT* variants showed reduced telomere length. Within carriers of *TERT* DAV, patients self-reported to be from the second generation affected, showed shorter telomere than patients from the first generation, ($p=0.02$) (figure E1b).

Pulmonary involvement

The mean (range) age of patient carriers of *TERT/TERC* DAV was 57 (36–79) years (table 2). Most (55.2%) were smokers, and 42.1% had chronic exposure to potentially pneumotoxic dust (asbestos, metals, wood, birds, moulds, etc.); 73.6% were smokers or had chronic pneumotoxic exposure. The final pulmonary diagnosis was IPF (n=24, 60.0%), nonclassifiable fibrotic ILD (n=7, 17.5%), chronic hypersensitivity pneumonitis (n=3, 7.5%), suspected idiopathic nonspecific interstitial pneumonia (n=4, 10.0%), rheumatoid arthritis-associated ILD (n=1, 2.5%) and drug-induced ILD (n=1, 2.3%). Thus, five patients (12.5%) showed a secondary form of ILD (hypersensitivity pneumonitis, connective tissue disease or drug induced).

TABLE 1 Main characteristics of the 237 patients

Age at diagnosis years	61.3 [21.4–92.6]
Male	170 (71.7)
Smoker ever	135 (56.9)
Fibrogenic exposure	75 (31.6)
Smoking or fibrogenic exposure	170 (71.7)
Extra-pulmonary signs	135 (56.9)
Personal	117 (49.3)
Haematological	75 (31.6)
Macrocytosis	42 (17.7)
Thrombocytopenia	57 (24.0)
Hepatic	39 (16.4)
Cutaneous	27 (11.3)
Familial	40 (16.8)
Haematological	19 (8.0)
Hepatic	24 (10.1)
Relatives with pulmonary or extra-pulmonary disease	1.4 [0–7]
Pulmonary function tests	
FVC % pred	74 [25–149]
DLco % pred	47 [13–87]
Computed tomography scan pattern (n=233)	
UIP or possible UIP	127 (53.5)
NSIP	42 (17.7)
HSP	5 (2.1)
Non-classifiable	43 (18.1)
Histological pattern (n=58)	
UIP or probable UIP	38 (64.9)
NSIP	4 (6.8)
HSP	3 (4.4)
Other	13 (22.4)
IPF diagnosis[#]	170 (71.7)

Data are presented as mean (range) or n (%). Forced vital capacity (FVC) and diffusing capacity of the lung for carbon monoxide (DLco) are expressed as % predicted value. UIP: usual interstitial pneumonia; NSIP: nonspecific interstitial pneumonia; HSP: hypersensitivity pneumonitis; IPF: idiopathic pulmonary fibrosis. [#]: IPF or probable IPF or possible IPF diagnosis based on computed tomography scan and histology. Patients with possible UIP on computed tomography scan without histology but with a working diagnosis of IPF after multidisciplinary discussion are classified as IPF.

Extra-pulmonary involvement

Personal haematological abnormalities were of two kinds. A total of 12 patients presented only abnormal blood cell count without identified bone marrow disease: low platelet count (n=6, 15.0%), red blood cell macrocytosis (n=3, 7.5%), or both (n=3, 7.5%); in 11 patients, bone marrow diseases were identified by bone-marrow aspirate or bone-marrow biopsy: myelodysplasia (n=5, 12.5%), bone-marrow failure (n=2, 5.0%), myelofibrosis (n=1, 2.5%) and acute myeloid leukemia (n=1, 2.5%). Myelodysplasia developed in two patients with thrombocytopenia during follow-up; one patient had acute myeloid leukemia and one myelodysplasia without previous cytopenia. Furthermore, V617F mutation of JAK2 was evidenced in two patients with myelodysplasia.

In all, 13 patients showed liver disorders: repeated unexplained elevated liver enzymes (n=5, 12.5%), non-alcoholic steato-hepatitis (n=4, 10.0%), idiopathic liver cirrhosis (n=3, 7.5%), and focal nodular hyperplasia (n=1, 2.5%). Hepatopulmonary syndrome was not explicitly evaluated and no cases were documented.

Overall, 11 patients showed skin abnormalities: skin hyperpigmentation (n=5, 12.5%), premature hair greying (n=5, 12.5%), oral leukoplakia (n=1, 2.3%), and nail dystrophy (n=1, 2.3%). The total is greater than 11 because patients could present several signs. Only one patient with skin hyperpigmentation, oral leukoplakia and nail dystrophy fulfilled the dyskeratosis congenita criteria.

Predictors of TERT/TERC mutation

We did not find any significant difference between carriers of *TERT* or *TERC* DAV in age, sex ratio, tobacco smoking, fibrogenic exposure, extra-pulmonary signs, pulmonary function test alterations, histological or HRCT pattern, or final diagnosis. We further compared patients with and without *TERT/TERC* DAV.

TABLE 2 Main characteristics of patients by presence of telomerase reverse transcriptase (*TERT*)/telomerase RNA (*TERC*) gene variants

	Pathogenic or likely pathogenic <i>TERT/TERC</i> variants	<i>TERT/TERC</i> VUSD	<i>TERT/TERC</i> VUSB	Absence of <i>TERT/TERC</i> variant	Univariate analysis p-value
Number	31 (13.0)	9 (3.7)	11 (4.6)	186 (78.1)	
Age years	59.3 (39.3–82.8)	54.4 (41.5–69.5)	57.9 (30.2–76.8)	63.0 (24.7–92.6)	0.02
Male	22 (70.9)	6 (66.6)	9 (81.8)	134 (71.5)	0.64
Smoker ever	17 (54.8)	4 (44.4)	4 (36.3)	110 (64.7)	0.44
Fibrogenic exposure	11 (35.4)	4 (44.4)	5 (45.4)	57 (33)	0.39
Smoking or fibrogenic exposure	22 (70.9)	6 (66.6)	6 (54.5)	135 (72.5)	0.74
Familial pulmonary fibrosis	23 (74.2)	3 (33.3)	5 (41.6)	118 (63.4)	0.85
Extra-pulmonary signs	24 (77.4)	7 (77.7)	8 (72.7)	90 (48.3)	0.0008
Personal	22 (70.9)	8 (88.8)	6 (54.5)	72 (38.7)	<0.001
Haematological	19 (61.2)	4 (44.4)	5 (45.4)	46 (25.4)	<0.001
Macrocytosis	14 (45.1)	1 (11.1)	5 (45.4)	21 (11.2)	<0.001
Thrombocytopenia	17 (54.8)	3 (33.3)	4 (36.3)	35 (18.8)	<0.001
Hepatic	9 (29.0)	4 (44.4)	4 (36.3)	22 (12.2)	0.001
Cutaneous	10 (32.2)	1 (11.1)	2 (18.1)	15 (8.4)	<0.001
Familial	9 (29.0)	2 (22.2)	3 (27.2)	27 (14.5)	0.04
Haematological	5 (16.1)	0 (0)	1 (9.0)	13 (7.1)	0.24
Hepatic	5 (16.1)	2 (22.2)	3 (27.2)	16 (8.8)	0.09
Relatives with pulmonary or extra-pulmonary disease	1.42 (0–5)	1 (0–5)	1.2 (0–6)	0.96 (0–7)	0.26
Pulmonary function tests					
FVC	75 (25–91)	63 (43–99)	40 (19–77)	77 (28–67)	0.18
DLco	52 (13–53)	46 (24–80)	62 (35–93)	47 (14–62)	0.85
Computed tomography pattern					
UIP or possible UIP	18 (58.0)	5 (55.5)	7 (63.6)	98 (52.6)	0.57
IPF diagnosis	18 (58.0)	6 (66.6)	8 (72.7)	138 (74.1)	0.01

Data are presented as mean (range) or n (%), unless otherwise indicated. Statistical analysis included pathogenic, likely pathogenic variants and uncertain significance variants (VUS) possibly disease associated (VUSD) versus absence of variant. FVC: forced vital capacity; DLco: diffusing capacity of the lung for carbon monoxide; UIP: usual interstitial pneumonia; IPF: idiopathic pulmonary fibrosis; VUSB: VUS possibly benign.

As compared to the patients without *TERT/TERC* DAV, those with a DAV were younger, less frequently had a diagnosis of IPF and more frequently had extra-pulmonary signs (table 2).

Plots based on smoothing splines supported a non-linear association between age at diagnosis and the probability of *TERT/TERC* DAV; probability of being a carrier was greater for patients 40–60 years old than younger patients (<40 years) and older patients (>60 years); a threshold could not be easily defined (figure 2). HRCT pattern, presence of secondary ILD and severity of ILD assessed by pulmonary function tests were not associated with the mutation.

On multivariate analysis cutaneous abnormalities (p=0.006), low platelet count (p=0.05), familial liver disorders (p=0.01) and number of relatives with lung disease (p=0.004) remained significantly associated with *TERT/TERC* DAV. Age at diagnosis was not significantly associated with *TERT/TERC* variant in this model (p=0.21). A model including these 5 variables showed fair discrimination, with an area under receiver operating characteristic curve (AUC) of 0.74 (95% CI: 0.64–0.85). Accordingly, a score including all these 5 variables had no clear advantage as compared with the variables alone. Among the 5 variables in the final model, low platelet count had the highest discriminative ability (AUC of 0.67 (0.57–0.77)).

If we limited the analysis to the subgroup of patients with FPF, the factors young age (p=0.07), increased number of relatives with lung disease (p=0.06), life-long non-smoking (p=0.02) and presence of personal or familial extra-pulmonary signs (p<0.0001) were associated with the presence of a *TERT/TERC* DAV.

Survival

Overall and transplant-free survival

Median (range) follow-up time for the whole population (n=226) was 3.7 years (0.1–18.4 years). During follow-up, 69 (30.5%) patients died, 27 (11.9.0%) underwent lung transplantation and the 130 remaining patients (57.5%) were still alive at the end of the study.

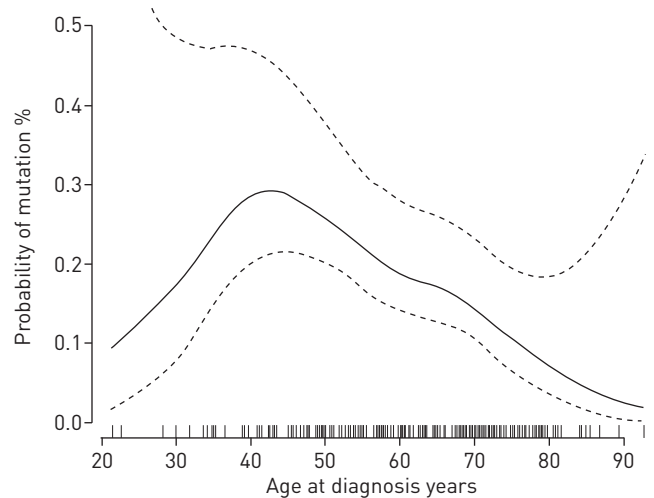


FIGURE 2 Association between age at diagnosis and the probability of telomerase reverse transcriptase (*TERT*)/telomerase RNA (*TERC*) gene disease-associated variant (DAV). Plots based on smoothing splines. Younger age was significantly associated with the presence of a DAV without linear regression between the probability of a DAV and the age. The smoothing splines support an increased probability of a DAV in the 40–60-year-old patient.

Median (95% CI) transplant-free survival for the whole cohort was 6.3 years (5.1–8.1 years). Transplant-free survival was 73.5% (67.4–80.0%), 58.99% (51.7–67.1%) and 26.6% (17.1–41.3%) at 3, 5 and 10 years, respectively. The median follow-up did not significantly differ between carriers and non-carriers of *TERT/TERC* DAV (3.3 years (0.4–13.8 years) versus 3.4 years (0.1–18.4 years); $p=0.90$). Transplant-free survival was not different according the presence of the *MUC5B* rs35705950 polymorphism in the *TERT/TERC* DAV carriers. Median transplant-free survival was lower for carriers than non-carriers (4.2 (2.9–infinity) versus 7.2 (6.0–9.4) years; log-rank test $p=0.046$) (figure 3). Transplantation was more frequent for patients with than without *TERT/TERC* DAV (11 (30.2%) versus 16 (9.2%); $p=0.002$). Age at transplantation did not differ between carriers and non-carriers (52.5 versus 54.4 years; $p=0.6$).

Factors associated with transplant-free survival

The association between variables measured at baseline and transplant-free survival is given in table 3. Presence of *TERT/TERC* DAV, male sex, decreased force vital capacity or diffusing capacity of the lungs for carbon monoxide as well as red blood cell macrocytosis, and thrombocytopenia were significantly associated with reduced transplant-free survival. Transplant-free survival was decreased with presence of a

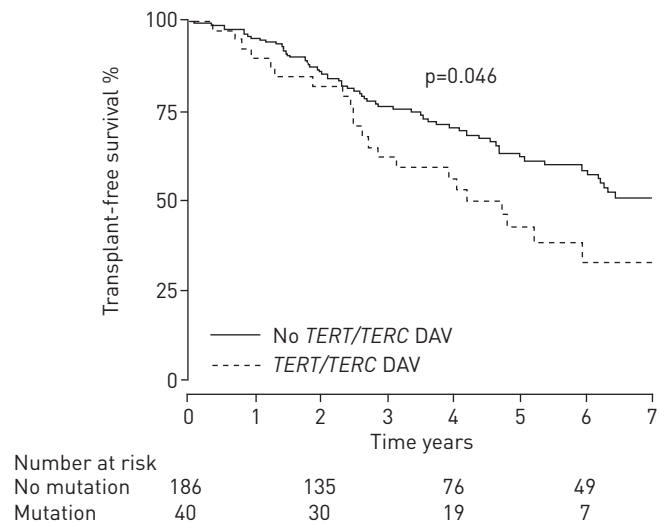


FIGURE 3 Transplant-free for patient carriers and non-carriers of telomerase reverse transcriptase (*TERT*)/telomerase RNA (*TERC*) gene disease-associated variant (DAV). Median transplant-free survival was reduced for DAV carriers ($p=0.046$).

TABLE 3 Factors associated with transplant-free survival

	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	HR (95% CI)	p-value	HR (95% CI)	p-value
Age at diagnosis by 5 years	1.07 (0.97–1.17)	0.15	1.18 (1.06–1.31)	0.002
TERT/TERC DAV carrier	1.63 (1.08–2.47)	0.02	1.92 (1.15–4.13)	0.003
Male	2.00 (1.21–3.22)	0.006	2.08 (1.42–3.03)	<0.001
Smoker ever	1.16 (0.8–1.69)	0.44		
Extra-pulmonary signs				
Personal				
Haematological	1.67 (1.24–2.24)	0.001		
Macrocytosis	2.45 (1.86–3.22)	<0.001		
Thrombocytopenia	2.00 (1.54–2.59)	0.006		
Hepatic	1.38 (0.98–1.94)	0.06		
Cutaneous	1.56 (1.13–2.15)	0.007		
Familial				
Haematological	0.70 (0.3–1.63)	0.41		
Hepatic	0.72 (0.44–1.16)	0.17		
Number of relatives with pulmonary or extra-pulmonary signs	0.88 (0.74–1.05)	0.17		
Pulmonary function				
FVC by 0.1 units	0.84 (0.75–0.93)	0.001	0.81 (0.72–0.92)	<0.001
DLCO by 0.1 units	0.69 (0.58–0.81)	<0.001		
IPF final diagnosis	1.34 (0.9–1.98)	0.15		

TERT: telomerase reverse transcriptase; *TERC*: telomerase RNA; DAV: disease-associated variant; FVC: forced vital capacity; DLCO: diffusing capacity of the lung for carbon monoxide; IPF: idiopathic pulmonary fibrosis.

