



HAL
open science

Etude de la corticosteroid-binding globulin hépatique et pulmonaire dans le contexte de la mucoviscidose

Anastasia Tchoukaev

► **To cite this version:**

Anastasia Tchoukaev. Etude de la corticosteroid-binding globulin hépatique et pulmonaire dans le contexte de la mucoviscidose. Physiologie [q-bio.TO]. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS164 . tel-02462817

HAL Id: tel-02462817

<https://theses.hal.science/tel-02462817>

Submitted on 31 Jan 2020

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 de doctorat
Sorbonne Université

Spécialité physiologie, physiopathologie et thérapeutique

Présentée par
Anastasia Tchoukaev

**ÉTUDE DE LA CORTICOSTEROID-BINDING GLOBULIN
HEPATIQUE ET PULMONAIRE
DANS LE CONTEXTE DE LA MUCOVISCIDOSE**

Soutenue le 17 septembre 2018

Devant un jury composé de :

P^r Jean-François Bernaudin
D^r Ignacio Garcia-Verdugo
D^r Jean-Benoît Corcuff
D^{re} Véronique Witko-Sarsat
P^r Philippe Le Rouzic

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Directeur de thèse

« *Amor fati* »

Friedrich Nietzsche, *Ecce Homo*

REMERCIEMENTS

Je remercie le P^r Jean-François Bernaudin, qui me fait l'honneur de présider mon jury. Je remercie aussi mes rapporteurs, le D^r Ignacio Garcia-Verdugo et le D^r Jean-Benoît Corcuff, pour le temps qu'ils ont accordé à l'évaluation de mon travail. Je remercie également la D^{re} Véronique Witko-Sarsat d'avoir accepté d'être examinatrice, après qu'elle a déjà participé à mon comité de mi-thèse. J'espère que, tous, vous trouverez les discussions intéressantes.

Mes remerciements suivants vont au P^r Philippe Le Rouzic, mon directeur de thèse. Merci pour tout ce que tu m'as appris. En trois ans et demi, j'ai grandi et j'emporte avec moi des leçons de vie.

Merci à l'assistante ingénieure Nathalie Rousselet pour le temps et le savoir-faire qu'elle a mis au profit du projet. Merci d'avoir toujours fait preuve de gentillesse et de compréhension à mon égard.

Je remercie tout particulièrement nos collaboratrices : merci à la D^{re} Sabine Blouquit-Laye pour ses conseils et pour nous avoir fourni des biopsies pulmonaires qu'elle est la seule à savoir disséquer avec autant de finesse ; merci à la P^{re} Dominique Debray pour son implication dans le projet qu'elle suit depuis le début et lors de toutes les réunions que nous avons eues ensemble ; merci à la D^{re} Marie-Pierre Moisan pour nous avoir guidés dans le monde de la CBG et pour m'avoir permis de venir apprendre dans son laboratoire la technique de mesure de CBG plasmatique. Par la même occasion, je remercie l'ingénieure Aline Foury, qui m'a formée directement à cette technique.

Merci à la P^{re} Harriet Corvol, directrice de l'équipe, de m'avoir permis de travailler sur ce sujet.

Merci, Olivier, pour ta bienveillance constante, ton aide précieuse et tes conseils avisés. Merci d'avoir accepté que j'écrive ma thèse dans ton bureau. Dorénavant, je prendrai toujours mon goûter à 16 h pile (mais sans café, merci).

Merci, Loïc, pour ta bonne humeur et ta légèreté rafraîchissantes.

Merci, Lea, d'avoir été là, du début jusqu'à la fin, pendant ces trois années. Merci pour toutes les grimaces bizarres que tu m'as faites à travers la vitre de la pièce de culture ou dans le couloir. Merci pour tous ces posts stupides de Facebook que tu gardais pour me faire sourire. On t'aime méchante, mais pas trop quand même.

Merci, Pauline, pour l'aide que tu m'as apportée à Doc'Up. Merci, Tobias, pour ta gentillesse disproportionnée dont, je crois, je n'ai pas trop abusé. Merci tout particulièrement à mes stagiaires de M1 : Xavier, merci pour ta folie qui a su me ranimer, je t'entends encore me dire « Ho hé ! Ho hé ! », et je te réponds « Ho hé ! Ho hé ! », et tu me réponds « Ho hé ! Ho hé ! »... ; Estelle, merci pour toutes nos discussions et nos rigolades, je t'entends encore pester contre Powerpoint et Excel (« Olalalala ! »). Je remercie également toutes les personnes que j'ai croisées dans le laboratoire et qui ont rendu mes journées un peu plus agréables : Kristin, Tania, Sarah, Laura, Hortense, Guillaume, Nicolas, Léa, Jeanne, Julia et Sophie.

Un énorme merci aux BG sans qui je n'aurais jamais survécu. Florence, tu as parfaitement bien joué le rôle de la grande sœur, même si on sait que tu as été payée pour... Merci de m'avoir écoutée, des heures durant, et de m'avoir toujours soutenue et encouragée. Merci de m'avoir fait rêver en dansant le kuduro comme personne auparavant. Merci de m'avoir suivie à la pole, au moins je ne suis pas seule à marcher pleine de bleus comme un cowboy. Sarah, merci pour la force dont tu fais preuve. Tu ne sais pas à quel point tu m'as inspirée et poussée à avancer pendant ces trois ans. Merci de m'avoir également suivie à la salsa, de savoir dire « ouais ! » comme personne et de m'avoir accompagnée dans cette dernière année. Malorie, sœur de mon âme, merci de m'avoir toujours comprise et d'avoir passé des heures à m'écouter. Merci de m'avoir constamment inspirée la compassion et la douceur. J'espère qu'on pourra encore perdre nos orteils gelés en se parlant dehors jusqu'à 4 h du matin avec nos chaussettes trouées. Vraiment, un énorme merci à vous toutes pour votre force et votre amour constant.

Merci, A'dem, de m'avoir écoutée souvent bien longtemps et de m'avoir conseillée tant de fois. Ta gentillesse et ta façon de me relancer avec tes « ah ouais ? » me fascineront toujours. Merci, Yuan, pour ta simplicité, pour avoir accepté de faire partie des X-Humans et pour tes leçons de chinois, qu'on a toutes très mal retenues. Je te souhaite une très belle soutenance. Merci, Yannick, de nous avoir supportées dans le bureau au 2^e étage et pour tous nos échanges suivants. Merci, Thomas, pour ton amabilité et pour m'avoir appris à utiliser ce satané cryostat.

Vous tous, Lyvianne, Sandy, Eva, Astrid, Delphine, Romane, Cindy, Marion, Nawel, Grégoire, Kristell, Olivier, Clémence, Paul-Patrice et Stéphane, qui avez croisé mon chemin dans le centre, vous avez à un moment ou à un autre contribué à mon bien-être, merci.

Merci, Maurice, pour les bons moments passés ensemble.

Merci à toutes ces personnes que j'ai rencontrées à Doc'Up : Caroline, Delphine, Giorgia, Elise, Héloïse, Karol, Mélanie, Benjamin, Pierre-Emmanuel et Vincent. Merci de m'avoir permis de

décompresser avec vous, et toujours dans la bonne humeur. Un merci tout particulier à la meilleure team pâté complétée par Alexis, Franck, Flavien, Morgane, Fériel et Zuzana. Merci d'avoir supporté tous ces messages sur WhatsApp, nos liens du pâté sont maintenant incassables (ou immangeables) !

Merci, JB, pour ton écoute attentive. Et ne t'inquiète pas, le jukebox marchera toujours, il suffit juste d'y mettre une pièce.

Merci, Amandine, pour nos correspondances électroniques en pointillé qui m'ont toujours fait sourire. J'espère que tu trouveras ton bonheur en doctorat !

Merci à mes tocards pour leur soutien inconditionnel : Maud, sans toi le groupe se serait effondré et serait probablement mort de faim, merci de toujours te préoccuper de nous ; Alice, merci pour ton temps, tu m'as rappelé sans cesse ce que c'est que vivre une vie normale et je t'en remercie ; et, Thomas, merci de m'avoir poussée à être toujours plus ouverte d'esprit, même si je ne me remettraï jamais des images pas *safe* que j'ai vues. Bientôt on pourra être des tocards réunis !

Merci à mes vendeuses préférées de crêpes sur la plage : Salimata, merci pour ta candeur et ton écoute, les quelques mois que tu as passés dans le centre ont été une bouffée d'air frais ; Sophie, merci pour ton humour et ta clairvoyance, tu m'as toujours écoutée, parfois malgré toi ; Claire, merci pour ta naïveté et ton dynamisme, qui ont toujours su me rebooster. Notre groupe de choc ouvrira sûrement sa buvette sur la plage, restez en ligne ! En attendant, merci.

Un énorme merci à Léa, tu as eu la grande chance de vivre pendant deux ans avec une doctorante. Merci à toi de n'avoir jamais cessé de me demander comment s'était passée ma journée et d'avoir toujours écouté la réponse. Merci pour ton excellente mémoire qui t'a permis de suivre les moindres détails de ma vie palpitante.

Un merci spécial à ma prof de salsa portoricaine, Sarah, qui nous a permis de nous amuser toute l'année en dansant. Merci à tous les autres salseros qui m'ont fait danser et rire jusqu'au bout de la nuit !

Thank you Dean for your wonderful advices. Don't worry I'm still going to steal some of your wisdom from time to time. Jessica, we'll see each other soon, I'm sure of it! A sweet thank you to Marco for his gentleness. I would also like to thank all the amazing people I've met while travelling. You all gave me back hope and allowed me to dream again.

Devin, grazie por il tuo amore.

Enfin, je remercie mes parents, sans qui je ne serais pas aussi bizarre. Merci, papa, de m'avoir appris à être ouverte d'esprit et à savoir relativiser en toutes circonstances. Merci, maman, pour toutes les (nombreuses) heures où tu m'as écoutée inlassablement, consolée et encouragée. Merci à tous les deux de m'avoir appris à être libre. Merci, Pierre, de comprendre pourquoi papa et maman m'ont rendue bizarre et de m'avoir toujours fait rire.

TABLE DES MATIERES

Liste des figures	10
Liste des tableaux	13
Liste des abréviations	14
INTRODUCTION	15
I. LA MUCOVISCIDOSE	16
1. EPIDEMIOLOGIE	16
2. HISTORIQUE	17
3. LE GENE ET LA PROTEINE CFTR	18
a. Le gène <i>CFTR</i>	18
b. Structure de CFTR	18
c. Fonctions de CFTR	19
d. Localisation de CFTR	21
e. Mutations de <i>CFTR</i>	22
4. MANIFESTATIONS CLINIQUES	23
a. Manifestations gastro-intestinales	24
b. Manifestations pancréatiques	25
c. Manifestations hépatobiliaires	25
d. Manifestations génitales	26
e. Manifestations osseuses	26
f. Manifestations pulmonaires	27
5. DIAGNOSTIC ET DEPISTAGE	31
6. LES TRAITEMENTS	33
a. Prise en charge des atteintes nutritionnelles et métaboliques	34
b. Prise en charge de l'atteinte pulmonaire	34
II. LA CORTICOSTEROID-BINDING GLOBULIN (CBG)	41
1. LA FAMILLE DES SERPINES	41
2. LE GENE <i>SERPINA6</i>	42
3. LA PROTEINE CBG	42
a. Structure de la CBG	42
b. Expression et localisation de la CBG	44
4. FONCTIONS DE LA CBG	45
a. La CBG régule la biodisponibilité de ses ligands	45

b.	La CBG transporte et adresse ses ligands	46
c.	Les CBG extrahépatiques contrôleraient l'accessibilité des ligands à leurs récepteurs	48
d.	La CBG déclencherait des cascades de signalisations intracellulaires	49
5.	VARIATIONS PHYSIOLOGIQUES DES NIVEAUX DE CBG	51
a.	Dimorphisme sexuel	51
b.	Cas de la grossesse	53
c.	Variations au cours de la vie	54
d.	Stress	55
e.	Inflammation	57
6.	MUTATIONS ET POLYMORPHISMES DU GENE <i>SERPINA6</i>	58
a.	Apport des modèles animaux	58
b.	Etudes chez l'homme	59
7.	ALTERATIONS PATHOLOGIQUES DES NIVEAUX DE CBG	62
a.	Maladies endocriniennes	62
b.	Pathologies à composante inflammatoire	63
c.	Procédures chirurgicales	64
d.	Maladies hépatiques	64

OBJECTIFS 65

RESULTATS 67

I. ARTICLE 68

1.	CONTEXTE DE L'ETUDE	68
2.	RESULTATS	69
3.	CONCLUSION	69

II. RESULTATS COMPLEMENTAIRES 78

1.	MATERIEL ET METHODES	78
a.	Biopsies et plasmas	78
b.	Culture cellulaire	79
c.	Extraction des ARN totaux	81
d.	Transcription inverse et PCR semi-quantitative	81
e.	Expérience de liaison de la CBG	82
f.	ELISA	82
g.	Western blot	82
h.	Analyses statistiques	83