DAV in a multivariable model including age, sex and forced vital capacity and controlling for centre (HR 1.92 (95% CI 1.15–4.13); $p=0.003$). Similar results were found when the analysis was limited to patients with a diagnosis of IPF (HR 2.36 (1.35–4.13); $p=0.003$). Results were consistent whatever the computed tomography scan probability of usual interstitial pneumonia.

Causes of death

Among the 69 deaths, 36 (52.1%) were considered related to fibrosis (end-stage pulmonary fibrosis, acute exacerbation or pulmonary hypertension) and 33 (47.8%) not related (cirrhosis, infection, refractory pancytopenia, cardiac failure, stroke, pulmonary embolism or unknown). For patients presenting refractory pancytopenia, five *TERT/TERC* DAV carriers died *versus* two non-carriers ($p=0.01$). The frequency of death due to end-stage fibrosis was similar in the two groups (five out of 17 *versus* 31 out of 62; $p=0.13$).

Discussion

This series is a national cohort of ILD of suspected monogenic cause with systematic sequencing of *TERT/TERC* and many participating centres ($n=31$). In patients with suspected *TERT/TERC* DAV, this series shows that 1) extra-pulmonary involvement and age at diagnosis predicted the presence of *TERT/TERC* DAV, 2) *TERT/TERC* DAV could be associated with different pulmonary phenotypes including non-idiopathic ILD, and 3) the presence of a *TERT/TERC* DAV was associated with reduced transplant-free survival.

We included all patients with ILD and suspected *TERT/TERC* mutation. The ATS/ERS/JRS/ALAT statement on idiopathic interstitial pneumonia suggests performing *TERT/TERC* sequencing for cases of familial ILD and does not consider extra-pulmonary signs [13], whereas national recommendations for clinical practice in France suggest also performing *TERT/TERC* sequencing in patients with extra-pulmonary signs [14, 24]. Our results support broader recommendations because the mutation rate was similar for patients with FPF (18.2%) and patients without familial occurrence of ILD but with extra-pulmonary involvement suggestive of a telomere syndrome (16.4%). This rate of detection is similar to that observed in previous studies of FPF [3, 4].

Overall, 37.5% of our patients with *TERT/TERC* DAV had red blood cell macrocytosis, 50.0% thrombocytopenia and 32.5% liver abnormalities, all predictive of *TERT/TERC* DAV. *TERT/TERC* DAV carriers in previous cohorts showed extra-pulmonary signs [9, 25, 26]. For instance, bone-marrow failure associated with pulmonary fibrosis in the same individual or family was found highly predictive of *TERT/TERC* mutation [27]. *TERT/TERC* mutation has been associated with cryptogenic cirrhosis,

hepato-pulmonary syndrome, dyskeratosis congenita and premature hair greying [7, 28]. The classic triad of dyskeratosis congenita is dysplastic nail, skin hyperpigmentation and oral leukoplakia [15]. After reviewing of the chart, one patient fulfilled the criteria and was, as suspected, carrier of a *TERT* DAV. However, as far as we know, the rate of thrombocytopenia or macrocytosis in patients with ILD and *TERT/TERC* mutations was not previously reported. The shortest telomere length was found in subjects with *TERC* DAV, suggesting an increased penetrance and a higher risk of telomere syndrome for these patients [8]. The lack of clinical difference between *TERT* and *TERC* DAV carriers in this study could be related to the small number of *TERC* DAV carriers included, and needs to be further evaluated.

In the current series, five out of 40 patients with DAV were considered to present non-idiopathic ILD compared with 35 out of 186 in the non-carrier group ($p=0.34$). Non-IPF ILD may have a genetic background. Indeed, in a series of 114 patients with a diagnosis of chronic hypersensitivity pneumonitis, 17.5% had a family member with pulmonary fibrosis, an argument that favours a genetic continuum between non-idiopathic and idiopathic ILD [29]. Moreover, in a series of 29 patients with surgical specimen of ILD, DIAZ DE LEON *et al.* [9] reported two cases of chronic hypersensitivity pneumonitis. Furthermore, we and others recently reported *RTEL1*, *PARN* and *TERT* mutations in patients with non-idiopathic ILD (such as connective tissue disease-associated ILD, pneumoconiosis, chronic hypersensitivity pneumonitis) in the context of FPF [23, 30, 31]. This series evidence that non-IPF ILD and non-idiopathic ILD should indicate the need for genetic testing in cases of FPF or telomere syndrome.

Almost two-thirds of *TERT/TERC* DAV carriers in this series reported smoking or fibrogenic exposure. In a US cohort of 134 patients from 21 families with *TERT* mutation, almost all patients with ILD (96%) were smokers or declared a pneumotoxic exposure [9]. *TERT/TERC* mutation has also been reported in viral or alcoholic cirrhosis series [32]. Furthermore, patients with *TERT/TERC* mutation can present severe haematological complications after lung transplantation when using cytotoxic drugs [23, 33, 34]. Altogether, diseases belonging to the telomere syndrome may be considered multifactorial, resulting from strong genetic predisposition and toxic exposure such as smoking in case of ILD.

In the current study, transplant-free survival was lower with than without *TERT/TERC* DAV on both univariate and multivariate analysis. Telomeres length had been previously been associated with reduced transplant survival in the context of IPF [35]. Male sex, lung function test results, red blood cell macrocytosis, and thrombocytopenia were also associated with transplant-free survival. Assessing the survival of patients in the presence of competing events (transplantation) is tricky. The traditional approach (Kaplan–Meier estimator) assumes that the distribution of survival times of patients who underwent transplantation is the same as that of patients who did not (uninformative censoring). This assumption is obviously untenable here, and this approach overestimates the “true” survival of patients because the sickest patients are removed from the database over time. Therefore, we accounted for time to death or transplantation as an end-point and reported transplant-free survival.

The survival in the whole cohort seemed unexpectedly high (median survival 7.3 years) compared with that for sporadic IPF, for instance, which clearly indicates that the population suspected of *TERT/TERC* DAV is a subpopulation of those with ILD. In the largest series of patients with pulmonary fibrosis associated with *TERT* mutation reported to date, the mean survival was 3 years after diagnosis [9]. However, very long survival has been reported in patients with *TERT* mutation (27 years in one report) [36]. Moreover, more than half of the patients in the current series did not present IPF but rather other pulmonary diagnoses such as alveolar proteinosis or hypersensitivity pneumonitis, with less severe prognosis [37]. Patients may have been referred earlier because of familial history of pulmonary fibrosis, which may have resulted in increased survival. Age was not significantly associated with decreased transplant-free survival ($p=0.11$). However, relatively younger patients were frequently referred for lung transplantation, which resulted in decreased transplant free-survival in this group.

Our study contains several limitations. Because of the retrospective nature of the study, some data are missing and a centre bias may exist; however, we did not find any centre effect for the prevalence of mutation or survival. Second, we did not confirm the impact of the mutations at a protein level with functional analysis or specific transfection, although telomere length and analysis of telomerase activity may be difficult to interpret [38, 39]. However, we considered all the rare variants as possibly pathogenic mutations, as is usual in a genetic diagnostic process and actualised recommendations, although identification of causal variants is a challenge of current genetics [18, 19, 40]. Several mutations had been previously reported with or without functional analysis or specific transfection. Pathogenic scores (CADD score and polyphen) were predicted to be deleterious, although telomere lengths were not reduced in Southern blot analysis for all patients. Four other genes have been reported to cause telomere-mediated pulmonary fibrosis: *RTEL1*, *PARN*, *DKC1* and *TINF2* [30, 31, 41–43]. Indeed, the transplant-free survival in the group without *TERT/TERC* DAV could be affected by a mutation within one of these genes [44].

In conclusion, this series suggests that patients with ILD, idiopathic or non-idiopathic, who feature FPF or have extra-pulmonary signs suggestive of telomere syndrome, should undergo genetic testing. However, increasing the number of patients and genes analysed without conclusive functional analysis will also lead to increase in the number of variants of unknown significance, as reported for some patients of this cohort.

Acknowledgements

Collaborators: E. Magois, B. Toublanc (CHU d'Amiens, Amiens), A. Plessier (Hopital Beaujon, Clichy), A. Gondouin (Hopital Minjoz, Besancon), L. Savale (Hopital du Kremlin-Bicetre, Bicetre), D. Bouvry, B. Duchemann, A. Hervé, Y. Uzunhan, M. Zysman (Hopital Avicenne, Bobigny), B. Gentil (Hopital Oudot, Bourgoin), P. Bonniaud, L. Olivier-Faivre (CHU de Dijon, Dijon), A. Mehdaoui (Hopital Eure Seine, Evreux), J. Le Pavec (Centre chirurgical Marie Lannelongue, Le Plessis Robinson), N. Pottier, B. Wallaert (CHRU de Lille, Lille), C. Khouatra, L. Kiakouama, J. Tractlet, P.-J. Souquet (Hopitaux Pradel et Lyon sud, Lyon), C. Gomez (Hopital Nord, Marseille), A. Bourdin, V. Moulaire (CHRU de Montpellier, Montpellier), M. Aubier, O. Brugière, G. Dauriat, P. Dieudé, A. Marceau, M. Neuville, P. Pradère, C. Taillé (Hopital Bichat, Paris), L. Teixeira (Hopital Cochin, Paris), S. Feuillet, L. Galicier, G. Lorillon, E. Oksenhendler, R.P. de la Tour, F. Riviere, F.S. de Fontbrune, Y. Tandjaoui (Hopital Saint Louis, Paris), M. Wislez, A. Olaiwan, H. Lioté (Hopital Tenon, Paris), J.F. Boitiaux (Hopital Dubos, Pontoise), P. Delaval (Hopital Pontchaillou, Rennes), S. Dominique (Hopital Nicolle, Rouen), S. Hirschi (Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg), A. Didier, S. Ollier (Hopital Larrey, Toulouse), E. Manali, S. Papiris (Attikon University Hospital, Athens, Greece), S. Amselem, N. Nathan, A. Clement (Hopital Trousseau, Paris; all France).

Author contributions are as follows. Conception and design: R. Borie, L. Tabèze, G. Thabut, C. Kannengiesser, B. Crestani; analysis and interpretation: R. Borie, L. Tabèze, H. Nunes, V. Cottin, S. Marchand-Adam, G. Prevot, A. Tazi, J. Cadranel, H. Mal, L. Wemeau-Stervinou, G. Thabut, A. Bergeron Lafaurie, D. Israel-Biet, C. Picard, M. Reynaud Gaubert, S. Jouneau, J.-M. Naccache, J. Mankikian, C. Ménard, P. Revy, J.-F. Cordier, D. Valeyre, B. Grandchamp, C. Kannengiesser, B. Crestani; drafting the manuscript for important intellectual content: R. Borie, L. Tabèze, H. Nunes, V. Cottin, S. Marchand-Adam, J. Cadranel, L. Wemeau-Stervinou, G. Thabut, J.-M. Naccache, J.-F. Cordier, D. Valeyre, C. Kannengiesser, B. Crestani.

References

- 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.
- Kropski JA, Pritchett JM, Zoz DF, et al. Extensive phenotyping of individuals at-risk for familial interstitial pneumonia reveals clues to the pathogenesis of interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 191: 417–426.
- Tsakiri KD, Cronkhite JT, Kuan PJ, et al. Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 7552–7557.
- Armanios MY, Chen JJ, Cogan JD, et al. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2007; 356: 1317–1326.
- Borie R, Crestani B, Dieude P, et al. The MUC5B variant is associated with idiopathic pulmonary fibrosis but not with systemic sclerosis interstitial lung disease in the European Caucasian population. *PLoS One* 2013; 8: e70621.
- Armanios M. Telomeres and age-related disease: how telomere biology informs clinical paradigms. *J Clin Invest* 2013; 123: 996–1002.
- Calado RT, Regal JA, Kleiner DE, et al. A spectrum of severe familial liver disorders associate with telomerase mutations. *PLoS One* 2009; 4: e7926.
- Collopy LC, Walne AJ, Cardoso S, et al. Triallelic and epigenetic-like inheritance in human disorders of telomerase. *Blood* 2015; 126: 176–184.
- Diaz de Leon A, Cronkhite JT, Katzenstein AL, et al. Telomere lengths, pulmonary fibrosis and telomerase (TERT) mutations. *PLoS One* 2010; 5: e10680.
- Horimasu Y, Ohshimo S, Bonella F, et al. MUC5B promoter polymorphism in Japanese patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respirology* 2015; 20: 439–444.
- Seibold MA, Wise AL, Speer MC, et al. A common MUC5B promoter polymorphism and pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2011; 364: 1503–1512.
- Raghu G, Collard HR, Egan JJ, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183: 788–824.
- Travis WD, Costabel U, Hansell DM, et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 188: 733–748.
- Cottin V, Crestani B, Valeyre D, et al. Diagnosis and management of idiopathic pulmonary fibrosis: French practical guidelines. *Eur Respir Rev* 2014; 23: 193–214.
- Savage SA, Bertuch AA. The genetics and clinical manifestations of telomere biology disorders. *Genet Med* 2010; 12: 753–764.
- World Health Organisation nutritional anaemias report of a WHO scientific group. World Health Organisation, Geneva, 1968.
- Raghu G, Collard HR, Egan JJ, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183: 788–824.
- Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015; 17: 405–424.
- Claustres M, Kozich V, Dequeker E, et al. Recommendations for reporting results of diagnostic genetic testing (biochemical, cytogenetic and molecular genetic). *Eur J Hum Genet* 2014; 22: 160–170.
- Therneau TM, Grambsch PM. Modeling survival data: extending the Cox model. Springer, New York, 2000.