2.	REGULATION DE LA CBG HEPATIQUE _____	83
	a. Régulation en conditions pro-inflammatoires	83
	b. Régulation en conditions anti-inflammatoires	85
	c. Régulation en conditions pro-infectieuses	86
	d. Régulation en condition pro-fibrosante	86
	e. Effet de l'inhibition de CFTR dans les cholangiocytes	87
	f. Effet de la surexpression de CBG sur l'inflammation	88
3.	RESULTATS COMPLEMENTAIRES SUR LE PLASMA _____	89
	a. Effet de l'atteinte hépatique sur le taux de CBG plasmatique	89
	b. Effet du dimorphisme sexuel sur le taux de CBG plasmatique	90
	c. Mesure de l'IL-6	91
	d. Mesure du cortisol total	93
4.	REGULATION DE LA CBG PULMONAIRE _____	94
	a. Expression de la CBG dans différents modèles cellulaires	94
	b. Régulation en conditions pro- et/ou anti-inflammatoires	95
	c. Effet de l'inhibition de CFTR	95
5.	ETUDE DE L'AAT AU NIVEAU HEPATIQUE ET PULMONAIRE _____	96
	a. Expression de l'AAT dans les foies de patients CF	97
	b. Patron d'expression de l'AAT pulmonaire	97
	c. Expression de l'AAT dans les poumons de patients CF	98
	d. Etude de l'influence de l'expression de l'AAT sur celle de la CBG	99
6.	PROBLEMES RENCONTRES _____	100
	a. Anticorps anti-CBG non spécifiques	100
	b. Expression faible de la CBG pulmonaire	104
	c. Le modèle souris CF	105
	DISCUSSION _____	107
I.	EXPRESSION ET REGULATION DE LA CBG HEPATIQUE _____	108
II.	ETUDE AU NIVEAU PLASMATIQUE _____	112
III.	EXPRESSION ET REGULATION DE LA CBG PULMONAIRE _____	115
IV.	LA CBG, UN OUTIL THERAPEUTIQUE DANS LA MUCOVISCIDOSE ? _____	116
	BIBLIOGRAPHIE _____	119
	COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES _____	145

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION : LA MUCOVISCIDOSE

Figure 1 Prévalence estimée de la mucoviscidose dans le monde, pour 100 000 habitants. _____	16
Figure 2 Du chromosome 7 à l'ARNm <i>CFTR</i> . _____	18
Figure 3 Structure de la protéine CFTR. _____	19
Figure 4 Fonctions de la protéine CFTR. _____	20
Figure 5 Immunomarquage de la protéine CFTR. _____	21
Figure 6 Classification des mutations du gène <i>CFTR</i> selon leurs conséquences fonctionnelles et fréquence des mutations en fonction des classes. _____	22
Figure 7 Principales manifestations digestives chez le patient atteint de mucoviscidose. _____	25
Figure 8 Représentation des voies aériennes basses et des alvéoles. _____	27
Figure 9 Représentation de l'organisation des différentes populations cellulaires de l'épithélium des voies aériennes basses. _____	28
Figure 10 Schéma comparant l'épithélium pulmonaire non-CF et CF. _____	30
Figure 11 Dépistage néonatal de la mucoviscidose en France. _____	32
Figure 12 Effet des nouvelles thérapies sur l'espérance de vie des patients atteints de mucoviscidose. _____	33
Figure 13 Prise en charge de l'atteinte pulmonaire chez les patients atteints de mucoviscidose. _	35

INTRODUCTION : LA CBG

Figure 14 Du chromosome 14 au gène <i>SERPINA6</i> . _____	42
Figure 15 Structure de la protéine CBG. _____	43
Figure 16 Niveaux d'expression de la CBG en ARN et en protéine dans différents tissus. _____	45
Figure 17 La CBG transporte et adresse les glucocorticoïdes sur le site de l'inflammation et de l'infection. _____	47
Figure 18 La CBG intracellulaire bloque l'action des glucocorticoïdes. _____	48
Figure 19 Conséquences de la liaison de la CBG à son récepteur membranaire. _____	50
Figure 20 Influence de la grossesse sur la CBG, le cortisol et la progestérone. _____	53
Figure 21 Variations diurnes de la concentration plasmatique de CBG et de cortisol total. _____	55
Figure 22 Effet de l'IL-6 sur la synthèse et la sécrétion de CBG <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> . _____	57
Figure 23 Variations des niveaux plasmatiques de CBG en fonction du contexte pathologique. _	62

RESULTATS COMPLEMENTAIRES : MATERIEL ET METHODES

Figure 24 Protocole de stimulation des cellules HepG2 par le milieu conditionné des cellules Mz-ChA-1. _____	80
---	----

RESULTATS COMPLEMENTAIRES : ETUDE DE LA CBG HEPATIQUE

Figure 25 Régulation de la CBG hépatique par l'IL-1 β et l'IL-6. _____	84
Figure 26 Régulation de la CBG hépatique par le TNF- α et l'IL-8. _____	84
Figure 27 Régulation de la CBG hépatique en conditions anti-inflammatoires. _____	85
Figure 28 Effet du LPS et de la flagelline de <i>P. aeruginosa</i> sur l'expression de CBG. _____	86
Figure 29 Effet du TGF- β 1 sur l'expression de CBG. _____	87
Figure 30 Effet de l'inhibition de CFTR dans les cholangiocytes sur l'expression de CBG au niveau hépatocytaire. _____	88
Figure 31 Effet de la surexpression de la CBG sur les niveaux d'IL-8. _____	89

RESULTATS COMPLEMENTAIRES : ETUDE PLASMATIQUE

Figure 32 Mesure de la CBG dans les plasmas de patients CF et non-CF en fonction de leur atteinte hépatique. _____	90
Figure 33 Mesure de la CBG dans les plasmas des hommes et des femmes. _____	91
Figure 34 Mesure de la concentration plasmatique d'IL-6 chez les patients non-CF et CF, en fonction de l'atteinte hépatique ou non. _____	92
Figure 35 Corrélation entre le taux d'IL-6 et le taux de CBG dans les plasmas de patients CF. ____	93
Figure 36 Mesure du cortisol total plasmatique chez les patients non-CF et CF. _____	93

RESULTATS COMPLEMENTAIRES : ETUDE DE LA CBG PULMONAIRE

Figure 37 Expression de la CBG pulmonaire dans différents modèles cellulaires non-CF et CF. ____	94
Figure 38 Régulation de la CBG pulmonaire en conditions pro- et/ou anti-inflammatoires. ____	95
Figure 39 Effet de l'inhibition de l'expression de CFTR par siRNA sur l'expression de CBG pulmonaire. _____	96

RESULTATS COMPLEMENTAIRES : ETUDE DE L'AAT

Figure 40 Expression de l'AAT dans les foies de patients non-CF et CF. _____	97
Figure 41 Patron d'expression de l'AAT pulmonaire. _____	98
Figure 42 Mesure de l'AAT pulmonaire dans les poumons de patients CF. _____	99
Figure 43 Effet de l'inhibition d'expression de l'AAT par siRNA sur l'expression de la CBG. ____	100

RESULTATS COMPLEMENTAIRES : PROBLEMES RENCONTRES

Figure 44 Western blots représentatifs des anticorps anti-CBG disponibles sur le marché. _____	101
Figure 45 Western blots réalisés avec les anticorps anti-CBG fournis par le D ^r John G. Lewis. ____	102
Figure 46 Western blot réalisé avec l'anticorps polyclonal après transfection d'un siRNA dirigé contre la <i>SERPINA1</i> . _____	103
Figure 47 Amélioration du protocole de RT sur les lignées pulmonaires. _____	104
Figure 48 Patron d'expression de la CBG dans 9 organes chez les souris WT et CF. _____	105
Figure 49 Mesure de la CBG dans les foies et les poumons de souris WT et CF. _____	106

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION : LA MUCOVISCIDOSE

Tableau 1 | Développement des différentes atteintes des patients atteints de mucoviscidose en fonction de leur âge. _____ 24

Tableau 2 | Traitements anti-inflammatoires évalués ou utilisés chez les patients atteints de mucoviscidose. _____ 38

INTRODUCTION : LA CBG

Tableau 3 | Mesure de la CBG plasmatique moyenne chez les hommes et les femmes avec ou sans contraception. _____ 52

Tableau 4 | Mutations identifiées du gène *SERPINA6*. _____ 60

RESULTATS COMPLEMENTAIRES : MATERIEL ET METHODES

Tableau 5 | Âge, sexe et nombre de patients inclus dans l'étude plasmatique en fonction de leur atteinte hépatique. _____ 78

RESULTATS COMPLEMENTAIRES : PROBLEMES RENCONTRES

Tableau 6 | Caractéristiques des anticorps fournis par le D^r John G. Lewis. _____ 102

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABC : <i>ATP-binding cassette</i>	HCOO⁻ : méthanoate
ABCC7 : <i>ATP-binding cassette sub-family C member 7</i>	HPRT : hypoxanthine phosphoribosyltransférase
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire	I⁻ : ion iodure
AMPc : adénosine monophosphate cyclique	IGF : <i>insulin-like growth factor</i>
ANO1 : anoctamine 1	IGFBP : <i>IGF binding protein</i>
ARNm : acide ribonucléique messenger	IL : interleukine
ATP : adénosine-5'-triphosphate	K_a : constante d'association
AAT : α1-antitrypsine	KO : <i>knock-out</i>
Br⁻ : ion bromure	LPS : lipopolysaccharide
CBG : <i>corticosteroid-binding globulin</i>	MEM : <i>minimum essential media</i>
CC10 : <i>club cell 10 kDa protein</i>	MMLV : <i>moloney murine leukemia virus</i>
CF : <i>cystic fibrosis</i>	MUC : mucine
CFBD : <i>cystic fibrosis-related bone disease</i>	Na⁺ : ion sodium
CFLD : <i>cystic fibrosis-related liver disease</i>	NBD : <i>nucleotide-binding domain</i>
CFRD : <i>cystic fibrosis-related diabetes mellitus</i>	NO₃⁻ : nitrate
CFTR : <i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>	PBS : <i>phosphate buffered saline</i>
CFTR_{inh}-172 : inhibiteur fonctionnel de CFTR	pH : potentiel hydrogène
CH₃COO⁻ : éthanoate	RCL : <i>reactive center loop</i>
Cir : cirrhotique	RIA : <i>radioimmunoassay</i>
Cl⁻ : ion chlorure	ROMK : <i>renal outer medullary potassium</i>
CRP : protéine C réactive	RT-PCR : <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
CVF : capacité vitale forcée	siRNA : <i>small interfering RNA</i>
Da : Dalton	SCN⁻ : ion thiocyanate
Dex : dexaméthasone	SERPIN : <i>serine protease inhibitors</i>
DMEM : <i>Dulbecco's modified eagle medium</i>	SLC : <i>solute carrier</i>
ELISA : <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>	SVF : sérum de veau foetal
ENaC : <i>epithelial Na⁺ channel</i>	TBS-T : <i>tris-buffered saline tween</i>
F⁻ : ion fluorure	TGF-β1 : <i>transforming growth factor β1</i>
FAM13A : <i>family with sequence similarity 13 member A</i>	TIR : trypsine immunoréactive
GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase	TMB : 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine
GC : glucocorticoïde	TMD : <i>transmembrane domain</i>
GR : récepteur des glucocorticoïdes	TNF-α : <i>tumor necrosis factor α</i>
GSH : glutathion réduit	UA : unité arbitraire
HCO₃⁻ : bicarbonate	VEMS : volume maximal expiré en une seconde
	WT : <i>wild type</i>

INTRODUCTION

I. LA MUCOVISCIDOSE

1. EPIDEMIOLOGIE

La mucoviscidose ou *cystic fibrosis* (CF) est une maladie rare à transmission autosomique récessive. Il s'agit de la maladie génétique létale la plus répandue dans les populations caucasiennes. Elle touche plus de 75 000 patients dans le monde (Cystic Fibrosis Canada 2017, Cystic Fibrosis Foundation 2017, European Cystic Fibrosis Society 2017) dont 6 757 ont été recensés en 2016 en France (Vaincre la mucoviscidose et Ined 2017).

L'incidence de la maladie est cependant hétérogène puisqu'on observe une variabilité selon les populations considérées (en termes de pays ou d'origine ethnique) : 1 enfant sur 3 000 naît avec la mucoviscidose dans les populations issues de l'Europe du Nord, tandis que l'incidence de la maladie est d'1 naissance sur 350 000 au Japon (O'Sullivan et Freedman 2009) (Figure 1).

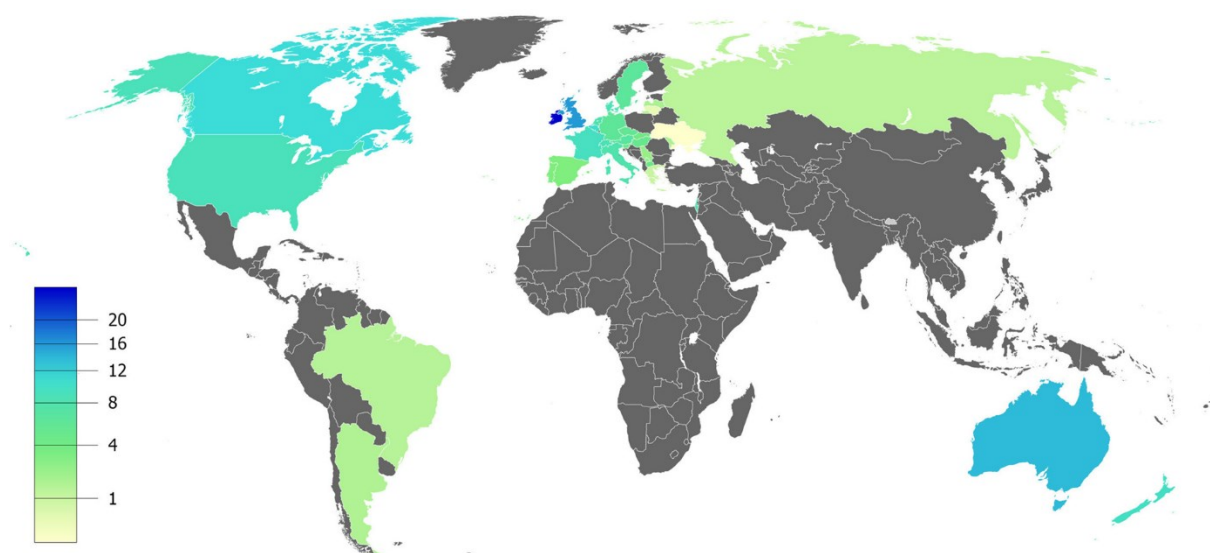


Figure 1 | Prévalence estimée de la mucoviscidose dans le monde, pour 100 000 habitants (d'après Lopes-Pacheco 2016).

Au sein d'un même pays, des disparités au niveau de l'incidence de la maladie ont également été observées. Ainsi, en France, la mucoviscidose touche 1 nouveau-né sur 2 500 dans le Nord-Ouest et 1 sur 10 000 dans le Sud-Est (Girodon-Boulandet et Costa 2005).

La fréquence de la maladie reste la même entre les hommes et les femmes, mais la maladie est plus sévère chez les femmes, qui en ont une espérance de vie réduite de 2,7 ans (Harness-Brumley *et al.* 2014).

2. HISTORIQUE

Des recherches historiques semblent indiquer que la mucoviscidose ait déjà été reconnue et associée à certaines morts dans des sociétés primitives de l'Europe de l'Est avant même le Moyen Âge (Busch 1990). Un vieil adage médiéval a ensuite associé un baiser salé sur le front de l'enfant atteint à sa mort : « Malheur à l'enfant chez qui un baiser sur le front a un goût salé. Il est ensorcelé et doit bientôt mourir » (Welsh et Smith 1995). En 1606, Alonso de Fontecha note également le goût salé qui se dépose sur ses doigts après avoir frotté le front d'un enfant malade (Alonso y de los Ruices de Fontecha 1606).

La première description médicale des lésions pancréatiques date de 1595 et a été effectuée après l'autopsie d'une fillette de 11 ans par le Néerlandais Pieter Pauw. Il y décrit un pancréas blanchâtre, gonflé et durci (Busch 1990).

Au XIX^e et au début du XX^e siècle, on commence à associer à une même maladie la présence de selles graisseuses, des complications méconiales et des lésions pancréatiques. Landsteiner sera ainsi le premier à décrire en 1905 l'iléus méconial chez des patients présentant un pancréas défectueux, associant par-là deux atteintes présentes chez les patients atteints de mucoviscidose (Landsteiner 1905).

Dans les années 1930, les descriptions de la maladie se précisent mais se focalisent surtout sur les atteintes pancréatiques et les diarrhées graisseuses. En 1936, Fanconi et ses collaborateurs désignent la maladie sous le terme de « fibromatose kystique et bronchectasie » (Fanconi *et al.* 1936). Andersen introduit ensuite en 1938 le terme de « fibrose kystique du pancréas », terme encore couramment préféré de nos jours dans les pays anglophones (Andersen 1938). Mais ce n'est qu'en 1945 que Farber nomme la maladie sous le nom de mucoviscidose, envisageant déjà que la maladie soit due à un épaissement généralisé du mucus (Farber 1945).

En 1946, Andersen et Hodges montrent que la maladie est génétique et résulte d'une mutation autosomale récessive, alors que le gène n'est pas encore identifié (Andersen et Hodges 1946).

Di Sant'Agnese constate ensuite, en 1953, dans la sueur des enfants atteints de mucoviscidose, un déséquilibre électrolytique avec notamment une élévation des ions chlorures, expliquant ainsi le goût salé retrouvé par Alonso de Fontecha trois siècles plus tôt (Di Sant'Agnese *et al.* 1953). Ces observations permettront la mise en place des tests diagnostiques de la sueur, toujours utilisés actuellement.

Le gène *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) est finalement identifié en 1989 comme étant le gène muté chez les patients atteints de mucoviscidose (Kerem *et al.* 1989, Riordan *et al.* 1989, Rommens *et al.* 1989). Peu de temps après, en 1991, la fonction de la protéine CFTR est déterminée comme étant celle d'un canal chlorure (Anderson *et al.* 1991).

3. LE GÈNE ET LA PROTÉINE CFTR

a. LE GÈNE *CFTR*

Le gène *CFTR* se situe au niveau du bras long du chromosome 7, en position 7q31.2. Il est constitué d'environ 250 kb et contient 27 exons. Sa traduction conduit à un ARNm (acide ribonucléique messager) de 6 132 nucléotides (Figure 2).

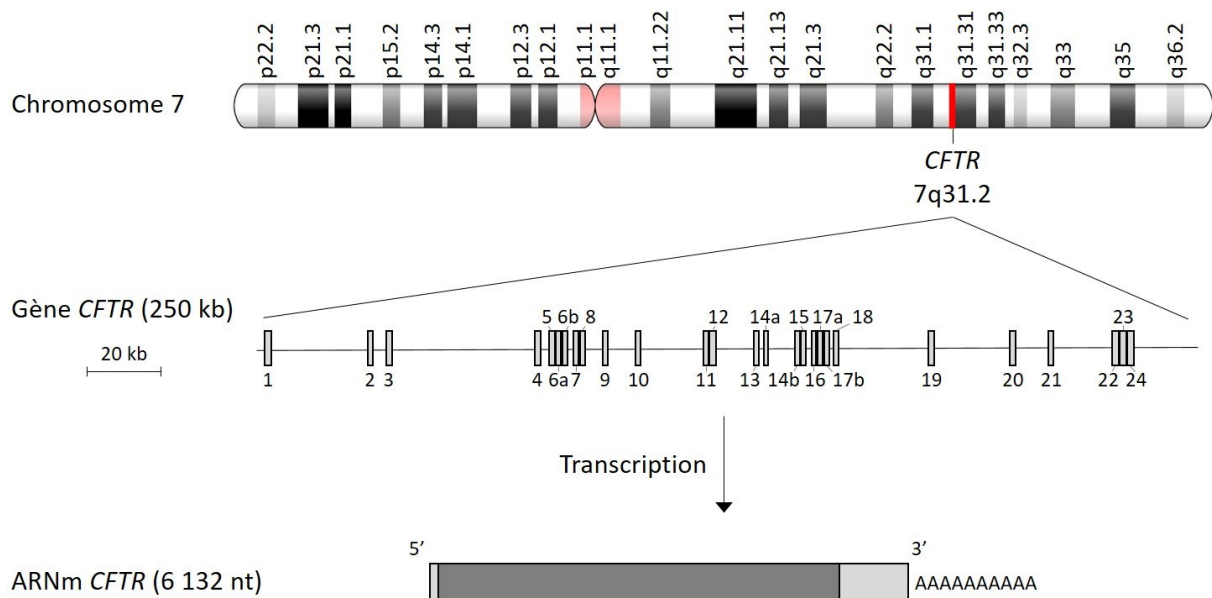


Figure 2 | Du chromosome 7 à l'ARNm *CFTR*. Représentation de bas en haut du chromosome 7 humain, du gène *CFTR* et de l'ARNm *CFTR* où le gris foncé représente la séquence codante (schéma du gène adapté à partir de Zielenski *et al.* 1991).

b. STRUCTURE DE *CFTR*

La protéine CFTR appartient à la famille des transporteurs ABC (transporteurs à *ATP-binding cassette*) et en est le 7^e membre de la sous-famille C. CFTR peut donc également être désignée par ABCC7 (*ATP-binding cassette sub-family C member 7*).

Les transporteurs ABC forment une large famille de protéines membranaires représentée dans les différents règnes du vivant. Ces protéines utilisent l'hydrolyse de l'ATP (adénosine-5'-triphosphate) afin de réaliser le transport d'un substrat (ion, acide aminé, protéine...) contre son gradient de concentration. Elles partagent une structure commune constituée de deux domaines transmembranaires (ou TMB, *transmembrane domain*) et deux domaines de liaison à l'ATP (ou NBD, *nucleotide-binding domain*).

CFTR est une protéine transmembranaire constituée de 1 480 acides aminés pour un poids moléculaire de 168 kDa (Dalton). Elle est composée des quatre domaines caractéristiques de la famille ABC : deux domaines transmembranaires (TMB1 et TMB2) et deux domaines de liaison à l'ATP (NBD1 et NBD2). Elle contient également un domaine régulateur (R) qui lui est unique, et qui est le lieu de phosphorylations permettant l'activation du canal (Figure 3).

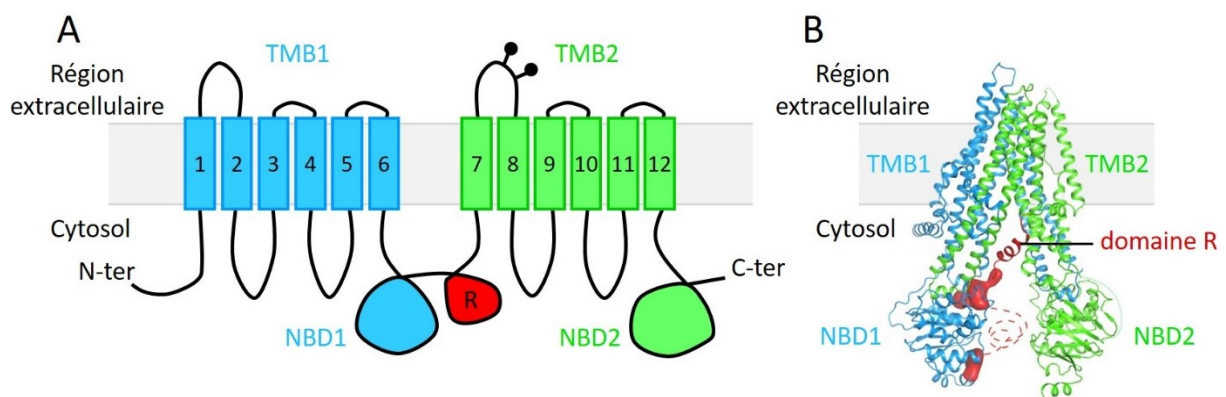


Figure 3 | Structure de la protéine CFTR. **A)** Schéma de l'organisation transmembranaire des différents domaines de la protéine CFTR (adapté à partir de Kim et Skach 2012). **B)** Structure de la protéine CFTR humaine obtenue par cryo-microscopie électronique (adaptée à partir de Liu *et al.* 2017).

c. FONCTIONS DE CFTR

La protéine CFTR est principalement connue pour son rôle de canal chlorure, faisant sortir les ions chlorures (Cl^-) au niveau du pôle apical de la cellule. Cette fonction, supposée à partir de la caractérisation du gène *CFTR* (Riordan *et al.* 1989) et des modèles structuraux de la protéine (Hyde *et al.* 1990), a ensuite été rapidement mise en évidence par plusieurs équipes. La réexpression de protéines CFTR sauvages et fonctionnelles dans des cellules CF ou n'exprimant par CFTR de manière endogène montre une perméabilité corrigée aux ions Cl^- et sensible à l'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) (Rich *et al.* 1990, Kartner *et al.* 1991). Cela est confirmé par Anderson et ses collègues par des altérations de la sélectivité du canal (Anderson *et al.* 1991). Ils montrent

également que sa séquence de perméabilité anionique ($\text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{I}^- > \text{F}^-$) se distingue de celles des autres canaux Cl^- épithéliaux qui sont plus perméables aux ions I^- qu'aux ions Cl^- (Figure 4).