- 21 Marchand-Adam S, Diot B, Magro P, *et al.* Pulmonary alveolar proteinosis revealing a telomerase disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 188: 402–404.
- 22 Nunes H, Monnet I, Kannengiesser C, *et al.* Is telomeropathy the explanation for combined pulmonary fibrosis and emphysema syndrome?: report of a family with TERT mutation. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 189: 753–754.
- 23 Borie R, Kannengiesser C, Hirschi S, *et al.* Severe hematologic complications after lung transplantation in patients with telomerase complex mutations. *J Heart Lung Transplant* 2015; 34: 538–546.
- 24 Cottin V, Crestani B, Valeyre D, *et al.* Recommandations pratiques pour le diagnostic et la prise en charge de la fibrose pulmonaire idiopathique. Elaborées par le centre national de référence et les centres de compétence pour les maladies pulmonaires rares sous l'égide de la Société de pneumologie de langue française. [French practical guidelines for the diagnosis and management of idiopathic pulmonary fibrosis. From the National Reference and the Competence centers for rare diseases and the Société de Pneumologie de Langue Française.] *Rev Mal Respir* 2013; 30: 879–902.
- 25 Diaz de Leon A, Cronkhite JT, Yilmaz C, *et al.* Subclinical lung disease, macrocytosis, and premature graying in kindreds with telomerase (TERT) mutations. *Chest* 2011; 140: 753–763.
- 26 Vulliamy T, Marrone A, Dokal I, *et al.* Association between aplastic anaemia and mutations in telomerase RNA. *Lancet* 2002; 359: 2168–2170.
- 27 Parry EM, Alder JK, Qi X, *et al.* Syndrome complex of bone marrow failure and pulmonary fibrosis predicts germline defects in telomerase. *Blood* 2011; 117: 5607–5611.
- 28 Gorgy AI, Jonassaint NL, Stanley SE, *et al.* Hepatopulmonary syndrome is a frequent cause of dyspnea in the short telomere disorders. *Chest* 2015; 148: 1019–1026.
- 29 Okamoto T, Miyazaki Y, Tomita M, *et al.* A familial history of pulmonary fibrosis in patients with chronic hypersensitivity pneumonitis. *Respiration* 2013; 85: 384–390.
- 30 Stuart BD, Choi J, Zaidi S, *et al.* Exome sequencing links mutations in PARN and RTEL1 with familial pulmonary fibrosis and telomere shortening. *Nat Genet* 2015; 47: 512–517.
- 31 Kannengiesser C, Borie R, Menard C, *et al.* Heterozygous RTEL1 mutations are associated with familial pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2015; 46: 474–485.
- 32 Calado RT, Brudno J, Mehta P, *et al.* Constitutional telomerase mutations are genetic risk factors for cirrhosis. *Hepatology* 2011; 53: 1600–1607.
- 33 Silhan LL, Shah PD, Chambers DC, *et al.* Lung transplantation in telomerase mutation carriers with pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2014; 44: 178–187.
- 34 Tokman S, Singer JP, Devine MS, *et al.* Clinical outcomes of lung transplant recipients with telomerase mutations. *J Heart Lung Transplant* 2015; 34: 1318–1324.
- 35 Stuart BD, Lee JS, Kozlitina J, *et al.* Effect of telomere length on survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: an observational cohort study with independent validation. *Lancet Respir Med* 2014; 2: 557–565.
- 36 El-Chemaly S, Ziegler SG, Calado RT, *et al.* Natural history of pulmonary fibrosis in two subjects with the same telomerase mutation. *Chest* 2011; 139: 1203–1209.
- 37 Flaherty KR, Thwaite EL, Kazerooni EA, *et al.* Radiological versus histological diagnosis in UIP and NSIP: survival implications. *Thorax* 2003; 58: 143–148.
- 38 Stanley SE, Chen JJ, Podlevsky JD, *et al.* Telomerase mutations in smokers with severe emphysema. *J Clin Invest* 2015; 125: 563–570.
- 39 Marrone A, Sokhal P, Walne A, *et al.* Functional characterization of novel telomerase RNA (TERC) mutations in patients with diverse clinical and pathological presentations. *Haematologica* 2007; 92: 1013–1020.
- 40 MacArthur DG, Manolio TA, Dimmock DP, *et al.* Guidelines for investigating causality of sequence variants in human disease. *Nature* 2014; 508: 469–476.
- 41 Cogan JD, Kropski JA, Zhao M, *et al.* Rare variants in RTEL1 are associated with familial interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2015; 191: 646–655.
- 42 Alder JK, Stanley SE, Wagner CL, *et al.* Exome Sequencing Identifies Mutant TINF2 in a Family With Pulmonary Fibrosis. *Chest* 2015; 147: 1361–1368.
- 43 Alder JK, Parry EM, Yegnasubramanian S, *et al.* Telomere phenotypes in females with heterozygous mutations in the dyskeratosis congenita 1 (DKC1) gene. *Hum Mutat* 2013; 34: 1481–1485.
- 44 Kropski JA, Blackwell TS, Loyd JE. The genetic basis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2015; 45: 1717–1727.

Online data supplement

METHODS

GENETIC ANALYSIS

Exons, intron-exon junctions and promoters of *TERT* and *TERC* were sequenced by bi-directional sequencing (primers sequences available on request) or new-generation sequencing (multiplicom custom test, infYnity-biomarkers, Lyon, France) and compared to the reference sequences for *TERT* (NM_198253.2) and *TERC* (NR_001566.1).

All patient carriers of heterozygous *TERT/TERC* disease causing variant underwent genotyping for the *MUC5B* rs35705950 single nucleotide polymorphism (SNP) by use of a competitive allele-specific PCR system (Kaspar genotyping, Kbioscience, Hoddeston, UK) and the Taqman SNP genotyping assay-allelic discrimination method (Applied Biosystem, Foster City, CA) as described (1) or bi-directional sequencing (primers sequences available on request). Prevalence of the at-risk polymorphism was compared to the prevalence in the French IPF cohort and non-ILD controls, as previously reported (1).

LEUCOCYTES TELOMERE LENGTH

The telomere length was evaluated by terminal restriction fragment assay. DNA from blood cells was extracted, digested by the *Hinf1* and *Rsa1* nucleases (which do not digest telomere DNA sequences), underwent Southern blot analysis with a specific telomere probe, and compared to those found in healthy age-matched controls, telomere length below 10% of the normal value were considered as reduced (2).

RESULTS:

PATIENTS

Patients presented the following hepatic diseases: idiopathic cirrhosis (n=32, 4 with hepatocellular carcinoma), secondary cirrhosis (n=16; due to hepatitis C infection [n=2],

alcohol use [n=10], nonalcoholic steatohepatitis [n=3] or primary biliary cirrhosis [n=1]), unexplained chronic elevated liver enzymes (n=10), focal nodular hyperplasia (n=2) and hemochromatosis (n=1).

The haematological diseases were unexplained isolated macrocytosis (n=13), unexplained isolated thrombocytopenia (n=15), thrombocytopenia and macrocytosis (n=6), myelodysplasia (n=23), acute leukemia (n=9), myelofibrosis (n=1), bone-marrow failure (n=3).

Cutaneous signs were premature graying of hair (n=8), skin hyperpigmentation (n=7), nail dystrophy (n=1), and oral leukoplakia (n=2). Only one patient fulfilled the dyskeratosis congenita criteria.

The following fibrogenic exposures were considered: amiodarone (n=1), nitrofurantoin (n=1) asbestos (n=21), silica (n=8), metals (n=10), wood (n=5), textiles (n=3), plastics (n=1), dust and birds (n=7), mold (n=4), glue (n=1), ink (n=1), benzene (n=1), mercury (n=1), steam or cleaning products (n=2), painting (n=2), coal (n=1), sausages (n=1), or hay (n=1).

Table E1. *TERT* and *TERC* variants retained as disease-associated.

<i>TERT</i> variants (n=34)													
DNA	Amino acid	Clinical				Telomere length Southern Blot, kb	Previous reports¥	Frequency ExAC	Prediction scores				Conclusion
		Age	Available Segregation	Hepatic disease	Hematologic disease				Sift	Polypeptide	CADD (PHRED)	Splice €	
c.22_43dup22	p.Arg15Profs*184	52	2/2	No	No	4.95		NR	NA	NA			Path
c.55C>T	p.Arg19Cys	68	1/1	Yes	No	6.58		NR	0.09	0.874	25.7		VUSD
c.198_207del	p.Ala67profs*8	79	1/1	No	Yes	8.77		NR	NA	NA			Path
c.228C>A	p.Cys76*	67	1/1	No	No	7.96		NR	NA	NA	35.0		Path
c.395G>A	p.Arg132Gln	63	2/2	No	No	8.90		NR	0.2	0.42	23.9		VUSD
c.1511C>T	p.Ser504Leu	67	2/2	Yes	Yes	7.22		NR	0.04	0.93	24.2		LikePath
c.1627A>G	p.Lys543Glu	71	1/1	No	Yes	NA		NR		0.69	9.796		VUSD
c.1630T>C	p.Phe544Leu	61	2/2	Yes	Yes	5.19		NR	0.12	0.99	16.6		LikePath
c.1692G>A		52	1/1	No	Yes	NA	\$	NR	NA	NA	13.2	Yes ¹	LikePath
c.1710G>C	p.Lys570Asn	58	1/1	No	Yes	8.56	Yes	NR	0.04	1.0	25.8		Likepath
c.1864C>T	p.Arg622Cys	72	1/1	No	No	NA		NR	0.00	1.0	28.9		LikePath
c.1864C>T	p.Arg622Cys	57	1/1	No	Yes	7.54		NR	0.00	1.0	28.9		LikePath
c.2093G>A	p.Arg698Gln	54	1/1	Yes	Yes	7.99		NR	0.06	0.88	22.1		VUSD
c.2105C>T	p.Pro702Leu	69	2/2	No	Yes	5.59	Yes	NR	0.1	0.87	13.6		Path
c.2146G>A	p.Ala716Thr	54	9/9	Yes	Yes	6.00	Yes	NR	0.04	1.0	29.3		Path
c.2159T>C	p.Ile720Thr	41	1/1	No	Yes	8.17		NR	0.01	0.93	27.0		VUSD
c.2267G>T	p.Arg756Leu	49	1/1	No	Yes	3.79		NR	0.39	0.13	23.4		LikePath
c.2287-2A>G		43	1/1	Yes	Yes	7.56		NR	NA	NA	20.4	Yes	Path
c.2383-2A>G		52	2/2	No	No	5.57		NR	NA	NA	20.9	Yes	Path
c.2638G>A	p.Ala880Thr	70	1/1	No	No	NA		NR	0.05	1.0	27.3		LikePath
c.2638G>A	p.Ala880Thr	68	1/1	Yes	Yes	6.98		NR	0.05	1.0	27.3		LikePath

c.2639C>T	p.Ala880Val	50	1/1	Yes	No	3.99		NR	0.38	1.0	26.6		LikePath
c.2639C>T	p.Ala880Val	38	1/1	No	Yes	5.26		NR	0.38	1.0	26.6		LikePath
c.2678A>T	p.Glu893Val	48	1/1	Yes	No	7.35		NR	0.01	0.995	25.9		VUSD
c.2843+1G>A		41	5/5	Yes	Yes	8.25		NR	NA	NA	23.6	Yes	Path
c.2849delC	p.Arg951Glyfs*30	68	2/2	No	Yes	7.57		NR	NA	NA	28.6		Path
c.2911C>T	p.Arg971Cys	36	1/1	No	Yes	7.55		NR	0.02	0.96	28.6		LikePath
c.2911C>T	p.Arg971Cys	59	2/2	No	Yes	10.43		NR	0.02	0.96	28.6		LikePath
c.2911C>T	p.Arg971Cys	75	1/1	No	Yes	10.5		NR	0.02	0.96	28.6		LikePath
c.2935C>T	p.Arg979Trp	52	1/1	Yes	No	4.73	Yes	NR	0.01	0.98	32.0		LikePath
c.2935C>T	p.Arg979Trp	66	2/2	No	No	4.42	Yes	NR	0.01	0.98	32.0		Path
c.2945G>A	p.Cys982Tyr	57	1/1	No	No	7.07		NR	0.02	0.99	29.5		VUSD
c.2968C>T	p.Gln990*	62	2/2	Yes	No	7.33		NR	NA	NA	39.0		Path
c.3216G>A	p.Trp1072*	63	3/3	No	No	10.62		NR	NA	NA	41.0		Path
c.3026C>T	p.Ala1009Val	49	1/1	Yes	Yes	NA		NR	0.02	0.69	27.9		VUSD
TERC variants (n=6)													
DNA	RNA	Age	Available Segregation	Hepatic disease	Hematologic disease	Telomere length Southern Blot, kb	Previous reports	Frequency ExAC	CADD score (PHRED)	GERP score	RNA fold		conclusion
c.1-22C>U		49	1/1	Yes	Yes	NA		NR	8.86	1.41	NA		LikePath
c.1-22C>T		46	1/1	Yes	No	4.33		NR	8.86	1.41	NA		LikePath
	r.110_113del GACU	41	3/3	No	Yes	4.3	Yes	NR	18.9	5.51,5.51,3.07,5.51	No		Path
	r.135G>C	55	1/1	Yes	No	NA		NR	18.8	3.78	Yes		VUSD
	r.182delG	39	1/1	Yes	Yes	5.56	Yes	NR		5.33	No		Path
	r.236C>U	53	1/1	No	No	4.71		NR	14.5	4.42	Yes		LikePath

The segregation column indicates the number of person analyzed within this family with-segregation of the disease with the mutation or free of disease at least at the same age than the probands without the mutation.

Telomere length was assessed by Southern blot analysis and expressed in kilobytes.

¥ Previous germline reported in telomerase database (<http://telomerase.asu.edu/diseases.html>) or in MEDLINE database.

\$ Another family with aplastic anemia within our database presents the same variant (unpublished personal data).

€ The variations were predicted to modify the splicing sites.

NA Not available; NR, not reported; NA, not applicable;

RNA fold predictions were obtained with RNA fold server (3), available at <http://rna.tbi.univie.ac.at/>.

¹ the c.1692G>A is predicted to activate a cryptic splice site (NNNsplice : http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)

Conclusion based on ACMG recommendations (4): Path Pathogenic, LikePath: likely pathogenic, VUSD variant of uncertain significance possibly disease associated.

Table E2. Variants of unknown significance considered as possibly benign within *TERT* or *TERC*

DNA	Amino acid	Clinical				Telomere length Southern Blot, kb	Frequency on ExAC	Prediction score				Conclusion
		Age	Available Segregation	Hepatic disease	Hematologic disease			Sift	Polyphen	CAD D (PHRED)	Splice site prediction	
<i>TERT</i>												
c.448G>A	p.Val150Ile	75	1/1	Yes	No	7.15	NR	0.18	0.03	8.35	NA	VUSB
c.1234C>T	p.His412Tyr	30	2/2	Yes	Yes	4.76	3%	0.82	0.083	4.9	NA	VUSB
c.1358G>C	p.Arg453Pro	66	1/1	Yes	No	6.90	NR	0.01	0.11	1.68	NA	VUSB
c.2517G>A	p.Thr839Thr	47	1/1	No	No	9.89	0.28%	NA	NA	12.98	No	VUSB
c.2836T>C	p.Tyr946His	76	1/1	No	Yes	NA	NR	0.27	0.17	14.84	NA	VUSB
c.3134C>A	p.Ser1045Tyr	64	1/1	No	No	8.56	NR	0.14	0.03	3.68	NA	VUSB
c.2106G>A	p.Pro702Pro	69	1/1	Yes	No	8.24	0.11%	NA	NA	11.68	No	VUSB
c.2287-5G>A		57	1/1	No	No	9.19	18/44697	NA	NA	3.6	No	VUSB
c.2468+6T>G		51	1/1	No	Yes	NA	NR	NA	NA	1.6	Yes ¹	VUSB
<i>TERC</i>												
c.457G>T		73	1/1	No	Yes	4.57	1/49000	9.1	-0.53	NA		VUSB

VUS B =variant of uncertain significance possibly benign.