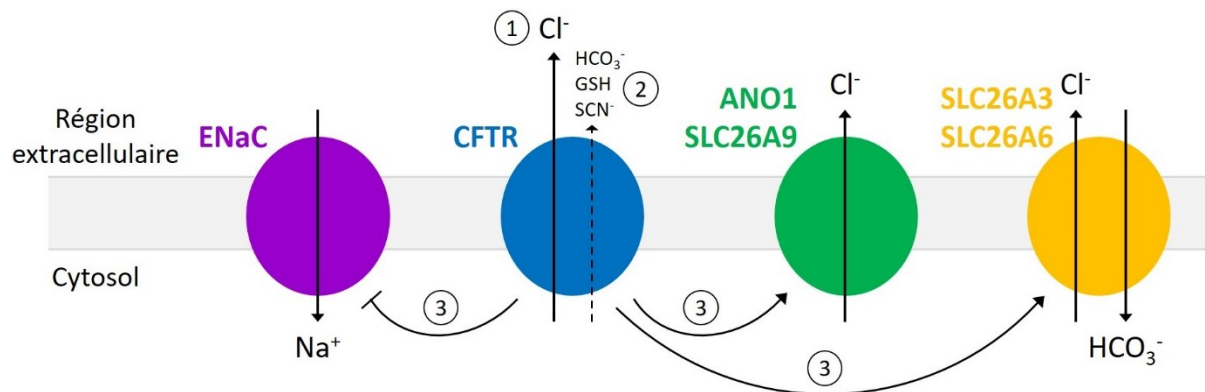


Figure 4 | Fonctions de la protéine CFTR. **1)** CFTR est un canal Cl^- **2)** qui peut également laisser passer les ions HCO_3^- et SCN^- et le GSH. **3)** CFTR régule d'autres canaux négativement (ENaC) ou positivement (ANO1, SLC26A9, SLC26A3 et SLC26A6).

En plus des ions Cl^- , le canal CFTR est capable de laisser passer d'autres ions polyatomiques tels que le nitrate (NO_3^-), le bicarbonate (HCO_3^-), le méthanoate (HCOO^-) et l'éthanoate (CH_3COO^-) (Linsdell *et al.* 1997). CFTR est également un transporteur de glutathion réduit (GSH) (Linsdell et Hanrahan 1998) et d'ions thiocyanates (SCN^-) (Tabcharani *et al.* 1993), ce qui confère au canal un rôle protecteur dans la réponse inflammatoire contre le stress oxydatif et la lutte microbienne (Figure 4).

Le canal CFTR participe également à la régulation de l'activité d'autres canaux ioniques. CFTR est en effet un inhibiteur du canal ENaC (*epithelial Na^+ channel*), qui lui-même permet la réabsorption du sodium (Na^+) (Briel *et al.* 1998, Mall *et al.* 1998). De plus, il a été montré que CFTR pouvait activer des canaux potassiques ROMK (*renal outer medullary potassium*), d'autres canaux Cl^- tels que ANO1 (anocamine 1) (Ruffin *et al.* 2013) et SLC26A9 (*solute carrier 26A9*) (Bertrand *et al.* 2009), ainsi que des échangeurs $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ comme SLC26A3 et SLC26A6 (Figure 4).

La perméabilité du canal CFTR aux ions HCO_3^- et sa capacité à activer des échangeurs $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ confère au canal un rôle important dans la régulation du pH, paramètre garantissant la bonne homéostasie au niveau des voies aériennes et la neutralisation des acides gastriques (Saint-Criq et Gray 2017).

La fonction de canal chlorure de la protéine CFTR, ainsi que sa fonction de régulation de l'activité d'autres canaux ioniques, contribuent à l'équilibre hydro-osmotique des épithéliums sécréteurs et à la fluidité des liquides sécrétés. Son absence ou son dysfonctionnement induit une déshydratation de ces sécrétions qui deviennent visqueuses, et ce, dans la plupart des organes où la protéine CFTR est normalement exprimée.

d. LOCALISATION DE CFTR

La protéine CFTR est exprimée dans de nombreux organes : glandes sudoripares, reins, intestin, foie, pancréas, appareils génitaux et poumons (Crawford *et al.* 1991, Hihnala *et al.* 2006). Dans ces organes, on la retrouve au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales (Figure 5).

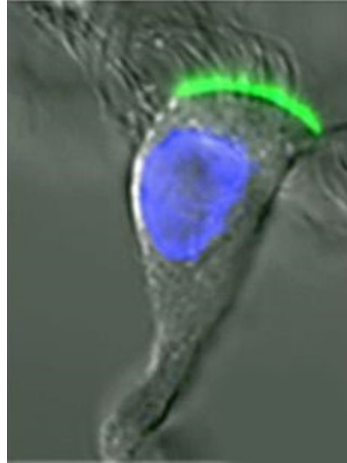


Figure 5 | Immunomarquage de la protéine CFTR. CFTR est exprimée à la membrane apicale de cellules ciliées obtenues par culture primaire (CFTR en vert et noyau [DAPI] en bleu) (d'après Cholon *et al.* 2010).

Il est intéressant de noter que la protéine CFTR ne s'exprime pas au même degré selon les tissus considérés : elle est par exemple fortement exprimée dans le pancréas et le tractus gastro-intestinal alors que son expression est faible au niveau pulmonaire (Crawford *et al.* 1991). De même, au sein d'un même tissu, CFTR n'est exprimée que par certaines cellules : ainsi, au niveau du foie, seuls les cholangiocytes expriment CFTR et, au niveau pulmonaire, seules les cellules ciliées, les cellules tapissant les glandes sous-muqueuses et les cellules alvéolaires expriment la protéine (Cohn *et al.* 1993, Kreda *et al.* 2005, Regnier *et al.* 2008).

e. MUTATIONS DE *CFTR*

A ce jour, 2 028 mutations du gène *CFTR* ont été recensées par la base de données *Cystic Fibrosis Mutation Database* (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app>). Bien que ces mutations aient des conséquences différentes sur la protéine, elles ont pu être regroupées selon des classes afin de faciliter la compréhension de la pathologie. Cinq classes de mutations reposant sur les conséquences fonctionnelles sur la protéine CFTR ont été créées : des mutations interférant sur la production, la maturation, la régulation, la conductance ou la synthèse de la protéine (Welsh et Smith 1993, Zielenski et Tsui 1995). Une sixième classe caractérisée par la présence d'une protéine CFTR instable à la membrane a ensuite été proposée (Haardt *et al.* 1999) (Figure 6).

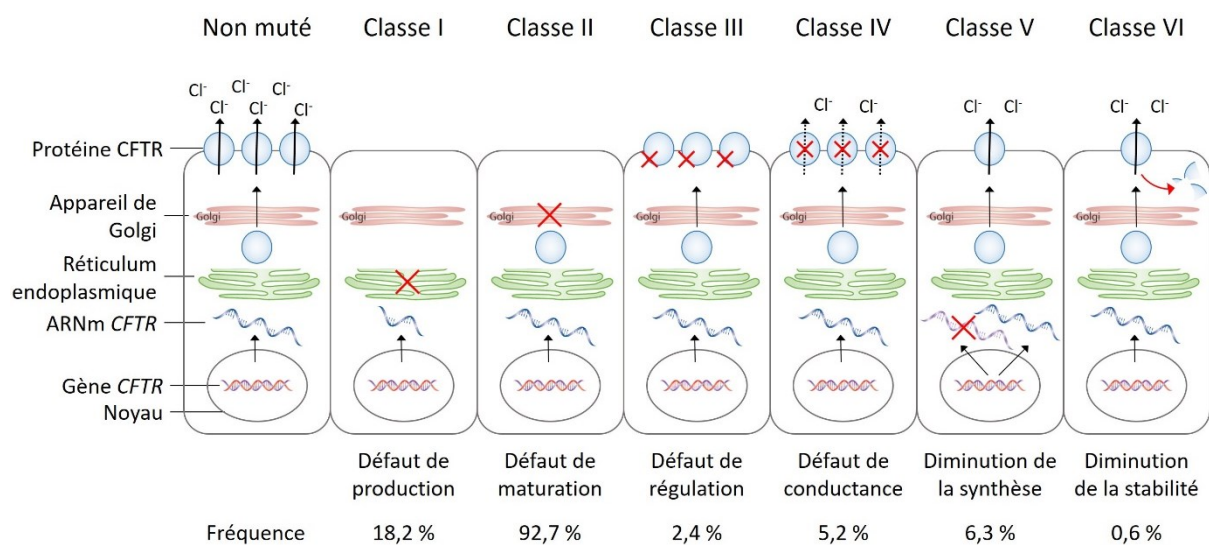


Figure 6 | Classification des mutations du gène *CFTR* selon leurs conséquences fonctionnelles (adaptée à partir de Boyle et De Boeck 2013) et fréquence des mutations en fonction des classes (pourcentage de patients français présentant une ou deux mutations de la classe, d'après Vaincre la mucoviscidose et Ined 2017).

La classe I se caractérise par une très faible production ou une absence totale de la protéine à la membrane, conséquence de l'apparition d'un codon STOP prématuré dans le gène *CFTR*. Les mutations de classe II provoquent un défaut dans la maturation de la protéine, par un repliement anormal. Cette anomalie conformationnelle conduit à l'accumulation de la protéine mutante dans le réticulum endoplasmique. On retrouve dans cette classe la mutation la plus fréquente chez les patients CF, la mutation Phe508Del. La troisième classe de mutation permet l'expression de la protéine CFTR à la membrane mais qui ne peut cependant pas être activée. Les mutations de classe I à III sont généralement associées à des phénotypes sévères de la maladie, en raison de l'absence ou de la très faible expression de CFTR fonctionnelle à la membrane.

Une fonction résiduelle de CFTR, exprimée à la membrane, est préservée en partie pour les mutations de classes IV à VI. Les patients porteurs de ces mutations présentent ainsi un phénotype

moins sévère, dit léger. Les mutations de classe IV correspondent à une altération de la conductance du canal CFTR. Les mutations de classes V et VI provoquent une diminution du nombre de canaux à la membrane, due à une diminution de la synthèse de la protéine (classe V) ou à une instabilité du canal à la membrane (classe VI).

Bien que la mucoviscidose soit une maladie monogénique, une hétérogénéité phénotypique a été observée pour des patients porteurs d'une même mutation (Bronsveld *et al.* 2001). Cette observation a conduit à l'identification de gènes dits modificateurs dont les variations génétiques (ou polymorphismes) ont été associées à une expression phénotypique différente chez les patients CF. Ces gènes modificateurs, situés en dehors du locus de *CFTR*, peuvent être associés à une sévérité accrue ou moindre de la maladie. Il a par exemple été montré que certains polymorphismes du gène *FAM13A* (*family with sequence similarity 13 member A*) étaient associés à une atteinte pulmonaire plus sévère chez les patients CF (Corvol *et al.* 2017). De la même façon, le gène *SERPINA1* (*serine protease inhibitor A1*) a été mis en évidence comme un gène modificateur de l'atteinte hépatique, et plus particulièrement son allèle Z, qui provoque un repliement anormal de la protéine d' α 1-antitrypsine (AAT) codée par cet allèle (Bartlett *et al.* 2009).

4. MANIFESTATIONS CLINIQUES

Du fait de la large distribution d'expression de CFTR dans l'organisme, la mucoviscidose est une maladie multi organe ayant des manifestations gastro-intestinales, pancréatiques, hépatobiliaires, génitales, osseuses et pulmonaires. Certaines de ces atteintes sont présentes dès la naissance, tandis que d'autres vont se mettre en place progressivement au cours de la vie du patient (Tableau 1).

	0 – 10 ans	10 – 20 ans	20 – 35 ans	> 35 ans
Voies aériennes	Obstructions précoces et bronchectasie	Bronchectasie	Bronchectasie et hémoptysie	Insuffisance respiratoire et transplantation
Infection prédominante	<i>Haemophilus influenza</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>S. aureus</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i> intermittents	<i>P. aeruginosa</i>	
Foie	Surélévation des enzymes hépatiques et hépatomégalie	<i>Cystic fibrosis liver disease</i>	Hypertension portale	Transplantation
Intestin	Iléus méconial		Obstruction distale	
Pancréas	Insuffisance pancréatique exocrine		<i>Cystic fibrosis-related diabetes mellitus</i>	
Système reproductif	Absence de canaux déférents			
Os			<i>Cystic fibrosis-related bone disease</i>	

Tableau 1 | Développement des différentes atteintes des patients atteints de mucoviscidose en fonction de leur âge (adapté à partir d'Elborn 2016).

a. MANIFESTATIONS GASTRO-INTESTINALES

Le registre français de la mucoviscidose estime que 14,2 % des enfants CF nés en 2016 présentaient un iléus méconial, c'est-à-dire une obstruction intestinale provoquée par un défaut d'évacuation des premières selles (le méconium) (Vaincre la mucoviscidose et Ined 2017). Cette obstruction est provoquée par la présence d'un mucus intestinal trop visqueux et par la présence de selles grasses n'ayant pas pu être digérées par les enzymes pancréatiques. Elle est traitée par chirurgie mais de nouvelles obstructions distales peuvent apparaître à l'âge adulte (Figure 7).

Les patients adultes peuvent également régulièrement être traités pour des reflux gastro-œsophagiens qui seraient dus à un défaut de clairance des acides gastriques dans l'œsophage. Il s'agirait de la conséquence d'un retard de vidange de l'estomac et d'une faible pression du sphincter œsophagien inférieur (Maqbool et Pauwels 2017). Une étude a de plus suggéré que l'apparition de ces reflux serait la conséquence de l'atteinte pulmonaire, provoquant un effort accru à l'inspiration et une diminution de la pression intra-thoracique (Pauwels *et al.* 2012).

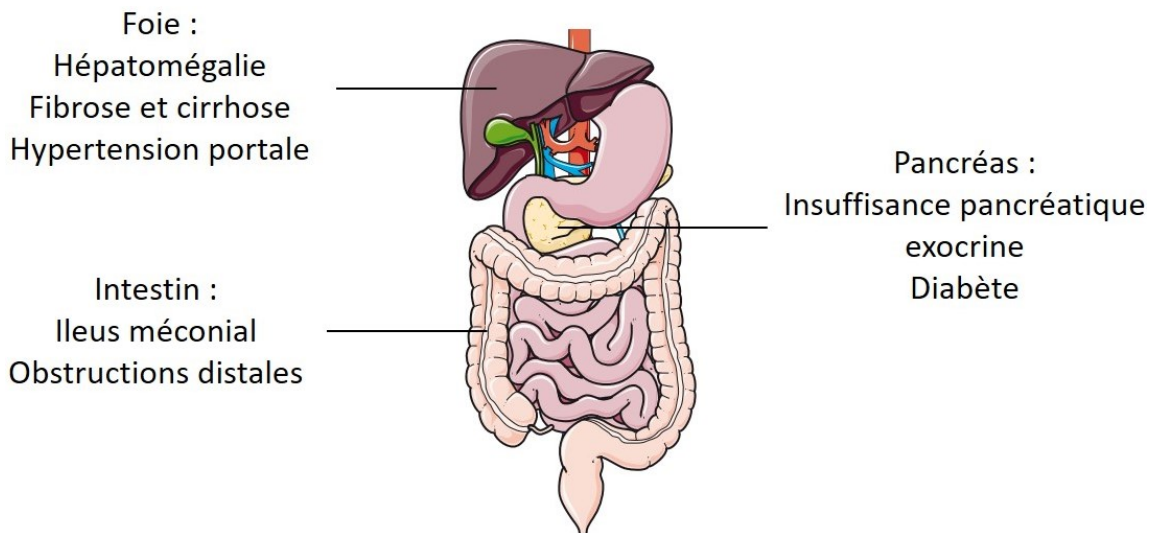


Figure 7 | Principales manifestations digestives chez le patient atteint de mucoviscidose.

b. MANIFESTATIONS PANCREATIQUES

Une insuffisance pancréatique exocrine est observée chez une majorité de patients CF (81,1 % des patients CF, Vaincre la mucoviscidose et Ined 2017) et se développe dès la naissance. Elle est causée par une obstruction des canaux intra-pancréatiques due à des sécrétions trop épaisses et provoque un défaut de sécrétion des enzymes pancréatiques. Ces dysfonctionnements vont induire une malabsorption des graisses, des protéines et des vitamines entraînant une stéatorrhée et un retard de croissance staturo-pondéral (Ledder *et al.* 2014).

Avec le temps, le pancréas va commencer une autolyse due aux enzymes retenues dans ses canaux et va ainsi détruire progressivement les cellules de ses îlots de Langerhans. Les patients présentent alors une insuffisance pancréatique endocrine avec la mise en place d'un diabète, appelé *cystic fibrosis-related diabetes mellitus* (CFRD). Ce diabète est dû à une insuffisance de sécrétion en insuline ainsi qu'à une résistance périphérique à l'insuline (Kelly et Moran 2013) (Figure 7).

c. MANIFESTATIONS HEPATOBILIAIRES

Entre 30 % et 40 % des enfants développent une atteinte hépatobiliaire que l'on nomme *cystic fibrosis-related liver disease* (CFLD) (Nährlich *et al.* 2016). Il s'agit de la troisième cause de mortalité chez les patients CF, après l'atteinte pulmonaire et les complications liées à la transplantation. Elle est responsable de 2,7 % des morts de patients atteints de mucoviscidose (European Cystic Fibrosis Society 2017).

La CFLD est la conséquence de l'obstruction des canaux biliaires intra-hépatiques du fait d'une bile trop épaisse pour s'écouler correctement. On observe alors fréquemment chez les patients une hépatomégalie et une surélévation des enzymes hépatiques qui reste cependant très variable d'un individu à l'autre. La diminution du flux biliaire et la rétention des acides biliaires cytotoxiques peuvent être à l'origine de lésions cellulaires. Cela provoque une inflammation et un dépôt de collagène au niveau des canaux hépatiques, ce qui conduit à une fibrose avec développement d'une cirrhose focale (Debray *et al.* 2017). Seuls 3,9 % des patients vont ensuite développer une cirrhose multilobulaire avec une hypertension portale (Vaincre la mucoviscidose et Ined 2017). Ce dernier stade peut mener à une insuffisance hépatique nécessitant une transplantation (Figure 7).

d. MANIFESTATIONS GENITALES

Les femmes atteintes de la mucoviscidose sont fertiles mais souffrent d'une hypofertilité causée par une hyperviscosité de la glaire cervicale (Kopito *et al.* 1973). Les hommes, quant à eux, sont infertiles à plus de 95 % en raison d'une azoospermie, conséquence d'une absence bilatérale de canaux déférents (Anguiano *et al.* 1992).

e. MANIFESTATIONS OSSEUSES

Avec l'augmentation de l'espérance de vie des patients, de nouvelles manifestations de la maladie sont apparues telles que les manifestations osseuses regroupées sous le nom de *cystic fibrosis-related bone disease* (CFBD). La CFBD regroupe des cas d'ostéopénie et d'ostéoporose dont la prévalence augmente avec l'âge des patients (Jacquot *et al.* 2016).

Les mécanismes physiopathologiques de la CFBD semblent être multiples. Il a été montré que CFTR était exprimée au niveau des ostéoblastes et des ostéoclastes et que la protéine pourrait avoir un effet direct sur la CFBD (Shead *et al.* 2007, Le Heron *et al.* 2010). Il semble également que la malabsorption puisse jouer un rôle en provoquant un déficit en vitamine D et K et que l'inflammation chronique soit à l'origine de fragilisations osseuses (Shead *et al.* 2010, Ferguson et Chang 2014). Il est à noter que les corticothérapies reçues par les patients, en cas d'exacerbation ou de greffe, peuvent également aggraver l'ostéoporose.

f. MANIFESTATIONS PULMONAIRES

L'atteinte pulmonaire reste la principale cause de morbidité et de mortalité chez les patients atteints de mucoviscidose. Les manifestations pulmonaires sont nombreuses et comptent notamment une bronchectasie et des obstructions des voies respiratoires qui se mettent en place dès la naissance. Les patients souffrent également d'une toux chronique, de la présence de polypes nasaux, d'asthme et d'infections récurrentes par des pathogènes comme *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*.

i. PHYSIOLOGIE PULMONAIRE

Afin de mieux comprendre le développement de ces atteintes, je décrirai dans un premier temps l'organisation et l'histologie du poumon.

L'appareil respiratoire est composé de deux parties : les voies aériennes supérieures, qui comprennent les cavités nasales et buccales, le pharynx et le larynx ; et les voies aériennes inférieures constituées de la trachée, des bronches et des bronchioles qui se terminent par les alvéoles (Figure 8). Les voies aériennes permettent de conduire l'air tout en le conditionnant jusqu'aux alvéoles où s'effectuent des échanges gazeux au niveau de la barrière alvéolo-capillaire entre l'air et le sang.

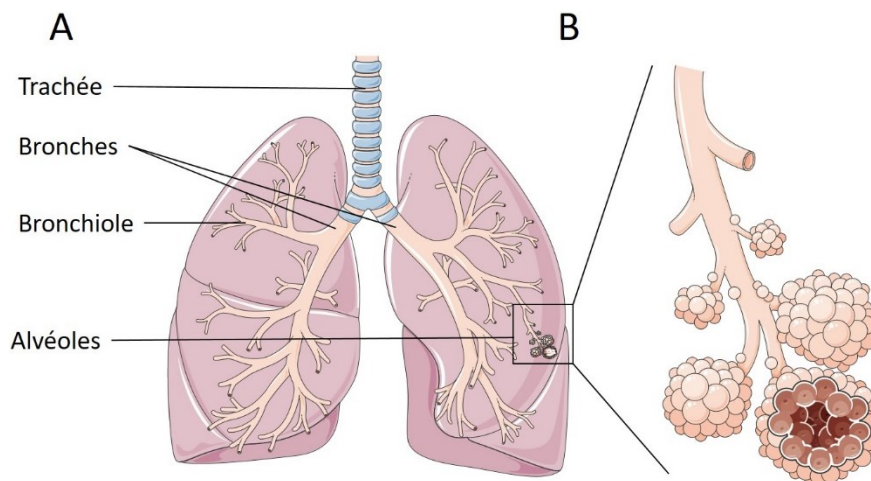


Figure 8 | Représentation des voies aériennes basses (A) et des alvéoles (B).

L'épithélium des voies aériennes basses est un épithélium complexe dont la composition et l'organisation évoluent en fonction de son emplacement. L'épithélium qui tapisse la trachée et les bronches est un épithélium pseudo-stratifié tandis qu'il devient cuboïde simple au niveau des bronchioles terminales pour finalement s'organiser sous forme d'épithélium simple au niveau des alvéoles (Figure 9).

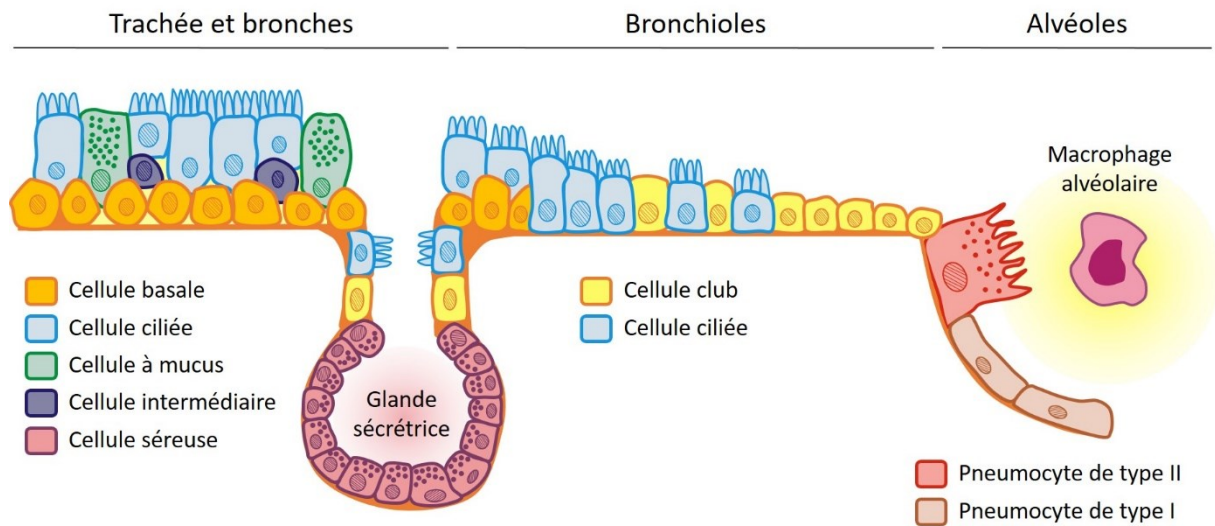


Figure 9 | Représentation de l'organisation des différentes populations cellulaires de l'épithélium des voies aériennes basses (adaptée à partir d'Antunes *et al.* 2013).

L'épithélium des voies aériennes a pour principal rôle d'assurer la protection de la muqueuse respiratoire. Cet épithélium est constitué de différents types cellulaires qui assurent chacun une fonction différente (Figure 9).

- Les cellules ciliées représentent environ 50 % des cellules de l'épithélium bronchique et en constituent ainsi le principal type cellulaire (Serafini et Michaelson 1977). Elles possèdent au niveau du pôle apical de 200 à 300 cils qui battent de façon régulière et synchrone (Rhodin 1966).
- Les cellules basales sont présentes au niveau de la lame basale et interviennent dans les processus de régénération et de réparation de l'épithélium (Wansleeben *et al.* 2013).
- Les cellules à mucus, ou caliciformes, sont responsables de la production du mucus et plus particulièrement des protéines qui le constituent, les mucines (MUC), telles que MUC5AC (Hovenberg *et al.* 1996).
- Les cellules séreuses sont présentes au sein des glandes sécrétrices. Elles contribuent à la production de mucus et sécrètent des protéines de défense comme des anti-protéases et des anti-bactériens (Basbaum *et al.* 1990).