¹ The c.2468+6T>G is predicted to abolish the donor splicing site by NNsplice.

References

1. Borie R, Crestani B, Dieude P, Nunes H, Allanore Y, Kannengiesser C, et al. The MUC5B variant is associated with idiopathic pulmonary fibrosis but not with systemic sclerosis interstitial lung disease in the European Caucasian population. *PLoS One*. 2013;8(8):e70621.
2. Touzot F, Gaillard L, Vasquez N, Le Guen T, Bertrand Y, Bourhis J, et al. Heterogeneous telomere defects in patients with severe forms of dyskeratosis congenita. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(2):473-82, 82 e1-3.
3. Gruber AR, Bernhart SH, Lorenz R. The ViennaRNA web services. *Methods Mol Biol*. 2015;1269:307-26.
4. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405-24.



Département de Génétique - Pr. Catherine Boileau

HUPNVS – Hôpital Bichat Claude Bernard-46 rue Henri Huchard 75877 Paris cedex 18

PATIENT (ou ETIQUETTE)

Nom :
Nom de jeune fille :
Prénom : Sexe :
Date de naissance : / /

Etiquette

PRELEVEMENT : A envoyer au Dr. Caroline Kannengiesser – Département Génétique – Hôpital Bichat-Claude Bernard – 46 rue Henri Huchard – 75877 Paris Cedex 18 – caroline.kannengiesser@bch.aphp.fr; Tel : 01 40 25 85 52/secrétariats : 01 40 25 88 51/ 85 51

1^{er} Prélèvement Date de prélèvement : / /
 2nd prélèvement Identité du Préleveur :

Merci de nous adresser du Sang sur EDTA (1 tube de 7ml)

Autres : ADN (Concentration : ; Volume : Technique extraction)
 Sang sur Paxgène

Pour toute demande urgente, merci de prendre contact par mail ou téléphone.

Le transport au laboratoire peut se faire à température ambiante (max 72h) avec un transporteur homologué.

MEDECIN PRESCRIPTEUR (coordonnées précises) - les résultats seront communiqués au médecin prescripteur
Remarque : seuls les médecins praticiens titulaires d'un doctorat en médecine peuvent prescrire un test génétique
En cas de prescription par un interne, merci de rajouter les coordonnées du senior en charge du patient

Nom et Prénom :
N° RPPS (hors APHP) ou Code APH (APHP) :
E-mail :
Adresse :
Téléphone : Fax :

Cachet du service
ou
Etiquette UH
(Obligatoire pour APHP)

Votre demande d'analyse doit obligatoirement être accompagnée de :

- Copie du consentement éclairé daté et signé du patient (Article 16-10 du Code Civil, article R1131-1 du Code de la Santé Publique)
- Original de l'attestation de consultation du prescripteur (Article R1131-5 du Code de la Santé Publique et décret n°2008-321 du 4 avril 2008)
- Renseignements cliniques détaillés (fiche de renseignement clinique ci-jointe +/- compte-rendu détaillé de

INDICATIONS Pathologie Gesbiol = anomalie des télomères

Code patho pour la réception =TL

Cas index (nouveau patient) :

Apparenté (enquête familiale) : L'enquête familiale ne peut être réalisée que si les causes moléculaires ont été identifiées dans la famille.

- Lien de parenté avec le cas index :

- Mutation(s) rapportée(s) dans la famille :

- Nom et prénom du cas index :

INDICATIONS D'UNE EXPLORATION MOLECULAIRE

L'analyse moléculaire des gènes *TERT* et *TERC* est indiquée dans le cadre d'une suspicion d'une forme génétique de fibrose pulmonaire : dans un contexte de fibrose pulmonaire familiale, d'une suspicion de téloméropathie (atteinte hématologique, hépatologique ou dermatologique associées), d'une fibrose pulmonaire de survenue précoce (<50 ans) ou dans le cadre d'un bilan pré-greffe.

**Patient :**

Nom Prénom : Date de naissance : / /

Renseignements concernant le patient**-Tableau clinique compatible avec une fibrose pulmonaire** OUI NON Si oui, date de découverte : Biopsie pulmonaire OUI NON

Si oui, préciser le type histologique :

- Pneumopathie interstitielle commune (UIP) Pneumopathie interstitielle non spécifique (PINS)
 Pneumopathie interstitielle desquamative (DIP) Pneumopathie organisée
 Autre (en toutes lettres) :

La maladie est-elle idiopathique ? OUI NON **causes :**
- Polyarthrite Rhumatoïde
- Médicamenteux :
- Autres :

Tabac NON OUI, si OUI évaluer le nombre de PA :, ACTIF, SEVRE**Prise en charge thérapeutique :**

- Patient en cours de bilan pré greffe pulmonaire
 Patient greffé
 Traitement en cours : Pirfénidone nintedanib autres :

Autres signes associés :**-Signes cutanés, phanériens ou muqueux** OUI préciser : dystrophie des ongles, hyperpigmentation cutanée associée à des zones d'atrophie, leucoplasie des muqueuses**-Signes hématologiques** OUI préciser : Macrocytose, Anémie aplastique, Autre cytopénie, Déficit immunitaire, Syndrome myélodysplasique, Leucémie myéloïde aigüe**Paramètres hématologiques :** VGM :fl plaquettes :G/l**-Signes hépatiques** OUI préciser: Hypertension portale idiopathique, Cirrhose ou fibrose cryptogénétique**-Cancers** OUI préciser : Cutané, ORL, œsophage**-Dysthyroïdie** OUI préciser :**-Autres** OUI préciser :**Renseignements concernant les apparentés du patient****Apparentés atteints :** OUI NON*Pour chaque apparenté, préciser le lien de parenté, le type d'atteinte (cutanée, hématologiques, hépatiques et autres) - joindre un arbre généalogique si possible*

1- Lien de parenté : et Atteintes :

2- Lien de parenté : et Atteintes :

3- Lien de parenté : et Atteintes :

4- Lien de parenté : et Atteintes :



Shared genetic predisposition in rheumatoid arthritis-interstitial lung disease and familial pulmonary fibrosis

Pierre-Antoine Juge^{1,2,51}, Raphaël Borie^{2,3,4,51}, Caroline Kannengiesser^{2,5,6,51}, Steven Gazal^{2,7,8}, Patrick Revy^{9,10}, Lidwine Wemeau-Stervinou^{11,12}, Marie-Pierre Debray^{2,13}, Sébastien Ottaviani^{1,2}, Sylvain Marchand-Adam^{14,15,16}, Nadia Nathan^{17,18,19}, Gabriel Thabut^{2,4,20}, Christophe Richez^{12,21,22,23}, Hilario Nunes^{24,25}, Isabelle Callebaut^{19,26}, Aurélien Justet^{2,3}, Nicolas Leulliot^{10,27}, Amélie Bonnefond^{12,28,29}, David Salgado^{30,31}, Pascal Richette^{2,32,33}, Jean-Pierre Desvignes^{30,31}, Huguette Liote³⁴, Philippe Froguel^{12,28,35}, Yannick Allanore^{10,36,37}, Olivier Sand^{12,28,29}, Claire Dromer^{23,38}, René-Marc Flipo^{12,39}, Annick Clément^{17,18,19}, Christophe Bérout^{30,31,40}, Jean Sibilia^{41,42,43}, Baptiste Coustet^{1,2}, Vincent Cottin^{44,45}, Marie-Christophe Boissier^{25,46,47}, Benoit Wallaert^{11,12}, Thierry Schaeverbeke^{21,22,23}, Florence Dastot le Moal^{17,19,48}, Aline Frazier^{2,32}, Christelle Ménard^{17,18,19}, Martin Soubrier⁴⁹, Nathalie Saidenberg^{25,47}, Dominique Valeyre^{24,25}, Serge Amselem^{17,18,48}, the FREX consortium⁵², Catherine Boileau^{2,5,50}, Bruno Crestani^{2,3,4} and Philippe Dieudé^{1,2,6}



@ERSpublications

Contribution of TERT, RTEL1, PARN and SFTPC mutations to rheumatoid interstitial lung disease susceptibility <http://ow.ly/SXEm30a98Ic>

Cite this article as: Juge P-A, Borie R, Kannengiesser C, *et al.* Shared genetic predisposition in rheumatoid arthritis-interstitial lung disease and familial pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2017; 49: 1602314 [<https://doi.org/10.1183/13993003.02314-2016>].

ABSTRACT Despite its high prevalence and mortality, little is known about the pathogenesis of rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease (RA-ILD). Given that familial pulmonary fibrosis (FPF) and RA-ILD frequently share the usual pattern of interstitial pneumonia and common environmental risk factors, we hypothesised that the two diseases might share additional risk factors, including FPF-linked genes. Our aim was to identify coding mutations of FPF-risk genes associated with RA-ILD.

We used whole exome sequencing (WES), followed by restricted analysis of a discrete number of FPF-linked genes and performed a burden test to assess the excess number of mutations in RA-ILD patients compared to controls.

Among the 101 RA-ILD patients included, 12 (11.9%) had 13 WES-identified heterozygous mutations in the *TERT*, *RTEL1*, *PARN* or *SFTPC* coding regions. The burden test, based on 81 RA-ILD patients and 1010 controls of European ancestry, revealed an excess of *TERT*, *RTEL1*, *PARN* or *SFTPC* mutations in RA-ILD patients (OR 3.17, 95% CI 1.53–6.12; $p=9.45 \times 10^{-4}$). Telomeres were shorter in RA-ILD patients with a *TERT*, *RTEL1* or *PARN* mutation than in controls ($p=2.87 \times 10^{-2}$).

Our results support the contribution of FPF-linked genes to RA-ILD susceptibility.

This article has supplementary material available from erj.ersjournals.com

Received: Nov 28 2016 | Accepted after revision: Feb 11 2017

Copyright ©ERS 2017

Affiliations: ¹APHP, Hôpital Bichat, Service de Rhumatologie, DHU FIRE, Paris, France. ²Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France. ³APHP, Hôpital Bichat, Service de Pneumologie A, DHU FIRE, Paris, France. ⁴INSERM U1152, Paris, France. ⁵APHP, Service de Génétique, Hôpital Bichat, Paris, France. ⁶INSERM, UMR_1149 Centre de Recherches sur l'Inflammation Paris, Paris, France. ⁷INSERM, IAME, UMR_1137, Paris, France. ⁸APHP, Plateforme de génomique constitutionnelle du GHU Nord, Hôpital Bichat, Paris, France. ⁹INSERM UMR_1163, Laboratory of Genome Dynamics in the Immune System, Institut Imagine, Paris, France. ¹⁰Université Paris Descartes, Sorbonne Cité, Paris, France. ¹¹CHRU de Lille, Service de Pneumologie et Immuno-Allergologie, Centre de compétence maladies pulmonaires rares, FHU IMMIMENT, Lille, France. ¹²Université Lille 2, Lille, France. ¹³APHP, Hôpital Bichat, Service de Radiologie, Paris, France. ¹⁴CHRU Tours, Service de Pneumologie, Tours, France. ¹⁵Université François Rabelais, Tours, France. ¹⁶INSERM, U1100, Tours, France. ¹⁷APHP, Service de Pneumologie Pédiatrique et Centre de référence des maladies respiratoires rares, Hôpital Trousseau, Paris, France. ¹⁸INSERM UMR_S933, Paris, France. ¹⁹Université Pierre et Marie Curie, Sorbonne Paris Cité, Paris, France. ²⁰APHP, Hôpital Bichat, Service de Pneumologie B, DHU FIRE, Paris, France. ²¹CHU de Bordeaux, service de rhumatologie, Bordeaux, France. ²²Immuno ConcEpT, CNRS UMR_5164, Bordeaux, France. ²³Université de Bordeaux, Bordeaux, France. ²⁴AP-HP, Hôpital Avicenne, Service de Pneumologie, Bobigny, France. ²⁵Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Paris, France. ²⁶CNRS UMR_7590, MNHM-IRD-IUC, Paris, France. ²⁷Laboratoire de Cristallographie et RMN Biologiques, UMR CNRS 8015, Faculté de Pharmacie, Paris, France. ²⁸CNRS, UMR_8199, Lille, France. ²⁹European Genomic Institute for Diabetes, Lille, France. ³⁰Aix-Marseille Université, GMGF, Marseille, France. ³¹INSERM, UMR_S_910, Marseille, France. ³²AP-HP, hôpital Lariboisière, Service de Rhumatologie, Paris, France. ³³INSERM, UMR_1132, Paris, France. ³⁴APHP, Hôpital Tenon, Service de Pneumologie, Paris, France. ³⁵Dept of Genomics of Common Diseases, School of Public Health, Imperial College London, Hammersmith Hospital, London, UK. ³⁶APHP, Hôpital Cochin, Service de Rhumatologie A, Paris, France. ³⁷INSERM, U1016, UMR_8104, Paris, France. ³⁸CHU de Bordeaux, Service d'Imagerie Thoracique et Cardiovasculaire, Pessac, France. ³⁹CHU de Lille, Service de Rhumatologie, Lille, France. ⁴⁰APHM, Hôpital La Timone Enfants, Laboratoire de Génétique Moléculaire, Marseille, France. ⁴¹CHRU de Strasbourg, Service de Rhumatologie, Hôpital de Hautepierre, Strasbourg, France. ⁴²INSERM UMR_S1109, Laboratoire d'Immuno-Rhumatologie Moléculaire, CRHI, FMTS, Université de Strasbourg, Strasbourg, France. ⁴³Fédération Hospitalo-Universitaire OMICARE, Strasbourg, France. ⁴⁴Hospices Civils de Lyon, Hôpital Louis Pradel, Centre national de référence des maladies pulmonaires rares, Lyon, France. ⁴⁵INRA, UMR_754, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France. ⁴⁶INSERM U1125, Bobigny, France. ⁴⁷APHP, GH HUPSSD, Service de Rhumatologie, Bobigny, France. ⁴⁸APHP, Département de Génétique, Hôpital Trousseau, Paris, France. ⁴⁹CHU Clermont-Ferrand, Service de Rhumatologie, INRA, UMR1019, UNH, CRNH Auvergne, Clermont-Ferrand, France. ⁵⁰INSERM, UMR_1148, Maladies structurelles cardiovasculaires, Paris, France. ⁵¹These authors contributed equally. ⁵²Members are listed in the supplementary material.

Correspondence: Philippe Dieudé, Service de Rhumatologie, Hôpital Bichat, 46 rue Henri Huchard, 75018 Paris, France. E-mail: philippe.dieude@aphp.fr

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a destructive, systemic inflammatory and autoimmune disorder that affects up to 1% of the general adult population worldwide. Extra-articular disease occurs in nearly 50% of all RA patients, the lung being frequently involved [1]. Indeed, lung disease causes 10%–20% of all deaths in RA patients [2–4]. Specifically, interstitial lung disease (ILD) is the leading cause of mortality, accounting for a mortality rate that is approximately 13% higher in RA patients as compared to the general population [2, 4, 5], with a three-fold higher risk of death for those with ILD than those without [5]. In addition, whereas overall RA mortality rates are decreasing, RA-ILD deaths are increasing [6]. Despite its frequency and prognostic impact, RA-ILD has not been given much attention and we are far from understanding its pathogenesis [7].

In comparison to ILD occurring in other connective tissue diseases, patients with RA-ILD frequently present the usual interstitial pneumonia (UIP) pattern, which is characteristic of pulmonary fibrosis [8]. This pattern might explain the poor outcomes of RA-ILD patients, with survival rates similar to those of pulmonary fibrosis patients [9]. Familial pulmonary fibrosis (FPF) that might display histological patterns other than UIP has been linked to mutations in telomere maintenance-associated [10–15] and surfactant protein genes [16–18]. Most importantly, FPF and RA-ILD share common risk factors, such as cigarette smoking and the male sex [19, 20].

Given the above-cited similarities of RA-ILD and FPF, we hypothesised that RA-ILD and FPF share genetic risk factors. Therefore, we performed whole exome sequencing (WES) in RA-ILD patients to determine the contribution of mutations in genes previously linked to FPF.

Support statement: This work was supported by research grants from the Société Française de Rhumatologie, Club Rhumatismes Inflammation, la Chancellerie des Universités de Paris (legs Poix), Sorbonne Paris Cité (FPI-SPC Program), Agence Nationale de la Recherche (grants ANR-10-LABX-46, ANR-10-EQPX-07-01, ANR-14-CE10-0006 and ANR-10-INBS-09), France Génomique National Infrastructure, unrestricted grants from Pfizer, Roche and Chugai, and the Centre de Ressources Biologiques Hôpital Bichat, Paris, France. Additional acknowledgements can be found in the supplementary material. Funding information for this article has been deposited with the Crossref Funder Registry.

Conflict of interest: Disclosures can be found alongside this article at erj.ersjournals.com

Methods

Study participants

Consecutive RA patients with high-resolution computed tomography (HRCT) chest scans showing ILD were recruited by a French network of ILD-expert pulmonologists and RA-expert rheumatologists from 10 university hospitals during the period 2013–2015. All medical records were centrally reviewed by multidisciplinary discussion that included a pulmonologist (B. Crestani), rheumatologist (P. Dieudé) and radiologist. Medical records were independently reviewed to confirm whether subjects met the American College of Rheumatology criteria for RA [21]. The HRCT chest scans of the subjects were analysed by an experienced reader, blinded to clinical, biologic and genetic data, who scored the scans to ensure that the criteria for ILD were met [9]. In-house subjects (n=1010) without known autoimmune/inflammatory and/or pulmonary diseases served as healthy controls (supplementary material). The relevant ethics committees approved all procedures, and written informed consent was obtained from all participants in agreement with French bioethics laws.

WES followed by restricted analysis of FPF-linked genes in RA-ILD patients

FPF-risk genes implicated in telomere maintenance include telomerase reverse transcriptase (*TERT*) [10], telomerase RNA component (*TERC*) [10, 11], dyskerin (*DKC1*) [12], telomere-interacting factor-2 (*TINF2*) [13], regulator of telomere-elongation helicase-1 (*RTEL1*) [14, 15] and polyadenylation-specific ribonuclease deadenylation nuclease (*PARN*) [15]. FPF mutations are also found in genes that encode the following surfactant proteins: surfactant protein C (*SFTPC*) [16], ATP-binding cassette, subfamily A, member 3 (*ABCA3*) [17] and surfactant protein A2 (*SFTPA2*) [18]. We used WES, followed by an analysis restricted to these nine FPF-linked genes to assess excess mutations in RA-ILD patients. Sanger sequencing independently confirmed the WES-identified candidate disease-associated mutations.

TERT and *RTEL1* molecular modelling and three-dimensional structure visualisation

Models of the three-dimensional structure of *TERT* and *RTEL1* were built and analysed to assess the mutation effects.

Genotype–phenotype association analyses

Clinical, demographic, biological, HRCT chest scan and pulmonary function test results were assessed at RA-ILD patient inclusion. All HRCT scans were centrally reviewed and scored by a senior radiologist (M-P. Debray) (supplementary material). A telomeric restriction fragment length (TRFL) assay was used to measure telomere length in RA-ILD patients with mutations in telomere-maintenance candidate genes.

Statistical analyses

Power calculation

The 101 cases and 1010 controls provided a power higher than 70% to detect an overall association with an odds ratio of 3.0 (supplementary material).

Ancestry-inference analysis

Ancestry of all RA-ILD patients and controls was verified by principal component analysis, based on the individuals of the 1000 Genomes Project. To avoid population stratification bias, all outlier patient (*i.e.* those not of European ancestry according to the 1000 Genomes Project) data were excluded from the association analyses (burden test).

Burden test

A classical burden test was used to assess excess-risk mutations in RA-ILD. Significance was assessed using a one-sided Wald test.

Genotype–phenotype association analysis

Continuous variables, expressed as median (range), were compared using the t-test; categorical variables, expressed as n (%), were compared by the Fisher's exact test. Comparisons of RA-ILD patients with mutations were drawn using non-parametric tests because of the small sample size. Generalised additive models were used to evaluate the linearity of the relationship between continuous variables and mutation probability. Telomere lengths for *TERT/RTEL1/PARN* mutation carriers (n=11) and 15 healthy age-matched controls (TRFL being previously assessed for 13 of them [22]) were compared by logistic regression adjusted for age, using the R 3.1.2 glm function and corresponding figures were created with Graphpad Prism 6.0b. All statistical analyses were performed using the R 3.1.2 software. Levels of significance were defined at p<0.05.

Methods and corresponding analyses are detailed in the supplementary material.

Results

Phenotype of RA-ILD patients

We included 101 consecutive independent RA-ILD patients. Mean \pm SD age at RA onset was 53.54 \pm 15.40 years; 82.1% were anti-citrullinated peptide antibody-positive, 84.8% were rheumatoid factor-positive and 71.1% had erosive disease. Mean age at ILD onset was 61.42 \pm 11.81 years and mean RA duration before ILD detection was 7.93 \pm 10.83 years. Overall, 54.5% of all patients were ever-smokers and 65.4% showed the UIP pattern on HRCT. The demographic information and clinical characteristics are summarised in table 1.

Exome sequencing of FPF-linked genes in RA-ILD patients

WES combined with restricted analysis of the nine FPF-linked genes, followed by Sanger sequencing confirmation revealed that 12/101 RA-ILD patients (11.9%) carried 13 heterozygous mutations in the *TERT*, *RTEL1*, *PARN* or *SFTPC* coding regions (table 2, figure S2).

For telomere-maintenance genes, six RA-ILD patients carried six heterozygous *TERT* mutations: c.2383-2A>G, affecting intron splicing, not reported in the Exome Aggregation Consortium (ExAC) database, and c.3323C>T, p.Pro1108Leu, with ExAC minor allele frequency (MAF) of 5.55 \times 10⁻⁵. In addition, four RA-ILD patients carried the previously reported FPF recurrent mutation [23]: c.1234C>T, p.His412Tyr. The *TERT* p.His412Tyr MAF is 1.5% in the European population ExAC database, which could suggest that this variant is a common polymorphism. However, taking into account 1) a MAF of 0.6% in the overall ExAC database, 2) evidence of linkage of p.His412Tyr to familial pulmonary fibrosis [24] and 3) the functional consequences including shortened telomere length [24], in addition to decreased catalytic activity *in vitro* [23, 25], we considered p.His412Tyr a low penetrant mutation and included it in our genetic association test. *RTEL1* sequencing revealed four patients with four heterozygous mutations: three new mutations (c.2695 T>C, p.Phe899Leu; c.2824G>A, p.Asp942Asn; and c.2875C>T, p.His959Tyr) and the previously reported pathogenic mutation: c.2890T>C, p.Phe964Leu [22]. The p.Phe899Leu, p.His959Tyr and p.Phe964Leu mutations were not listed in the ExAC database, but p.Asp942Asn had an ExAC MAF of 2.06 \times 10⁻⁴. One RA-ILD patient carried a *PARN* heterozygous frameshift mutation

TABLE 1 Demographic and phenotypic characteristics of 101 patients with rheumatoid arthritis (RA)-associated interstitial lung disease (ILD) according to mutation status in familial idiopathic pulmonary fibrosis linked genes

Characteristic	All patients	With mutations	Without mutations	p-value
Female	59/101 (58.4)	6/12 (50)	53/89 (59.6)	0.75
Age at RA onset years	53.54 \pm 15.40	45.83 \pm 14.76	54.59 \pm 15.26	0.07
RA duration years	13.47 \pm 10.83	13.08 \pm 10.71	13.53 \pm 10.91	0.89
Age at ILD onset years	61.42 \pm 11.81	53.27 \pm 10.21	62.51 \pm 11.63	0.015
ILD duration years	5.17 \pm 5.99	5 \pm 3.28	5.19 \pm 6.29	0.87
RA duration preceding ILD detection years	7.93 \pm 10.83	8 \pm 11.59	7.92 \pm 10.80	0.98
Ever-smoker	55/101 (54.5)	7/12 (58.3)	48/89 (53.9)	1.00
Smoking pack years	24.85 \pm 18.41	20.14 \pm 16.97	25.54 \pm 18.67	0.46
Active smoker	9/55 (16.4)	2/7 (28.6)	7/48 (14.6)	0.70
Fibrogenic exposure or airborne contaminants	26/82 (31.7)	2/10 (20)	23/72 (31.9)	0.69
Methotrexate ever	82/101 (81.2)	9/12 (75)	73/89 (82)	0.85
Anti-TNF biologic ever	28/99 (28.3)	6/12 (50)	22/87 (25.3)	0.15
RA manifestations				
ACPA-positive	78/95 (82.1)	10/11 (90.9)	68/84 (80.9)	0.69
RF-positive	84/99 (84.8)	12/12 (100)	72/87 (82.8)	0.26
Erosive disease	69/97 (71.1)	11/12 (91.7)	58/85 (68.2)	0.41
Chest CT scan pattern				
UIP	66/101 (65.4)	8/12 (66.7)	58/89 (65.2)	0.97 [#]
Possible UIP	6/101 (5.9)	0	6/89 (6.7)	
NSIP	8/101 (7.9)	1/12 (8.3)	7/89 (7.9)	
Unclassifiable, other	21/101 (20.8)	3/12 (25)	18/89 (20.2)	
Pulmonary function test results at inclusion				
FVC % pred	85.08 \pm 25.78	76 \pm 27.85	86.28 \pm 25.43	0.27
DLco % pred	55.65 \pm 19.47	50.36 \pm 23.65	56.41 \pm 18.85	0.43
TLC % pred	80.88 \pm 20.62	77.47 \pm 20.38	81.46 \pm 20.78	0.58

Data are presented as mean \pm SD or (%), unless otherwise indicated. Some values were missing and the denominators are indicated. TNF: tumour necrosis factor; ACPA: anti-citrullinated peptide antibodies; RF: rheumatoid factor; CT: computed tomography; UIP: usual interstitial pneumonia; NSIP: nonspecific interstitial pneumonia; FVC: forced vital capacity; DLco: diffusing capacity of the lung for carbon monoxide; TLC: total lung capacity. [#]: UIP and possible UIP patterns *versus* other patterns.

TABLE 2 Clinical characteristics of 12 rheumatoid arthritis (RA)-associated interstitial lung disease (ILD) patients with familial idiopathic pulmonary fibrosis (FPF)-linked gene mutations

Case	Sex	Age years	RA duration years	ACPA status	RF status	Erosive disease	Familial history of ILD and/or STS [#]	ILD duration years	Chest CT diagnosis	FVC % pred	DLco % pred	Locus	c-DNA change	Amino acid change
1	F	61	3	Positive	Positive	Yes	No	3	UIP	49	33	<i>PARN</i>	c.1749_1750delAG	p.Ser585fs*5
2	F	66	14	ND	Positive	Yes	No	ND	UIP	44	NA	<i>RTEL1</i>	c.2695T>C	p.Phe899Leu
3	M	66	1	Positive	Positive	Yes	No	1	NSIP	64	56	<i>RTEL1</i>	c.2824G>A	p.Asp942Asn
4	M	64	10	Positive	Positive	Yes	No	10	UIP	58	26	<i>RTEL1</i>	c.2875C>T	p.His959Tyr
5	M	59	14	Positive	Positive	Yes	Yes (brother with IPF)	10	UIP	50	32	<i>RTEL1</i>	c.2890T>C	p.Phe964Leu
6	F	56	5	Positive	Positive	Yes	Yes (sister with IPF)	4	UIP	ND	58	<i>TERT</i>	c.2383-2A>G	-
7	F	63	38	Negative	Positive	Yes	No	5	Unclassifiable	102	57	<i>TERT</i>	c.3323C>T	p.Pro1108Leu
8	M	69	3	Positive	Positive	Yes	Possible (father with cirrhosis)	4	Unclassifiable	97	59	<i>TERT</i>	c.1234C>T	p.His412Tyr
9	M	68	24	Positive	Positive	Yes	No	4	UIP	104	103	<i>TERT</i>	c.1234C>T	p.His412Tyr
10	F	47	21	Positive	Positive	Yes	No	0	UIP	99	72	<i>TERT</i>	c.1234C>T	p.His412Tyr
11	M	48	8	Positive	Positive	Yes	Yes (daughter with IPF)	8	Unclassifiable	30	60	<i>TERT</i>	c.1234C>T	p.His412Tyr
12	F	40	16	Positive	Positive	Yes	No	6	UIP	28	57	<i>SFTPC</i> <i>SFTPC</i>	c.218T>C c.180G>A	p.Ile73Thr p.Met60Ile

ACPA: anti-citrullinated peptide antibodies; RF: rheumatoid factor; STS: short telomere syndrome; CT: computed tomography; FVC: forced vital capacity; DLco: diffusing capacity of the lung for carbon monoxide; M: male; F: female; ND: unknown, could not be determined; IPF: idiopathic pulmonary fibrosis; UIP: usual interstitial pneumonia; NSIP: nonspecific interstitial pneumonia. [#]: familial history of ILD was assessed for all RA-ILD patients carrying mutations in FPF-linked genes; the familial history of STS was assessed for patients carrying mutations in telomere maintenance genes (i.e. *TERT*, *RTEL1* and *PARN*).

(c.1749_1750delAG, p.Ser585fs*5), not reported in the ExAC database. We found no mutations in *TERC*, *DKC1* or *TINF2* genes.

For genes encoding surfactant-related proteins, one RA-ILD patient carried a previously reported heterozygous *SFTPC* mutation (c.218T>C, p.Ile73Thr) and another carried an unreported *SFTPC* heterozygous mutation (c.180G>A, p.Met60Ile). Both mutations were located at highly conserved positions in the pro-SP-C-linker domain. One RA-ILD patient was a double heterozygote carrying both a heterozygous mutation in *SFTPC* (c.218T>C, p.Ile73Thr) and a heterozygous mutation in *TERT* (c.1234C>T, p.His412Tyr). No mutations were detected in *ABCA3* or *SFTPA2* genes. Details of the identified mutations are in supplementary table S1.