- Les cellules club sont principalement retrouvées au niveau de l'épithélium bronchiolaire. Elles peuvent sécréter des protéines du surfactant mais sécrètent également des protéines qui leur sont spécifiques comme la protéine CC10 (*club cell 10 kDa protein*) qui joue un rôle anti-inflammatoire (Wong *et al.* 2009).
- Des cellules neuroendocrines peuvent être retrouvées en très faible quantité au niveau de la lame basale et produisent différents peptides et neuropeptides. Elles sont capables de détecter l'hypoxie et de réguler le tonus musculaire et la sécrétion de mucus (Cutz *et al.* 2013).
- Les pneumocytes sont des cellules retrouvées uniquement au niveau des alvéoles. Il en existe deux types : les pneumocytes de type I, qui sont très aplatis, permettent d'optimiser les échanges gazeux, tandis que les pneumocytes de type II, qui sont cuboïdes et présentent des microvillosités apicales, synthétisent le surfactant pulmonaire.

L'épithélium alvéolaire est recouvert d'un surfactant dont le principal rôle est d'éviter le collapsus des alvéoles en réduisant la tension de surface. De la trachée aux bronchioles, l'épithélium est recouvert d'un liquide de surface qui se compose de deux couches, le liquide périciliaire et le mucus au-dessus. Ce liquide de surface permet de protéger l'épithélium d'une déshydratation et d'y piéger des particules organiques et inorganiques inhalées. Ces éléments vont ensuite être évacués grâce aux battements synchronisés des cils des cellules ciliées qui les font remonter vers l'appareil digestif. C'est ce qu'on appelle la clairance mucociliaire (Figure 10A).

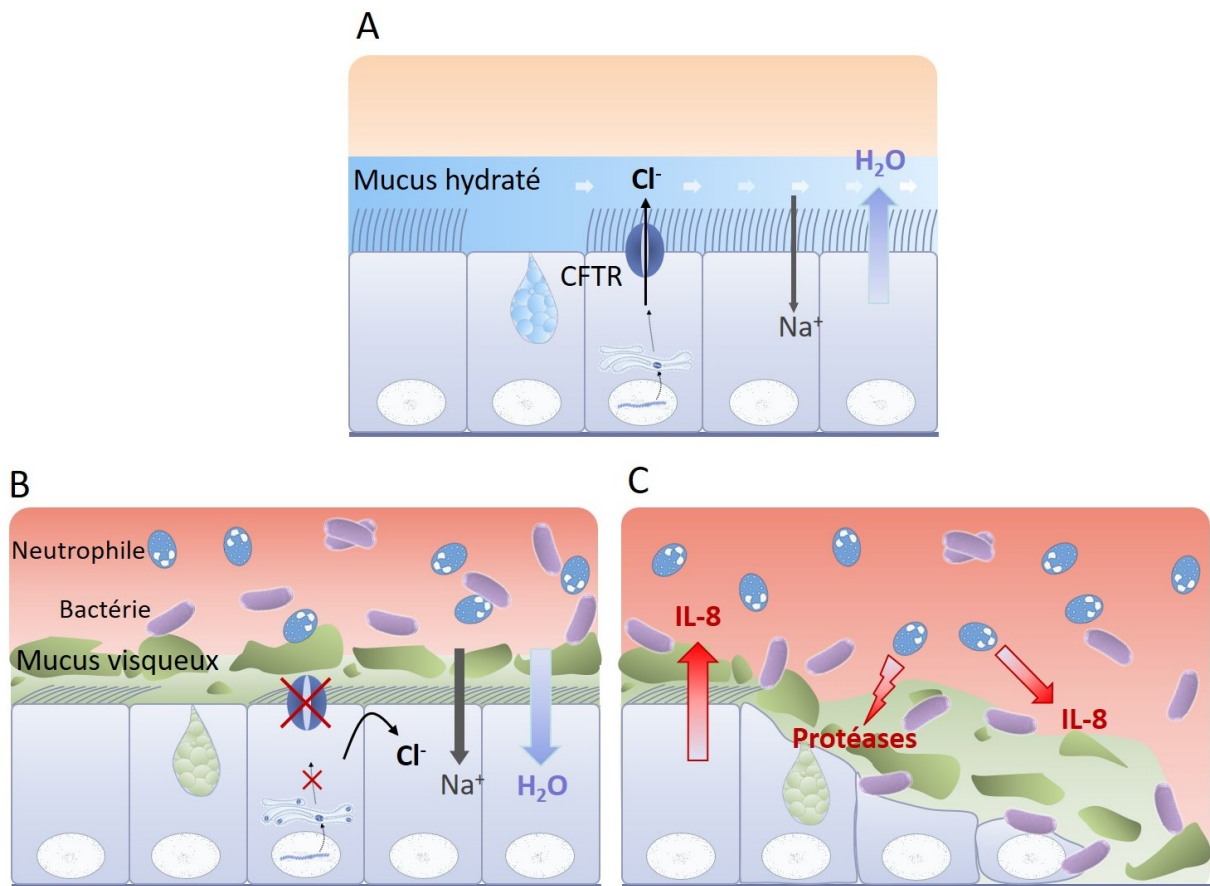


Figure 10 | Schéma comparant l'épithélium pulmonaire non-CF et CF. **A)** Epithélium pulmonaire non-CF : CFTR assure la sortie des ions Cl^- . L'hydratation du liquide de surface est optimale pour permettre la clairance mucociliaire. **B)** Epithélium pulmonaire CF : la déficience de CFTR entraîne une diminution de sortie des ions Cl^- , une augmentation de l'entrée d'ions Na^+ et une déshydratation du liquide de surface des voies aériennes conduisant à un épaississement du mucus. **C)** Des cycles d'infection et d'inflammation se mettent en place avec une hypersécrétion d'IL-8 et de protéases. Ces cycles induisent, à long terme, une dégradation de l'épithélium pulmonaire (adaptée à partir de Sonnevile *et al.* 2015).

ii. PHYSIOPATHOLOGIE PULMONAIRE DE LA MUCOVISCIDOSE

Au niveau de l'épithélium CF, l'absence ou la dysfonction de CFTR entraîne un déséquilibre ionique du liquide de surface des voies aériennes : les ions Cl^- sont anormalement retenus dans la cellule et les ions Na^+ sont hyperabsorbés. Cela conduit à la déshydratation du liquide de surface des voies aériennes. Le mucus devient visqueux et trop épais pour être évacué, ce qui provoque des obstructions des voies aériennes (Figure 10B). La clairance mucociliaire est diminuée et le mucus stagnant devient alors le lieu propice de colonisations par des pathogènes qui ne sont plus évacués. Les patients sont généralement infectés dans un premier temps par *Haemophilus influenza* puis *Staphylococcus aureus*, pour être finalement colonisés par *Pseudomonas aeruginosa*. L'épithélium pulmonaire tente de résoudre l'infection en induisant une réponse inflammatoire. L'inflammation chez les patients atteints de mucoviscidose est caractérisée par un recrutement important de

polynucléaires neutrophiles et une surproduction d'IL-8 (interleukine 8), marqueur de l'inflammation pulmonaire dans le contexte de la mucoviscidose et chémoattractant des neutrophiles. Les neutrophiles recrutés présentent cependant un défaut d'élimination des pathogènes présents au niveau des voies aériennes et ne permettent pas de combattre l'infection efficacement. Se mettent alors en place des cycles d'inflammation et d'infection, dus aux infections répétées des voies aériennes des patients ainsi qu'à l'incapacité de la réponse inflammatoire à y remédier.

Les neutrophiles libèrent de plus des taux élevés de protéases, dont l'élastase, qui vont progressivement dégrader l'épithélium pulmonaire. Les anti-protéases, sensées pallier cet effet délétère, ne sont pas sécrétées en quantité suffisante et se retrouvent submergées par les protéases, produites de manière excessive (McElvaney 2016). Ces protéases vont également induire une surproduction d'IL-8, par les cellules épithéliales bronchiques, qui surexprimaient déjà de manière constitutive l'IL-8 dans le contexte de la mucoviscidose (Tabary *et al.* 1998) (Figure 10C). L'épithélium pulmonaire est ainsi progressivement dégradé par les pathogènes stagnants ainsi que l'inflammation, peu contrôlée dans ce contexte, et elle-même renforcée par l'infection. Ces cycles d'infection et d'inflammation conduisent ensuite à une insuffisance respiratoire terminale nécessitant une transplantation pulmonaire.

5. DIAGNOSTIC ET DEPISTAGE

Un premier consensus établi en 1998 les critères de diagnostic des patients atteints de mucoviscidose (Rosenstein et Cutting 1998). On considère aujourd'hui que le diagnostic nécessite la présence d'une ou de plusieurs manifestations cliniques, un test de la sueur positif à deux reprises et l'identification de deux mutations du gène *CFTR* (De Boeck *et al.* 2017).

Le test de Guthrie, dépistage néonatal systématique déjà mis en place en France depuis plusieurs décennies dans le cadre d'autres pathologies, est utilisé pour le dépistage de la mucoviscidose à partir de 2002. Ce test repose sur un dosage de la trypsine immunoréactive (TIR) dans le sang du nouveau-né quelques jours après sa naissance. Du fait de l'obstruction des voies pancréatiques chez le patient atteint de mucoviscidose, le trypsinogène, précurseur de la trypsine, n'atteint plus l'intestin. La TIR est clivée dans le sang et son dosage anormalement élevé (> 60 µg/L). Cette surélévation n'étant pas spécifique de la mucoviscidose, il est nécessaire de coupler ce dosage à une analyse moléculaire par la recherche de mutations du gène *CFTR* et l'établissement de tests de la sueur (Figure 11).

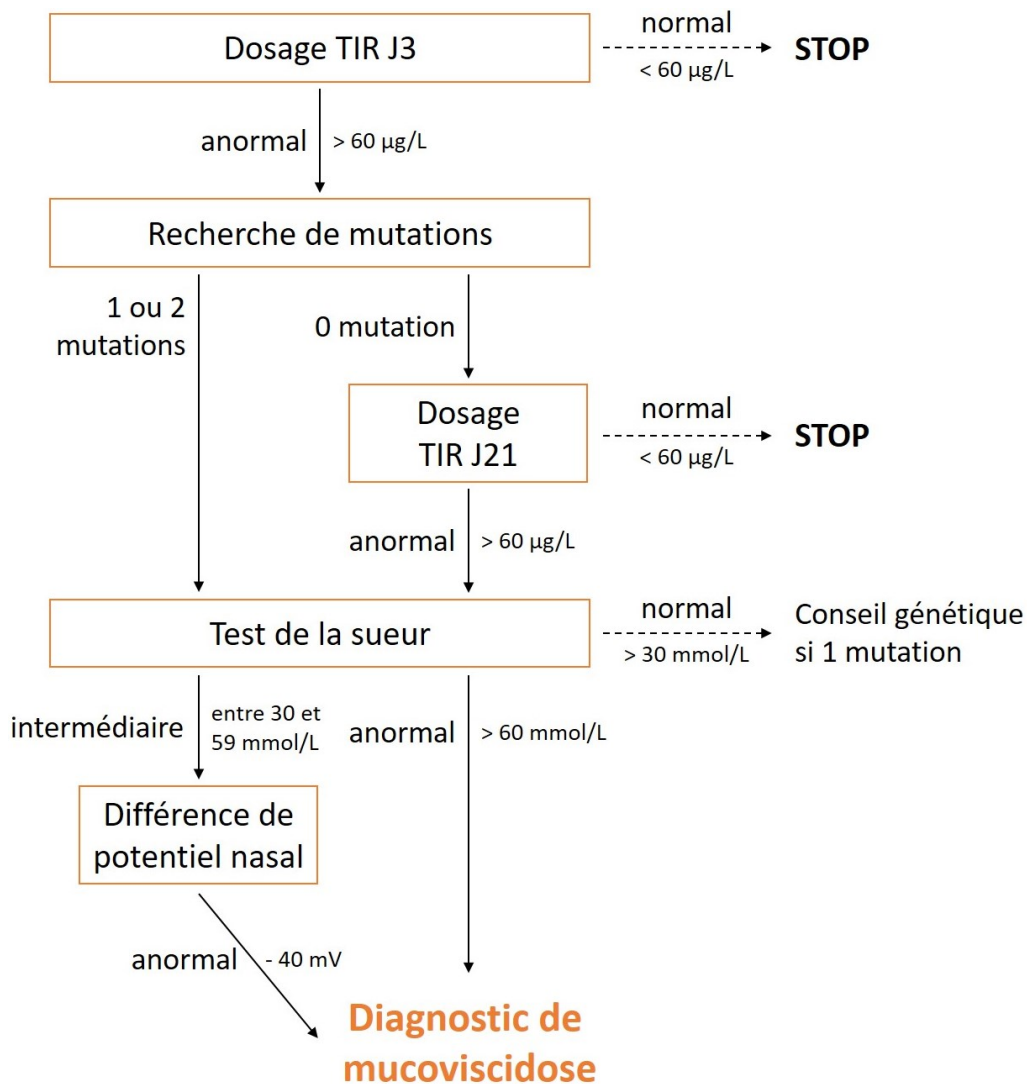


Figure 11 | Dépistage néonatal de la mucoviscidose en France (adaptée à partir de Munck *et al.* 2005).

Le test de la sueur, déjà proposé en 1953 par Di Sant’Agnese comme test diagnostique pour la mucoviscidose, repose sur la mesure de la concentration des ions Cl^- dans la sueur des patients (Di Sant’Agnese *et al.* 1953). La dysfonction de CFTR provoque une diminution ou une absence de réabsorption des ions Cl^- au niveau des glandes sudoripares. Une concentration supérieure à 60 mmol/L est considérée comme pathologique.

Les conditions de diagnostic peuvent cependant s’avérer plus compliquées. En effet, la recherche de mutations du gène *CFTR*, ne s’effectuant que sur les 29 principales mutations, peut ne révéler qu’une mutation voire aucune malgré un dosage de la TIR anormal. Lorsque seule une mutation est détectée, un test de la sueur doit confirmer le diagnostic pressenti. Si aucune mutation n’a été mise en évidence, un deuxième dosage de TIR est réalisé au 21^e jour. S’il est positif, un test de la sueur sera également réalisé. Pour certaines formes atypiques de la maladie, le test de la sueur est non conclusif avec des valeurs intermédiaires. On réalise alors une mesure de la différence de

potentiel transépithéliale intranasale (Figure 11). Ce test mesure la différence de potentiel transépithéliale entre la peau et la muqueuse nasale. Chez les patients sains, cette différence est de - 20 mV, alors qu'elle est de - 40 mV chez les patients atteints de mucoviscidose (Tridello *et al.* 2016).

6. LES TRAITEMENTS

L'espérance de vie des patients atteints de mucoviscidose a rapidement augmenté à partir des années 1950, où elle n'était que de 3 ans, pour atteindre 40 ans de nos jours (MacKenzie *et al.* 2014). De multiples facteurs sont impliqués, tels que la mise en place d'un diagnostic précoce, l'établissement de centres spécialistes de la maladie et le développement de nouveaux traitements (Figure 12).

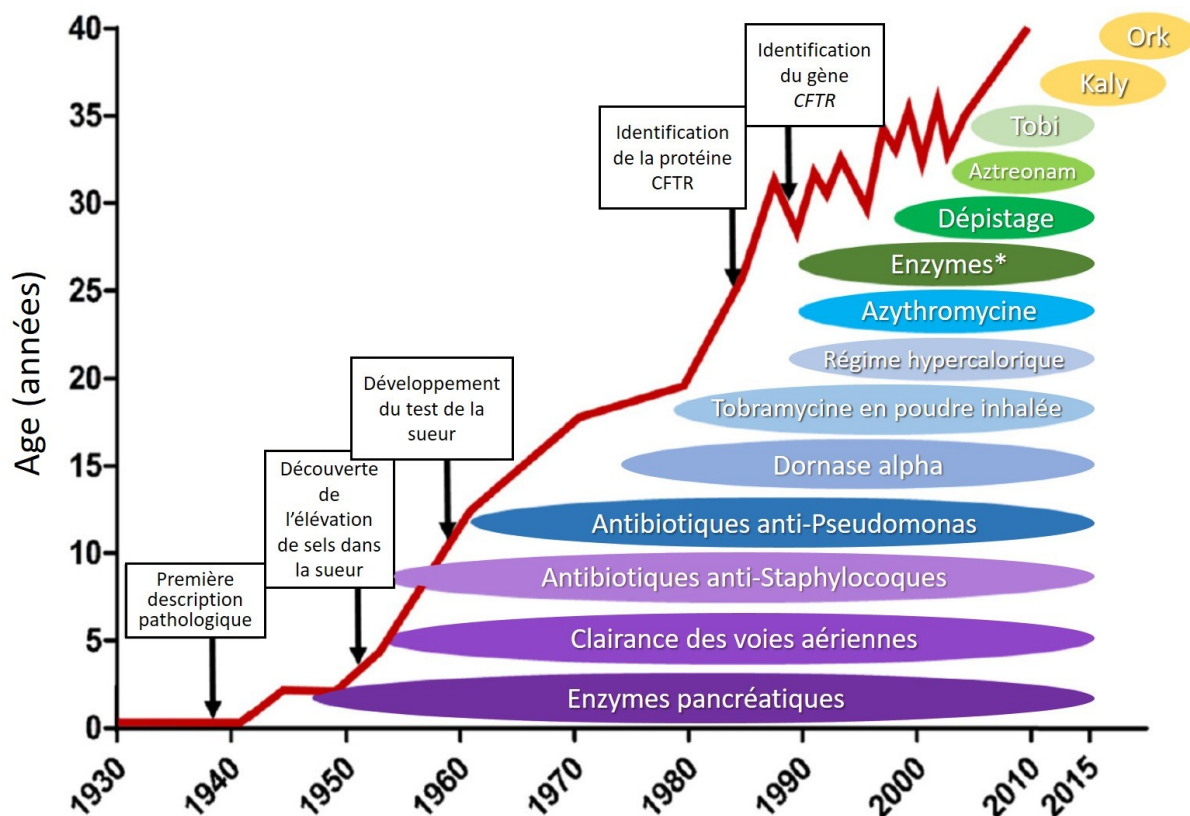


Figure 12 | Effet des nouvelles thérapies sur l'espérance de vie des patients atteints de mucoviscidose. Tobî : Tobramycine en solution inhalée ; Kaly : Kalydeco® ; Ork : Orkambi® ; * Enzymes : enzymes pancréatiques enrobées (adaptée à partir de Lopes-Pacheco 2016).

a. PRISE EN CHARGE DES ATTEINTES NUTRITIONNELLES ET METABOLIQUES

Le statut nutritionnel du patient est corrélé positivement avec sa fonction pulmonaire et sa survie (Kerem *et al.* 2014). Il est donc important pour les médecins de prendre en charge les atteintes pancréatiques, hépatobiliaires et gastro-intestinales.

Du fait de la malabsorption et des carences alimentaires, les patients ont une alimentation hypercalorique et équilibrée, supplémentée par des enzymes pancréatiques pour les aider à digérer leurs aliments. Des vitamines sont également apportées en complément. La CFRD étant caractérisée par une insulino-insuffisance, les patients peuvent recevoir un traitement à base d'insuline (Schindler *et al.* 2015). L'atteinte hépatique, la CFLD, peut elle, être traitée par l'administration d'acide ursodésoxycholique pouvant améliorer la fonction hépatique, bien que son effet reste encore à démontrer (Cheng *et al.* 2017).

b. PRISE EN CHARGE DE L'ATTEINTE PULMONAIRE

Malgré l'amélioration de l'espérance de vie, la majorité des patients atteints de mucoviscidose meurent toujours d'insuffisance pulmonaire. Ralentir la progression de l'atteinte pulmonaire est donc un axe majeur de la prise en charge de la mucoviscidose. Les traitements reçus dans ce cadre sont nombreux et visent les différentes composantes de l'atteinte. On peut les classer en deux catégories : les traitements curatifs et les traitements symptomatiques (Figure 13).

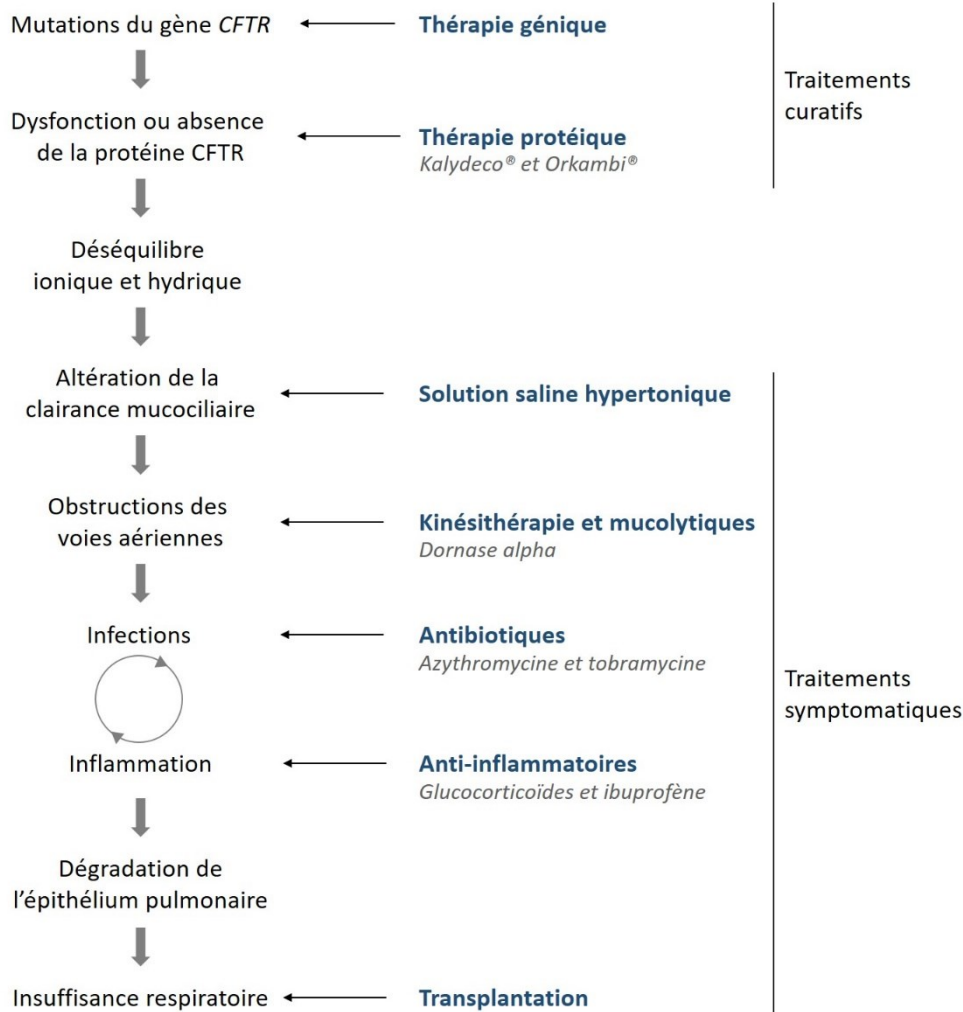


Figure 13 | Prise en charge de l'atteinte pulmonaire chez les patients atteints de mucoviscidose.

i. TRAITEMENTS CURATIFS

L'apparition de la maladie pourrait être prévenue par l'insertion du gène *CFTR* sain dans les cellules des patients en remplacement du gène muté. C'est ce qu'on appelle la thérapie génique (Figure 13). Deux types de vecteurs peuvent être utilisés : les vecteurs viraux, où le gène est incorporé dans le système de réplication d'un virus incompetent, et les vecteurs non viraux, le plus souvent des liposomes. Les vecteurs viraux provoquent des problèmes d'inflammation tandis que les non viraux, moins immunogènes, semblent être moins efficaces pour transférer le gène sain (Lee *et al.* 2016). Une étude menée sur des patients ayant reçu le plasmide d'ADNc *CFTR* couplé à un liposome pendant un an n'a en effet montré qu'une amélioration modérée de leur fonction respiratoire (Alton *et al.* 2016). Les études actuelles visent à développer de nouveaux agents de transfection afin d'atteindre un niveau d'expression de CFTR suffisant pour observer des effets cliniques bénéfiques.

De nouveaux traitements ciblant la protéine CFTR ont été développés au cours des dernières années : il s'agit des thérapies dites protéiques (Figure 13). Parmi ces thérapies, des molécules appelées translecteurs ont été développées afin de permettre la transcription entière du gène pour les mutations de classe I, malgré l'apparition d'un codon stop prématuré. L'ataluren (ou PTC124) a été identifié comme translecteur en 2007 (Welch *et al.* 2007). Les études cliniques réalisées ensuite n'ont montré que des effets modérés sur une catégorie réduite de patients : seuls les patients n'ayant pas reçu de traitement à base d'aminosides (molécules possédant déjà une activité de translecture) avaient une fonction respiratoire mieux préservée comparée aux contrôles (Aslam *et al.* 2017).