Predicted structural impact of the TERT and RTEL1 mutations

TERT

His412, located in the telomere RNA-binding domain (TRBD), is predicted to be in a helix involved in the binding of the TERT template-boundary element (TBE), which acts as a molecular guide to position the template in the active site. His412 does not make direct contact with the TBE, but is located on a positively charged TRBD surface (supplementary figure S3), which suggests that the mutation affects binding to structural elements located in the p3 helix and/or pseudoknot. Position 1108 is located on the C-terminal extension (CTE) thumb domain, in the loop that sharply turns the protein chain before the last 24 residues. Amino-acid Pro1108 is located in a local hydrophobic core; leucine substitution at this position preserves the residue's hydrophobic nature and is not predicted to engender major unfolding. However, because proline residues induce a kink in the main chain of the protein, this mutation could destabilise the structure of the terminal residues that interact with the CTE and RNA-template regions, and perhaps the TRBD near His412.

RTEL1

RTEL1 encodes an essential iron-sulfur (FeS)-containing DNA helicase that is critical for telomere maintenance and DNA repair. All mutations affect the first RTEL1 harmonin-like domain (supplementary figure S4a and c). Amino acids Phe899 and His959 occupy highly conserved positions. Leucine substitution at position 899 is predicted to disturb interaction with a yet uncharacterised partner of the harmonin-like domain, whereas tyrosine at position 959, although not directly involved in the putative binding groove, might also alter harmonin-like domain interactions. The effect of the asparagine at position 942, located in the α -3 α -4 loop, remains undetermined. Furthermore, leucine replacement of phenylalanine at the highly conserved position 964, located in helix α -5, is predicted to disturb domain folding [22].

Burden test

Principal component analysis of WES data genotypes revealed that 81 patients, excluding the 20 outliers among the 101 RA-ILD patients, were clustered with the 1000-genome (1000G) subjects of European ancestry (supplementary figure S5a). Excess mutations in FPF-linked genes were evaluated in these 81 patients and compared to our 1010 controls of European ancestry. The retained patients had an excess number of risk mutations compared to controls: 12.35% (with at least one candidate disease-associated mutation) *versus* 4.46% (burden test, OR 3.17, 95% CI 1.53–6.12; $p=9.45\times 10^{-4}$) (figure 1, table 3; supplementary figure S5a). The association remained significant with more stringent clustering on 1000G individuals of European ancestry: 14.71% of mutations in 68 cases *versus* 4.76% in 903 controls (OR 3.60, 95% CI 1.72–7.04; $p=3.14\times 10^{-4}$) (supplementary figure S5b and supplementary table S5).

Genotype–phenotype-association analyses

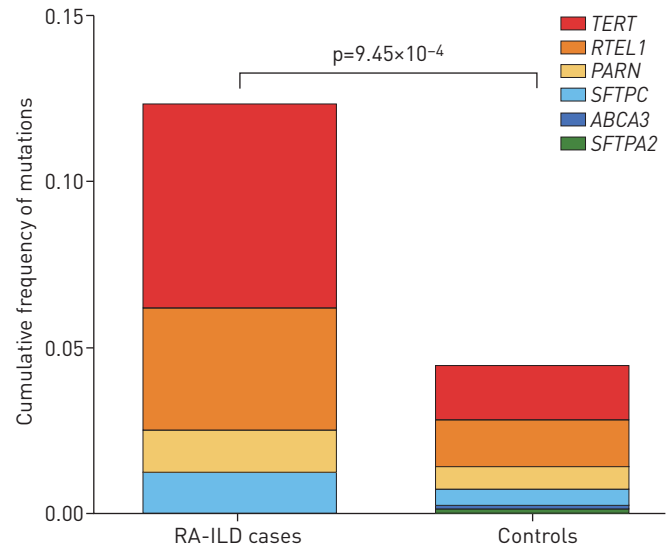
Clinical phenotype

RA-ILD patients carrying a *TERT*, *RTEL1* or *PARN* mutation showed no other clinical manifestation related to a telomere syndrome, such as skin abnormalities, typical haematological abnormalities (*i.e.* macrocytosis, anaemia and thrombocytopenia), bone marrow failure or liver disease. Mean age at ILD onset was significantly lower for patients with mutations than those without mutations: 53.27 ± 10.21 *versus* 62.51 ± 11.63 years, respectively; $p=0.015$ (table 1). Plots based on smoothing splines supported a nonlinear association between age at ILD onset and *TERT/RTEL1/PARN/SFTPC* mutations, with higher mutation probability for patients 36–41 years old than those younger or older ($p=0.040$) (figure 2a). Results remained significant after removal of the patient with a *SFTPC* mutation ($p=0.042$). No other phenotypic differences were detected; notably, pulmonary function and HRCT chest scan pattern at inclusion were similar for both subgroups (table 1).

Telomere lengths in RA-ILD patients with PARN, TERT or RTEL1 mutations

Consistent with previously reported telomere lengths of similar mutation carriers [14, 26, 27], telomere lengths in genomic DNA isolated from the circulating leukocytes of 11 RA-ILD patients with *TERT*, *RTEL1* or *PARN*

FIGURE 1 Excess mutations in familial pulmonary fibrosis (FPF)-linked genes in rheumatoid arthritis-interstitial lung disease (RA-ILD) patients: burden test. Frequencies of *TERT*, *RTEL1*, *PARN* and *SFTPC* gene mutations in 81 RA-ILD patients and 1010 controls in the French Caucasian population.



mutations were shorter than those from 15 controls ($p=0.0114$) (figure 2b; supplementary table S2), as confirmed by logistic regression adjusted for age ($p=2.87 \times 10^{-2}$).

Familial history of ILD and short telomere syndrome in patients with mutations

Among the 12 RA-ILD patients carrying a FPF-linked mutation, three had a family history of interstitial lung disease: case #5 (*RTEL1* p.Phe964Leu) had a brother with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) (deceased); case #6 (*TERT* c.2383-2A>G) had a sister with IPF (deceased); and case #11 (*TERT* p.His412Tyr and *SFTPC* p.Ile73Thr) had a daughter with IPF (deceased). The father of case #8 (*TERT* p.His412Tyr) died of cirrhosis that was compatible with a short telomere syndrome (table 2) [28].

Discussion

To date and to our knowledge, this is the first exome sequencing study of RA-ILD patients. Our findings, from a candidate gene approach, provide evidence of an association between RA-ILD and mutations in FPF-linked genes (*TERT*, *RTEL1*, *PARN* or *SFTPC*). The burden of these mutations was significantly greater in patients than in controls. Moreover, the association was robust after adjustment for more stringent clustering of 1000G subjects of European ancestry. Our results show that RA-ILD and FPF share genetic risk factors, suggesting common pathogenetic mechanisms. The familial aggregation detected in 25% of RA-ILD patients carrying at least one mutation in FPF-linked genes supports this hypothesis.

For telomere-maintenance genes, we detected the *TERT* p.His412Tyr mutation that has been previously linked to FPF and dyskeratosis congenita [23, 25]. Our findings support the theory of *TERT* p.His412Tyr as a low penetrance mutation, with two of the four RA-ILD patients carrying the p.His412Tyr mutation, evidently shortened telomere length (supplementary table S2) and one whose father died of cirrhosis compatible with a

TABLE 3 Burden test for 81 rheumatoid arthritis (RA)-associated interstitial lung disease (ILD) patients and 1010 controls among the French Caucasian population

Gene	Patients			Controls			p-value	Odds ratio (95% CI)
	0	1	2	0	1	2		
<i>ABCA3</i>	81	0	0	1009	1	0		
<i>PARN</i>	80	1	0	1003	7	0		
<i>RTEL1</i>	78	3	0	996	14	0		
<i>SFTPA2</i>	81	0	0	1009	1	0		
<i>SFTPC</i>	80	1	0	1005	5	0		
<i>TERT</i>	75	6	0	993	17	0		
Multigene panel testing	71	9	1 [#]	965	45	0	9.45×10 ⁻⁴	3.17 (1.53–6.12)

0: homozygous for the wild-type allele; 1: heterozygous; 2: homozygous for the rare allele. #: RA-ILD case carrying one *SFTPC* and one *TERT* mutation was considered homozygous for a familial pulmonary fibrosis-linked gene mutation.

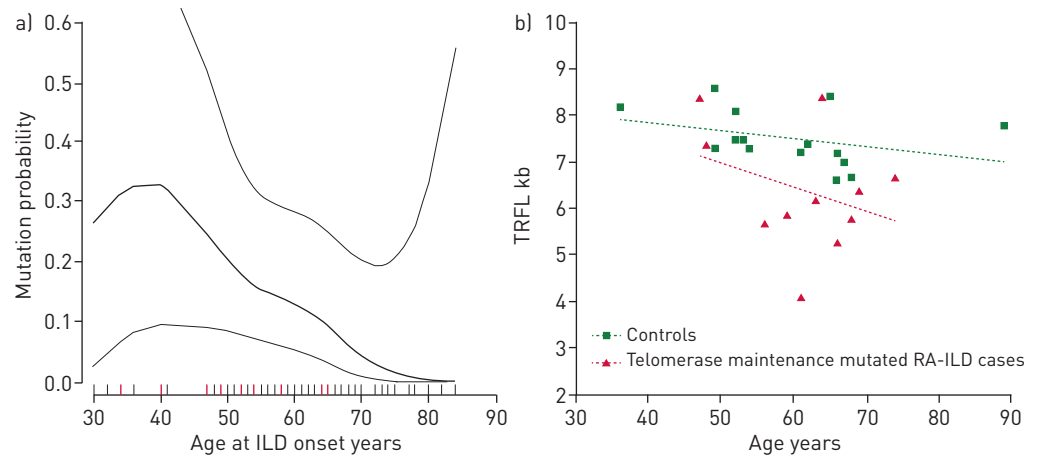


FIGURE 2 Genotype-phenotype association analysis. a) Plots based on smoothing splines of the association between age at interstitial lung disease (ILD) diagnosis and probability of a *TERT*, *RTEL1*, *PARN* or *SFTPC* mutation. Rheumatoid arthritis-associated ILD (RA-ILD) carriers of a mutation in the multigene panel tested are in red. b) Linear regression analyses of telomere lengths in RA-ILD patients (red) with *PARN*, *TERT* or *RTEL1* mutation and controls (green). TRFL denotes the telomeric restriction fragment length.

familial short telomere syndrome [28]. Unfortunately, the affected father was not sequenced for *TERT*, to establish supplementary linkage evidence for *TERT* p.His412Tyr, which represents one limitation of the present study. We also identified p.Pro1108Leu in a highly conserved residue in the functional domain of the protein and a splice mutation that abolishes the acceptor splice site. Among the three new singletons in *RTEL1*, p.Phe899Leu, p.His959Tyr and p.Asp942Asn were predicted to be deleterious by at least two of the three prediction tools used. We previously reported the p.Phe964Leu mutation as a possibly deleterious mutation [22]. Furthermore, the *PARN* mutation leads to a frameshift and premature stop codon. Consistent with previously reported telomere lengths of *TERT*, *RTEL1* or *PARN* mutation carriers [14, 26, 27], we found shorter lengths in the RA-ILD *TERT*, *RTEL1* or *PARN* mutation carriers of the present study than in the controls, which confirms the deleterious effects of these mutations on telomere maintenance. The mechanism linking *PARN* mutations to telomere shortening was recently elucidated: *PARN* is required for TERC 3'-end maturation [29]. Our RA-ILD patient with the *PARN* frameshift mutation had the shortest telomeres, which further supports *PARN* participation in telomere maintenance.

We also investigated genes encoding surfactant-related proteins and detected two *SFTPC* mutations. The p.Ile73Thr mutation, located within the proSP-C (surfactant protein C) linker domain, accounts for more than 30% of all *SFTPC* mutations associated with diffuse parenchymal lung disease in patients with sporadic and inherited (autosomal-dominant) disease [16, 30]. Moreover, p.Met60Ile, a new mutation also located in the non-BRICHOS SP-C domain, was identified. Non-BRICHOS mutations within the proximal COOH propeptide (e.g. p.Ile73Thr) induce aberrant intracellular trafficking of proSP-C, which eludes cleavage and accumulates in the endosomal system, thereby causing cellular dysfunction [31]. Although we could not examine the functional consequences of the SP-C p.Met60Ile mutation, several lines of evidence favour its pathogenicity: 1) p.Met60Ile is located in a highly conserved region; 2) it has one of the three highest Combined Annotation Dependent Depletion scores; and 3) it is not in the ExAC database.

Our findings demonstrate the usefulness of WES combined with restricted candidate gene analysis in identifying RA-ILD-associated mutations, despite complexities, such as locus heterogeneity and late-onset disease. Because of the small number of available patients, our association study had neither sufficient power nor an appropriate design for gene discovery (e.g. no *a priori* hypothesis) [32]. Consequently, WES of larger RA-ILD and control populations, probably with international collaboration, is required to identify new RA-ILD risk genes and to refine the exact contribution of FPF-linked genes to the development of RA-ILD.

In the present genetic case-control association study, we provide evidence for an association between a panel of candidate genes (FPF-linked genes) and the “RA-ILD” phenotype, *i.e.* susceptibility to RA-ILD (RA-ILD *versus* controls). Our results do not provide information about the putative roles of these genes in 1) susceptibility to overall RA (RA *versus* controls) and 2) the risk of ILD in the RA population. These issues suggest that a genetic association study should be performed in RA-ILD cases compared to RA cases without ILD. To date, these issues remain unsolved and therefore support the need for an appropriately designed study facilitated by international collaborations, to test whether FPF-linked genes are also RA modifier genes, thereby increasing the risk of ILD in RA.

From a clinical perspective, the relatively high prevalence of male patients compared to that observed in a recent report of a large multiethnic RA population [33] and the rate of ever smoker patients, are consistent with that previously reported in RA-ILD [19, 34, 35]. Furthermore, consistent with that previously reported for ILD patients with *RTEL1* or *TERT* mutations, ILD occurred earlier in RA-ILD patients with mutations than in those without mutations in telomere-maintenance genes, which might illustrate genetic anticipation, as has been reported in telomere-mediated disorders [36]. Nonetheless, the relatively small sample of RA-ILD patients carrying a mutation limits a genotype–phenotype association analysis, which emphasises the importance of future international collaborative studies on the genetics of RA-ILD.

FPF-risk genes involved in telomere maintenance might be linked to ILD associated with autoimmune diseases, because *PARN* or *RTEL1* mutations have been identified in ILD patients with RA, autoimmune hepatitis, Sjögren's syndrome and more recently systemic sclerosis [22, 26, 37]. This hypothesis is reinforced by diminished telomerase activity and shortened telomere lengths that are apparently connected to premature immunosenescence in various systemic immune-mediated diseases, and more recently by the identification of *TERT* as a risk gene for systemic lupus erythematosus [38, 39]. In addition, we detected two *SFTPC* mutations in RA-ILD patients. To our knowledge, *SFTPC* mutations have only been associated with or linked to interstitial pneumonia, thereby contributing to ILD pathogenesis *via* endoplasmic reticulum stress in alveolar epithelial cells [16]. For the first time, our results provide evidence of an association between *SFTPC* mutations and RA-ILD that might contribute to the hypothesis of a pivotal role of the lung in the pathogenesis of RA [40]. Furthermore, our results were observed in European Caucasian patients and would require replication in other populations.

In conclusion, our findings establish, for the first time, shared genetic risk factors between the RA-ILD phenotype and familial pulmonary fibrosis.

References

- 1 Turesson C, O'Fallon WM, Crowson CS, *et al.* Occurrence of extraarticular disease manifestations is associated with excess mortality in a community based cohort of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2002; 29: 62–67.
- 2 Suzuki A, Ohosone Y, Obana M, *et al.* Cause of death in 81 autopsied patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1994; 21: 33–36.
- 3 Turesson C, Jacobsson L, Bergstrom U. Extra-articular rheumatoid arthritis: prevalence and mortality. *Rheumatology* 1999; 38: 668–674.
- 4 Sihvonen S, Korpela M, Laippala P, *et al.* Death rates and causes of death in patients with rheumatoid arthritis: a population-based study. *Scand J Rheumatol* 2004; 33: 221–227.
- 5 Bongartz T, Nannini C, Medina-Velasquez YF, *et al.* Incidence and mortality of interstitial lung disease in rheumatoid arthritis: a population-based study. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 1583–1591.
- 6 Olson AL, Swigris JJ, Sprunger DB, *et al.* Rheumatoid arthritis-interstitial lung disease-associated mortality. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183: 372–378.
- 7 Doyle TJ, Lee JS, Dellaripa PF, *et al.* A roadmap to promote clinical and translational research in rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease. *Chest* 2014; 145: 454–463.
- 8 Kim EJ, Collard HR, King TE Jr. Rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease: the relevance of histopathologic and radiographic pattern. *Chest* 2009; 136: 1397–1405.
- 9 Kim EJ, Elicker BM, Maldonado F, *et al.* Usual interstitial pneumonia in rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease. *Eur Respir J* 2010; 35: 1322–1328.
- 10 Armanios MY, Chen JJ, Cogan JD, *et al.* Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2007; 356: 1317–1326.
- 11 Tsakiri KD, Cronkhite JT, Kuan PJ, *et al.* Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 7552–7557.
- 12 Kropski JA, Mitchell DB, Markin C, *et al.* A novel dyskerin (DKC1) mutation is associated with familial interstitial pneumonia. *Chest* 2014; 146: e1–e7.
- 13 Alder JK, Stanley SE, Wagner CL, *et al.* Exome sequencing identifies mutant *TINF2* in a family with pulmonary fibrosis. *Chest* 2015; 147: 1361–1368.
- 14 Cogan JD, Kropski JA, Zhao M, *et al.* Rare Variants in *RTEL1* are associated with familial interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2015; 191: 646–655.
- 15 Stuart BD, Choi J, Zaidi S, *et al.* Exome sequencing links mutations in *PARN* and *RTEL1* with familial pulmonary fibrosis and telomere shortening. *Nat Genet* 2015; 47: 512–517.
- 16 van Moorsel CH, van Oosterhout MF, Barlo NP, *et al.* Surfactant protein C mutations are the basis of a significant portion of adult familial pulmonary fibrosis in a Dutch cohort. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182: 1419–1425.
- 17 Flamein F, Riffault L, Muselet-Charlier C, *et al.* Molecular and cellular characteristics of ABCA3 mutations associated with diffuse parenchymal lung diseases in children. *Hum Mol Genet* 2012; 21: 765–775.
- 18 Wang Y, Kuan PJ, Xing C, *et al.* Genetic defects in surfactant protein A2 are associated with pulmonary fibrosis and lung cancer. *Am J Hum Genet* 2009; 84: 52–59.
- 19 Kelly CA, Saravanan V, Nisar M, *et al.* Rheumatoid arthritis-related interstitial lung disease: associations, prognostic factors and physiological and radiological characteristics – a large multicentre UK study. *Rheumatology* 2014; 53: 1676–1682.
- 20 Assayag D, Lubin M, Lee JS, *et al.* Predictors of mortality in rheumatoid arthritis-related interstitial lung disease. *Respirology* 2014; 19: 493–500.
- 21 Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, *et al.* 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 1580–1588.

- 22 Kannengiesser C, Borie R, Menard C, *et al.* Heterozygous RTEL1 mutations are associated with familial pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2015; 46: 474–485.
- 23 Alder JK, Chen JJ, Lancaster L, *et al.* Short telomeres are a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 13051–13056.
- 24 Marchand-Adam S, Diot B, Magro P, *et al.* Pulmonary alveolar proteinosis revealing a telomerase disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 188: 402–404.
- 25 Du HY, Pumbo E, Manley P, *et al.* Complex inheritance pattern of dyskeratosis congenita in two families with 2 different mutations in the telomerase reverse transcriptase gene. *Blood* 2008; 111: 1128–1130.
- 26 Stuart BD, Choi J, Zaidi S, *et al.* Exome sequencing links mutations in PARN and RTEL1 with familial pulmonary fibrosis and telomere shortening. *Nat Genet* 2015; 47: 512–517.
- 27 Diaz de Leon A, Cronkhite JT, Katzenstein AL, *et al.* Telomere lengths, pulmonary fibrosis and telomerase (TERT) mutations. *PLoS One* 2010; 5: e10680.
- 28 Armanios M, Blackburn EH. The telomere syndromes. *Nat Rev Genet* 2012; 13: 693–704.
- 29 Moon DH, Segal M, Boyraz B, *et al.* Poly(A)-specific ribonuclease (PARN) mediates 3'-end maturation of the telomerase RNA component. *Nat Genet* 2015; 47: 1482–1488.
- 30 Brasch F, Griese M, Tredano M, *et al.* Interstitial lung disease in a baby with a de novo mutation in the SFTPC gene. *Eur Respir J* 2004; 24: 30–39.
- 31 Hawkins A, Guttentag SH, Deterding R, *et al.* A non-BRICHOS SFTPC mutant (SP-CI73T) linked to interstitial lung disease promotes a late block in macroautophagy disrupting cellular proteostasis and mitophagy. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2015; 308: L33–L47.
- 32 Lee S, Emond MJ, Bamshad MJ, *et al.* Optimal unified approach for rare-variant association testing with application to small-sample case-control whole-exome sequencing studies. *Am J Hum Genet* 2012; 91: 224–237.
- 33 Gazal S, Sacre K, Allanore Y, *et al.* Identification of secreted phosphoprotein 1 gene as a new rheumatoid arthritis susceptibility gene. *Ann Rheum Dis* 2015; 74: e19.
- 34 Gochuico BR, Avila NA, Chow CK, *et al.* Progressive preclinical interstitial lung disease in rheumatoid arthritis. *Arch Intern Med* 2008; 168: 159–166.
- 35 Assayag D, Elicker BM, Urbania TH, *et al.* Rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease: radiologic identification of usual interstitial pneumonia pattern. *Radiology* 2014; 270: 583–588.
- 36 Armanios M. Telomerase and idiopathic pulmonary fibrosis. *Mutat Res* 2012; 730: 52–58.
- 37 Mak AC, Tang PL, Cleveland C, *et al.* Brief Report: Whole-Exome Sequencing for Identification of Potential Causal Variants for Diffuse Cutaneous Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol* 2016; 68: 2257–2262.
- 38 Georjin-Lavialle S, Aouba A, Mouthon L, *et al.* The telomere/telomerase system in autoimmune and systemic immune-mediated diseases. *Autoimmun Rev* 2010; 9: 646–651.
- 39 Sun C, Molineres JE, Looger LL, *et al.* High-density genotyping of immune-related loci identifies new SLE risk variants in individuals with Asian ancestry. *Nat Genet* 2016; 48: 323–330.
- 40 Catrina AI, Ytterberg AJ, Reynisdottir G, *et al.* Lungs, joints and immunity against citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2014; 10: 645–653.

SUPPLEMENTARY APPENDIX

THE FOLLOWING INVESTIGATORS PARTICIPATED IN THE FREX CONSORTIUM

PRINCIPAL INVESTIGATORS:

Emmanuelle Génin (chair), Inserm UMR1078, CHRU, Univ Brest, Brest, France
Dominique Champion, Inserm UMR1079, Faculté de Médecine, Rouen, France
Jean-François Dartigues, Inserm UMR1219, Univ Bordeaux, France
Jean-François Deleuze, Centre National de Génotypage, CEA, Fondation Jean Dausset-CEPH, Evry, France
Jean-Charles Lambert, Inserm UMR1167, Institut Pasteur, Lille, France
Richard Redon, Inserm UMR 1087 / CNRS UMR 6291, l'institut du thorax, Nantes, France

COLLABORATORS:

Bioinformatics group:

Thomas Ludwig (chair), Inserm UMR1078, CHRU, Univ Brest, Brest
Benjamin Grenier-Boley, Inserm UMR1167, Institut Pasteur, Lille
Sébastien Letort, Inserm UMR1078, CHRU, Univ Brest, Brest
Pierre Lindenbaum, Inserm UMR 1087 / CNRS UMR 6291, l'institut du thorax, Nantes
Vincent Meyer, Centre National de Génotypage, CEA, Evry
Olivier Quenez, Inserm UMR1079, Faculté de Médecine, Rouen

Statistical genetics group:

Christian Dina (chair), Inserm UMR 1087/CNRS UMR 6291, l'institut du thorax, Nantes
Céline Bellenguez, Inserm UMR1167, Institut Pasteur, Lille
Camille Charbonnier-Le Clézio, Inserm UMR1079, Faculté de Médecine, Rouen
Joanna Giemza, Inserm UMR 1087 / CNRS UMR 6291, l'institut du thorax, Nantes

Data collection:

Stéphanie Chatel, Inserm UMR 1087 / CNRS UMR 6291, l'institut du thorax, Nantes
Claude Férec, Inserm UMR1078, CHRU, Univ Brest
Hervé Le Marec, Inserm UMR 1087 / CNRS UMR 6291, l'institut du thorax, Nantes
Luc Letenneur, Inserm UMR1219, Univ Bordeaux
Gaël Nicolas, Inserm UMR1079, Faculté de Médecine, Rouen, France
Karen Rouault, Inserm UMR1078, CHRU, Univ Brest

Sequencing:

Delphine Bacq, Centre National de Génotypage, CEA, Evry
Anne Boland, Centre National de Génotypage, CEA, Evry
Doris Lechner, Centre National de Génotypage, CEA, Evry

METHODS

Control population

In-house subjects (n=1010) without known autoimmune/inflammatory and/or pulmonary diseases served as healthy controls. Around 57% are controls from the French Exome project (573 individuals sampled in 6 French regions) and the other 437 are patients from French hospitals, all with Caucasian ancestry checked with a principal component analysis. This control panel is, to our knowledge, the largest whole exome sequencing dataset of French Caucasian controls, giving a 1:10 case control ratio.

Power calculation

Assuming that several regions (FPF-linked genes) had a large fraction of causal rare variants and the all of them increase disease risk, we performed simulations to assess the number of controls required. Based on our number of 101 cases and assuming the 3 following magnitudes of the association; OR = 3.0, 3.5 and 4.0, a sample of 1010 controls provides a power detection of 73%, 88% and 94%, respectively.

WES Data Analysis

WES of all patients' DNA was performed by Otogenetics (Norcross, GA, USA). Agilent SureSelect Human All Exon Kits V5 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) were used with PE Illumina HiSeq2000 sequencing (Illumina, San Diego, CA, USA) with an estimated 50-fold average coverage. Quality statistics for sequences reported are in Table S3 and coverage of FPF-risk genes in Table S4. Bioinformatics analyses to detect mutations followed the Genome Analysis Toolkit (GATK) best practices [1, 2]. Briefly, sequences were aligned to the

reference human genome hg19 by using the Burrows–Wheeler Aligner [3], duplicates were sorted with Picard tools (<http://picard.sourceforge.net>) and variants were called with the GATK Unified Genotyper. Mutations were annotated, filtered and analyzed with Variant tools [4]. Function annotations were obtained from ANNOVAR [5], allele frequencies from the Exome Aggregation Consortium (ExAC) database v0.2 (<http://exac.broadinstitute.org/>) and functional predictions from database dbNSFP v2.9 [6, 7]. All mutations with low depth of coverage ($DP < 10$) or poor genotype quality ($GQ < 20$) were excluded from further analyses. Each detected mutation's frequency was compared to that reported in the overall Exome Aggregation Consortium (ExAC) database (<http://exac.broadinstitute.org>). To create a list of damaging mutations (Fig. S1) first, known FPF-risk variants with concordant modes of inheritance to that previously reported were systematically selected. Secondly, mutations were retained and defined as those with minor allele frequency (MAF) < 0.01 in each ExAC subset of populations. We selected exonic and splicing variants, removing synonymous ones (except for telomerase RNA component [*TERC*], a noncoding RNA. All selected mutations located in the coding region (i.e., exonic) were annotated by using the Genomic Evolutionary Rate Profiling (GERP) score [8] and the prediction tools Polyphen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT; sift.jcvi.org) and Mutation Taster (mutationtaster.org). Thirdly, newly identified mutations were prioritized as follows: *i*) exonic mutations predicted to be “probably damaging” in Polyphen-2 and/or “deleterious” in SIFT and/or “disease causing automatic” in Mutation Taster were selected, *ii*) mutations with a Genomic Evolutionary Rate Profiling (GERP) score ≥ 2 , which provides high sensitivity while still strongly enriching for truly constrained sites, were selected [8], and *iii*) mutations with a Combined Annotation-Dependent Depletion (CADD) score v1.2 [9] < 10 were removed (this threshold, chosen because it previously

allowed for identification of a significant association of *RNF213* mutations in moyamoya disease [10], allows for removal of mutations at a position not conserved in other species or with an amino-acid change that minimally impacts the protein) (See Table S1). All analyses were performed during May to June 2015.

TERT and RTEL1 molecular modeling and 3D-structure visualization

TERT: Protein modeling and representation involved use of Modeller [11] and Chimera [12]; electrostatic potential was generated with APBS software [13]. The reverse transcriptase (RT) and C-terminal extension (CTE) domains were modeled from the structure of the *Tribolium castaneum* telomerase catalytic subunit bound to the RNA template and telomeric DNA [14]. This template was extended to form a longer RNA/DNA duplex based on the human immunodeficiency virus (HIV) RT structure. The telomere RNA-binding domain (TRBD) was modeled from that of *Oryzias latipes* complexed with the CR7 TER RNA domain [15] and the *Tetrahymena*-TRBD domain complexed with the boundary-definition element [16]. The N-terminal “anchor” domain (TEN) domain was docked on the other domains according to Steczkiewicz et al. [17] See Figure S3.

RTEL1: The 3D-structure model for the first harmonin-N-like domain was from Faure et al. [18] See Figure S4.

Telomere length measurement for patients with a mutation in telomerase complex candidate genes and controls

Genomic DNA (800 ng) extracted from peripheral blood leukocytes was digested with *HinfI* and *RsaI* restriction enzymes, resolved by 0.7% agarose-gel electrophoresis, and transferred to a nylon membrane. Hybridization involved use of EasyHyb solution (Roche Diagnostics,

Meylan, France) with the γ -³²P-labeled (TTAGGG) 4 probe. After washes, membranes were exposed on a PhosphorImager. Telomere-probed Southern blots were analyzed with ImageJ. The digitalized signal data were then transferred to Microsoft Excel to calculate the mean telomeric restriction fragment length (TRFL), as follows: $TRFL = (OD_i)/(OD_i/L_i)$, where OD_i = integrated signal intensity at position i and L_i = length of DNA fragment in position i .

Statistical analysis

Ancestry-Inference Analysis: Ancestry of all RA-ILD cases and controls was established by principal component analysis (PCA) based on the individuals of the third and final 1000 Genomes Project [19, 20] (1000G) release, methods and corresponding analyses are detailed in the Supplementary Appendix. African (AFR), European (EUR), East Asian (EAS) and South Asian (SAS) individuals were selected to construct PCA axes. African Caribbean individuals in Barbados (ACB) and those of African ancestry in the Southwest United States (ASW) were removed because of their European admixture. For markers present in all patients and control datasets, we selected those frequent in every 1000G region ($MAF > 5\%$ in AFR, EUR, EAS and SAS populations). After hard pruning of 1000G data (PLINK [21] --indep-pairwise 50 5 0.20 option), we selected a subset of 13 168 markers common to all patients and controls. PCA involved use of the second-generation PLINK v1.90b2n [22] and each 1000G region's barycenter was computed for the first two principal components. Each studied individual was considered European Caucasian if EUR was the closest barycenter. See Figure S5. Then, we used the PLINK --genome option on the same subset of 13 168 markers to ensure that none of the individuals inferred as European Caucasian were closely related.

Burden Test: A logistic-regression framework was used to model the phenotype as a function

of the number of candidate disease-associated mutations per individual [23]. An exome-wide significance level of $P < 2.5 \times 10^{-6}$ is frequently used for WES studies (calculated on the basis of Bonferroni correction for approximately 20 000 genes). However, WES is a purely discovery-driven approach, free of the limitations imposed by an a priori hypothesis about which genes and/or pathways are likely involved in the phenotype being considered. Our WES contained an a priori hypothesis testing <10 FPF-linked genes, so a more liberal significance level, $P < 0.005$, was applied [24]; corresponding figures were created by using Graphpad Prism 6.0b software.

REFERENCES

1. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M, DePristo MA. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome research* 2010: 20(9): 1297-1303.
2. van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, Poplin R, Del Angel G, Levy-Moonshine A, Jordan T, Shakir K, Roazen D, Thibault J, Banks E, Garimella KV, Altshuler D, Gabriel S, DePristo MA. From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. *Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D Baxeavanis [et al]* 2013: 11(1110): 11 10 11-11 10 33.
3. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 2009: 25(14): 1754-1760.
4. San Lucas FA, Wang G, Scheet P, Peng B. Integrated annotation and analysis of genetic variants from next-generation sequencing studies with variant tools. *Bioinformatics* 2012: 28(3): 421-422.
5. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic acids research* 2010: 38(16): e164.
6. Liu X, Jian X, Boerwinkle E. dbNSFP: a lightweight database of human nonsynonymous SNPs and their functional predictions. *Human mutation* 2011: 32(8): 894-899.
7. Liu X, Jian X, Boerwinkle E. dbNSFP v2.0: a database of human non-synonymous SNVs and their functional predictions and annotations. *Human mutation* 2013: 34(9): E2393-2402.
8. Cooper GM, Stone EA, Asimenos G, Program NCS, Green ED, Batzoglou S, Sidow A. Distribution and intensity of constraint in mammalian genomic sequence. *Genome research* 2005: 15(7): 901-913.
9. Kircher M, Witten DM, Jain P, O'Roak BJ, Cooper GM, Shendure J. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nature genetics* 2014: 46(3): 310-315.
10. Moteki Y, Onda H, Kasuya H, Yoneyama T, Okada Y, Hirota K, Mukawa M, Nariai T, Mitani S, Akagawa H. Systematic Validation of RNF213 Coding Variants in Japanese Patients With Moyamoya Disease. *Journal of the American Heart Association* 2015: 4(5): e001862.
11. Eswar N, Eramian D, Webb B, Shen MY, Sali A. Protein structure modeling with MODELLER. *Methods in molecular biology* 2008: 426: 145-159.
12. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry* 2004: 25(13): 1605-1612.
13. Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ, McCammon JA. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001: 98(18): 10037-10041.
14. Mitchell M, Gillis A, Futahashi M, Fujiwara H, Skordalakes E. Structural basis for telomerase catalytic subunit TERT binding to RNA template and telomeric DNA. *Nature structural & molecular biology* 2010: 17(4): 513-518.
15. Huang J, Brown AF, Wu J, Xue J, Bley CJ, Rand DP, Wu L, Zhang R, Chen JJ, Lei M. Structural basis for protein-RNA recognition in telomerase. *Nature structural & molecular biology* 2014: 21(6): 507-512.

16. Jansson LI, Akiyama BM, Ooms A, Lu C, Rubin SM, Stone MD. Structural basis of template-boundary definition in Tetrahymena telomerase. *Nature structural & molecular biology* 2015; 22(11): 883-888.
17. Steczkiewicz K, Zimmermann MT, Kurcinski M, Lewis BA, Dobbs D, Kloczkowski A, Jernigan RL, Kolinski A, Ginalski K. Human telomerase model shows the role of the TEN domain in advancing the double helix for the next polymerization step. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011; 108(23): 9443-9448.
18. Faure G, Revy P, Schertzer M, Londono-Vallejo A, Callebaut I. The C-terminal extension of human RTEL1, mutated in Hoyeraal-Hreidarsson syndrome, contains harmonin-N-like domains. *Proteins* 2014; 82(6): 897-903.
19. Genomes Project C, Abecasis GR, Altshuler D, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Gibbs RA, Hurles ME, McVean GA. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 2010; 467(7319): 1061-1073.
20. Genomes Project C, Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, Handsaker RE, Kang HM, Marth GT, McVean GA. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 2012; 491(7422): 56-65.
21. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PI, Daly MJ, Sham PC. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American journal of human genetics* 2007; 81(3): 559-575.
22. Chang CC, Chow CC, Tellier LC, Vattikuti S, Purcell SM, Lee JJ. Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *GigaScience* 2015; 4: 7.
23. Morris AP, Zeggini E. An evaluation of statistical approaches to rare variant analysis in genetic association studies. *Genetic epidemiology* 2010; 34(2): 188-193.
24. Easton DF, Pharoah PD, Antoniou AC, Tischkowitz M, Tavtigian SV, Nathanson KL, Devilee P, Meindl A, Couch FJ, Southey M, Goldgar DE, Evans DG, Chenevix-Trench G, Rahman N, Robson M, Domchek SM, Foulkes WD. Gene-panel sequencing and the prediction of breast-cancer risk. *The New England journal of medicine* 2015; 372(23): 2243-2257.

SUPPLEMENTARY TABLES

Table S1. Details of the mutations Found in 12 rheumatoid arthritis–interstitial lung disease (RA–ILD) patients.

Pt no.	Locus	c-DNA	Amino-Acid	RefSeq	Chromosome	Hg19	ExAC MAF	GERP	Prediction			CADD
		Change	Change			Position			Score	Polyphen-2	SIFT	Mutation-Taster
1	<i>PARN</i>	c.1749_1750delAG	p.Ser585fs*5	NM_02582	16	14540859	NR	5.51	–	–	–	28.6
2	<i>RTEL1</i>	c.2695T>C	p.Phe899Leu	NM_0128009	20	62324200	NR	4.59	D	D	D	16.34
3		c.2824G>A	p.Asp942Asn			62324329	0.000206179	4.83	D	T	D	22.3
4		c.2875C>T	p.His959Tyr			62324519	NR	4.82	D	D	D	15.28
5		c.2890T>C	p.Phe964Leu			62324534	NR	4.82	D	D	D	14.85
6	<i>TERT</i>	c.2383-2A>G	–	NM_000198253	5	1271321	NR	4.35	–	–	D	23.6
7		c.3323C>T	p.Pro1108Leu			1253919	0.000030495	2.96	P	D	D	16.12
8		c.1234C>T	p.His412Tyr			1293767	0.006277622	2.32	D	D	N	10.1
9												
10												
11	<i>SFTPC</i>	c.218T>C	p.Ile73Thr	NM_003018	8	22020609	0.000008181	4.68	P	D	A	17.67
12		c.180G>A	p.Met60Ile			22020224	NR	4.56	B	T	D	22.3

ExAC denotes Exome Aggregation Consortium database, GERP Genomic Evolutionary Rate Profiling; MAF minor allele frequency, Polyphen-2 prediction: D probably damaging, P possibly damaging, B benign; SIFT Sorting Intolerant From Tolerant prediction: D deleterious, T tolerated; Mutation taster: A, disease_causing_automatic, D disease_causing, N polymorphism, P polymorphism_automatic. Combined Annotation-Dependent Depletion (CADD) score v1.2 (<http://cadd.gs.washington.edu>); – could not be determined; NR not reported.

Table S2. Telomere lengths for the 11 RA-ILD patients carrying *PARN*, *TERT* or *RTEL1* mutation and 15 controls

Sample	Age (yr)	c-DNA change	Locus	Amino-Acid Change	TRFL (kb)
Patients					
1	61	c.1749_1750delAG	<i>PARN</i>	p.Ser585fs*5	4.1
2	66	c.2695T>C	<i>RTEL1</i>	p.Phe899Leu	5.3
3	66	c.2824G>A	<i>RTEL1</i>	p.Asp942Asn	5.3
4	64	c.2875C>T	<i>RTEL1</i>	p.His959Tyr	8.4
5	59	c.2890T>C	<i>RTEL1</i>	p.Phe964Leu	5.9
6	56	c.2383-2A>G	<i>TERT</i>	–	5.7
7	63	c.3323C>T	<i>TERT</i>	p.Pro1108Leu	6.2
8	69	c.1234C>T	<i>TERT</i>	p.His412Tyr	6.4
9	68	c.1234C>T	<i>TERT</i>	p.His412Tyr	5.8
10	47	c.1234C>T	<i>TERT</i>	p.His412Tyr	7.4
11	48	c.1234C>T	<i>TERT</i>	p.His412Tyr	8.4
Controls					
1	36				8.2
2	49				7.3
3	49				8.6
4	52				7.5
5	52				8.1
6	53				7.5
7	54				7.3
8	61				7.2
9	62				7.4
10	65				8.4
11	66				7.2
12	66				6.6
13	67				7.0
14	68				6.7
15	89				7.8

TRFL denotes telomeric restriction fragment length, – could not be determined.

Table S3. Exome-sequencing quality for patients

Sequence length (bp)	106 or 126
No. of reads per sample (M)	45.4±10.0
Percentage of targeted regions covered	99.6±0.1
Mean depth at targeted regions (nt)	68.1±10.6

Values are mean (±SD). nt indicates nucleotides.

Table S4. Mean coverage of familial pulmonary fibrosis (FPF)-risk genes

FPF-Risk Genes	Percentage of Targeted Regions Covered	Mean Depth at Targeted Regions, nt
<i>ABCA3</i>	100±0	62.6±11.6
<i>DKC1</i>	100±0	63.5±20.9
<i>PARN</i>	100±0	68.3±13.2
<i>RTEL1</i>	99.8±0.3	58.7±11.4
<i>SFTPA2</i>	100±0	57.2±11.2
<i>SFTPC</i>	100±0	57.2±9.9
<i>TERC</i>	100±0	47.2±10.1
<i>TERT</i>	98.8±1.1	66.7±12.4
<i>TINF2</i>	100±0	86.9±15.0
Total mean	99.8±0.2	64.1±10.7

Values are mean (±SD). nt indicates nucleotides.

Table S5. Burden test for 68 RA-ILD patients and 903 controls in the French Caucasian population, with stringent clustering on European ancestry

Gene	Patients			Controls			P-Value	Odds Ratio [95% CI]
	0	1	2	0	1	2		
Multigene panel testing	58	9	1*	860	43	0	3.14×10 ⁻⁴	3.60 [1.72–7.04]

0: denotes homozygous for the wild-type allele, 1 heterozygous, 2 homozygous for the rare allele.

*RA-ILD case carrying 1 *SFTPC* and 1 *TERT* mutation was considered homozygous for a familial pulmonary fibrosis-linked gene mutation.

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Figure S1. Filtering strategy to identify rheumatoid arthritis–interstitial lung disease (RA–ILD)-associated mutations.

Figure S2. *TERT*-, *RTEL1*-, *PARN*- and *SFTPC*-detected mutations confirmed by Sanger sequencing.

Figure S3. Molecular modeling of *TERT* mutations.

Panel A. Model of full-length human telomerase reverse transcriptase (hTERT) complexed with the CR4/5 domain, template boundary element (TBE) RNA and RNA template/DNA telomeric repeat duplex. The N-terminal “anchor” domain (TEN) domain is red, telomere RNA-binding domain (TRBD) orange, catalytic reverse-transcriptase domain (RT) violet and C-terminal extension (CTE) pink. The surface covered by electrostatic potential around His412 is shown as an inset. **Panel B.** Secondary TERT structure with location of modeled RNA segments within the pseudoknot and Box/H/ACA domains.

Figure S4. Molecular modeling of *RTEL1* mutations.

Panel A. Schematic representation of the RTEL1 protein, indicating domain architecture and mutation positions. PIP-box denotes PCNA-interacting protein box, HD helicase domain.

Panel B. Positions of the mutated amino acids in multiple alignments of harmonin-like family sequences. The alignment, from Faure et al.[18] includes the sequences (with their UniProt entry name) of the RTEL1-protein harmonin-like domains from different species and those of human malcavernin (cerebral cavernous malformation-2 protein [CCM2]) and malcavernin-like (CCM2L), harmonin (USH1C), whirlin (WHRN) and delphilin (GRD2I). Positions with

conserved hydrophobicity are depicted as grey squares, green for the general case and orange for the mostly aromatic character. The positions of the 3 mutated amino acids are indicated with stars above the alignment, and amino acids involved in cadherin-23 binding in harmonin (pdb 3K1R) are highlighted with yellow triangles. The secondary structure positions, as observed in the experimental 3D-structure of human harmonin (USH1C, pdb 3K1R), are reported above the alignment. **Panel C:** 3D-structural model of the first harmonin-like domain of human RTEL1 indicating the positions of the mutated amino acids. The position of cadherin-23 peptide, in grey, the harmonin–cadherin complex (USH1C, pdb 3K1R), is the hydrophobic groove, which may be used by these domains to interact with partners.

Figure S5. Principal component analysis (PCA) of patients and controls.

Panel A. PCA of genotypes from exome data for 101 RA–ILD patients demonstrated clustering with 1000G subjects of European (n=81) and non-European (n=20) ancestry. AFR denotes African, EUR European, SAS South Asia, EAS East Asian. **Panel B.** Projection of patients and controls on 1000G data with stringent clustering on EUR region. The EUR-region barycenter was computed with non-Finnish EUR individuals. Each studied individual was considered European Caucasian if the distance to the EUR barycenter was shorter than that for the non-Finnish EUR furthest from the EUR barycenter.