De nouvelles thérapies protéiques ont également émergé ces dernières années afin de corriger l'adressage de la protéine CFTR à la membrane et de potentialiser sa conductance. Le Kalydeco® (ivacaftor ou VX-770) est le premier potentiateur à avoir eu une autorisation de mise sur le marché pour les porteurs de la mutation Gly551Asp (mutation de classe III portée par 1,7 % des patients). Ses résultats encourageants ont ensuite permis une extension d'autorisation de mise sur le marché pour d'autres mutations (Patel *et al.* 2015). Les mutations de classe III sont aussi caractérisées par une absence de la protéine à la membrane apicale et/ou une augmentation de sa dégradation. Des correcteurs comme le lumacaftor (ou VX-809) ou le tezacaftor (VX-661) permettent de pallier ce problème et stabilisent la protéine CFTR à la membrane. Une association du lumacaftor et de l'ivacaftor (Orkambi®) bénéficie actuellement d'une autorisation de mise sur le marché pour les porteurs de la mutation Phe508Del âgés de plus de 12 ans. Malgré une amélioration modeste de la fonction respiratoire (3 %), cette nouvelle association a permis d'ouvrir un nouveau pan dans la recherche de traitements curatifs (Wainwright *et al.* 2015).

ii. TRAITEMENTS AMELIORANT LA CLAIRANCE MUCOCILIAIRE

L'amélioration de la clairance mucociliaire peut se faire de façon mécanique ou pharmaceutique. Les traitements mécaniques correspondent à des séances de kinésithérapie quotidiennes ou biquotidiennes ayant pour but d'évacuer le mucus stagnant.

Concernant les traitements pharmaceutiques, deux grands types de produits inhalés sont proposés aux patients : la DNase recombinante humaine (dornase alpha ou Pulmozyme®) et une solution saline hypertonique. Le premier type, la dornase alpha, est un mucolytique qui dégrade l'ADN libéré au niveau des voies aériennes par les cellules apoptotiques comme les neutrophiles. La solution saline permet d'augmenter l'hydratation des voies aériennes et la clairance mucociliaire (Figure 13).

iii. TRAITEMENTS ANTI-INFECTIEUX

Les patients atteints de mucoviscidose sont régulièrement infectés par des pathogènes. Des examens cytbactériologiques des crachats sont réalisés afin de déterminer les types de pathogènes présents et leur sensibilité aux antibiotiques.

Infectés d'abord très jeunes par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, les patients finissent, en grandissant, par être colonisés sur le long terme par ce pathogène. La présence de cette bactérie est associée avec un moins bon pronostic vital et un déclin plus rapide de la fonction respiratoire (Emerson *et al.* 2002). Différents traitements, en inhalé ou par voie intraveineuse, sont disponibles afin de combattre la bactérie et de retarder sa colonisation. La tobramycine, la colistine et l'aztréonam font partie des antibiotiques les plus utilisés en cas d'infection chronique à *Pseudomonas aeruginosa* (Castellani *et al.* 2018). L'azithromycine est également recommandée puisqu'une amélioration de la fonction respiratoire et une diminution des exacerbations pulmonaires ont été observées chez les patients traités par cet antibiotique (Southern *et al.* 2012) (Figure 13).

iv. TRAITEMENTS ANTI-INFLAMMATOIRES

L'inflammation chez les patients atteints de mucoviscidose est précoce, persistante et excessive en réponse à la charge bactérienne et est responsable d'une dégradation progressive de l'épithélium pulmonaire. Les traitements anti-inflammatoires sont donc une partie importante du traitement des patients. Ils peuvent être séparés en deux sous-groupes, les traitements non stéroïdiens et les traitements stéroïdiens.

Parmi les traitements non stéroïdiens, on trouve l'ibuprofène, dont le spectre d'action est large. Konstan et ses collaborateurs réalisent en 1995 une étude randomisée en double aveugle d'administration de deux doses par jour d'ibuprofène ou d'un placebo pendant quatre ans chez des patients atteints de mucoviscidose. Ils sont les premiers à montrer un ralentissement du déclin de la fonction respiratoire, dont le plus important a été observé chez les jeunes sujets (Konstan *et al.* 1995). Une étude réalisée en 2007 sur une cohorte plus nombreuse confirme ces résultats (Lands *et al.* 2007). Ces études soulignent pourtant l'apparition d'effets secondaires comme des douleurs abdominales, des saignements nasaux ou des cas de conjonctivite. Il semblerait également que l'ibuprofène puisse avoir des effets pro-inflammatoires à faible dose en favorisant la migration des neutrophiles (Konstan *et al.* 2003). Une étude multicentrique récente conclut finalement que l'utilisation d'ibuprofène peut être recommandée mais nécessite un suivi pharmacocinétique de la molécule dans l'organisme, afin d'en diminuer les effets secondaires et d'en favoriser les effets

anti-inflammatoires (Lands et Stanojevic 2016). Ce suivi rigoureux étant difficile à mettre en place en pratique, la prescription d'ibuprofène reste rare.

D'autres molécules non stéroïdiennes utilisées à d'autres fins ont montré de manière inattendue des effets anti-inflammatoires. C'est le cas de la dornase alpha, qui, en plus de son action mucolytique, permet de réduire la sécrétion de marqueurs de l'inflammation comme l'IL-8 et la métalloprotéinase 9 dans les lavages broncho-alvéolaires (Konstan et Ratjen 2012). Certains antibiotiques ont également des effets anti-inflammatoires. La tobramycine est par exemple capable de réduire le nombre de neutrophiles dans le sang et dans les lavages broncho-alvéolaires, prise en inhalé ou par voie systémique (Ramsey *et al.* 1993, Noah *et al.* 2010). L'azithromycine est également régulièrement évoquée bien que ses propriétés anti-inflammatoires semblent être dues à une modulation des efflux chlorures plutôt qu'à une action directe sur la réponse inflammatoire (Saint-Criq *et al.* 2011, Saint-Criq *et al.* 2012). Ces antibiotiques ne pouvant cependant être utilisés en continu, d'autres traitements anti-inflammatoires ont été développés. Une liste exhaustive de ces traitements est disponible ci-dessous dans le Tableau 2.

	Molécules	Références
Anti-inflammatoires à large spectre	Corticostéroïdes	Eigen <i>et al.</i> 1995
	Ibuprofène*	Konstan <i>et al.</i> 1995
Mucolytique	Dornase alpha*	Konstan et Ratjen 2012
Antibiotiques aux propriétés anti-inflammatoires	Tobramycine	Noah <i>et al.</i> 2010
	Azythromycine*	Ratjen <i>et al.</i> 2012
	Anticorps anti-PcrV	Milla <i>et al.</i> 2014
Modulateurs de la signalisation intracellulaire	IL-10	Mueller <i>et al.</i> 2009
	Interféron- γ	Moss <i>et al.</i> 2005
Anti-oxydants	N-acétyl cystéine	Tam <i>et al.</i> 2013
Inhibiteurs de l'influx de neutrophiles	Anti-IL-8	Mackerness <i>et al.</i> 2008
	Anti-IL-17	Hsu <i>et al.</i> 2016
	Ibuprofène*	Konstan <i>et al.</i> 2003
Anti-protéases	AAT recombinante	Griese <i>et al.</i> 2007
	Inhibiteur d'élastase des neutrophiles	Cooley <i>et al.</i> 2011

Tableau 2 | Traitements anti-inflammatoires évalués ou utilisés chez les patients atteints de mucoviscidose (adapté à partir de Cantin *et al.* 2015). * Médicaments recommandés par la CFF (*Cystic Fibrosis Foundation*)

Les corticostéroïdes sont des molécules anti-inflammatoires puissantes mais non spécifiques. Elles présentent des effets différents en fonction du mode d'administration (par inhalation ou par voie orale ou systémique). L'inhalation a été rapidement proposée aux patients atteints de mucoviscidose afin de maximiser l'efficacité du traitement au niveau pulmonaire et d'en diminuer les

effets secondaires. Une étude néerlandaise menée en 1995 montre pour la première fois que la corticothérapie en inhalée n'améliore cependant pas la fonction pulmonaire. Les patients sont traités par budesonide, un glucocorticoïde de synthèse, deux fois par jour pendant six semaines. Ils ne présentent aucune différence avec les contrôles (placebo) du volume expiratoire maximal en une seconde (VEMS) ou de la capacité vitale forcée (CVF), deux paramètres reflétant le statut de la fonction pulmonaire (van Haren *et al.* 1995). Une étude anglaise publiée peu de temps après montre les mêmes résultats chez des patients traités pendant six mois par propionate de fluticasone (Balfour-Lynn *et al.* 1997). Aucune étude suivante ne réussit à montrer un effet des corticostéroïdes inhalés sur le VEMS ou la CVF (Balfour-Lynn *et al.* 2006, De Boeck *et al.* 2007). Certaines études mesurent également des paramètres inflammatoires sans montrer d'effet du traitement dessus. La concentration en IL-8 ou en TNF- α (*tumor necrosis factor α*) ainsi que le nombre de neutrophiles dans les sputums semblent inchangés par le traitement (Balfour-Lynn *et al.* 1997, Dauletbaev *et al.* 1999). Malgré l'absence d'effet sur la fonction respiratoire et les paramètres inflammatoires, des effets secondaires peuvent apparaître comme un retard de croissance ou une dysphonie (Bisgaard *et al.* 1997, De Boeck *et al.* 2007). Une revue publiée dans *The Cochrane Library* explique que les données actuelles ne permettent pas de recommander l'utilisation en routine des corticostéroïdes inhalés chez les patients atteints de mucoviscidose (Balfour-Lynn et Welch 2016).

Les corticostéroïdes pris par voie orale ou systémique semblent être plus efficaces. Auerbach et ses collègues montrent en 1985 une augmentation du VEMS chez les patients traités avec de la prednisone à 2 mg/kg par voie orale un jour sur deux pendant quatre ans, comparés aux contrôles (placebo) (103 % *versus* 87 %) (Auerbach *et al.* 1985). Eigen et ses collaborateurs réalisent la même étude en ajoutant un troisième groupe constitué de patients traités avec 1 mg/kg de prednisone. Au bout des quatre ans d'étude, seuls les patients issus de ce groupe montrent une augmentation du pourcentage de VEMS prédit par rapport aux placebos (Eigen *et al.* 1995). Ces deux études montrent également une stabilisation de la concentration des immunoglobulines G chez les patients traités, comparés aux placebos. Elles se sont de plus intéressées à la mesure du poids et de la taille des patients traités. L'étude d'Auerbach montre que la taille des patients traités est plus élevée que celle des non-traités. Le suivi à 10 ans de 30 des 34 patients de cette étude a cependant révélé un retard de croissance chez les patients ayant été traités au cours de l'étude d'Auerbach (Donati 1990). Ce retard de croissance a également été mis en évidence par Eigen, qui rapporte l'apparition d'autres effets secondaires tels que des cas de diabète, d'hyperglycémie et de cataracte. La dernière parution d'une étude multicentrique sur l'utilisation des corticostéroïdes oraux conclut qu'ils peuvent être prescrits à une dose maximale de 1 mg/kg un jour sur deux pendant deux ans. Une attention

particulière devra être portée à l'apparition d'effets secondaires sur le métabolisme du glucose et la croissance osseuse (Cheng *et al.* 2015).

Capables d'agir sur de nombreuses cellules du corps, les glucocorticoïdes sont des molécules aux actions pléiotropes, agissant notamment sur le métabolisme, l'immunité et le développement. Les effets secondaires provoqués par l'administration de ces molécules semblent être liés à ces actions non spécifiques et non ciblées par un traitement à visée anti-inflammatoire. Ces effets secondaires pourraient être diminués par un contrôle plus fin de leurs actions, notamment par l'utilisation de leur protéine de transport, la *corticosteroid-binding globulin* (CBG).

II. LA CORTICOSTEROID-BINDING GLOBULIN (CBG)

La *corticosteroid-binding globulin* (CBG) a été découverte entre 1956 et 1959 par trois groupes de chercheurs de manière indépendante. Bush découvre après des études de dialyse à l'équilibre sur des plasmas qu'il existe deux protéines liant le cortisol dans le plasma : une première de haute capacité mais de faible affinité (l'albumine) et une deuxième de faible capacité mais de haute affinité pour le cortisol (la CBG) (Bush 1957). Daughaday retrouve les mêmes résultats et propose d'appeler la protéine de haute affinité, *corticosteroid-binding globulin* (Daughaday 1958). Slaunwhite et Sandberg décrivent également cette protéine et l'identifient comme une α -globuline (Slaunwhite et Sandberg 1959). Ils proposent d'appeler cette protéine transcortine. Ce nom lui a été préféré pendant de nombreuses années ensuite pour finalement être délaissé au profit de *corticosteroid-binding globulin*, toujours employé de nos jours.

1. LA FAMILLE DES SERPINES

La CBG est une protéine appartenant à la famille des SERPIN (serpines ou *serine protease inhibitors*). Cette famille constitue le plus large regroupement de protéines distribuées sur l'ensemble du vivant. Ainsi, plus de 1 500 serpines ont été découvertes chez les animaux, les virus, les plantes, les bactéries et les archées (Law *et al.* 2006).

D'abord nommées par leur fonction ou leur localisation tissulaire, ces protéines sont ensuite regroupées sous le nom de serpines par un comité en 2001 (Silverman *et al.* 2001). Ce terme est déjà employé avant la mise en place officielle de cette nomenclature et avait été choisi pour désigner la fonction inhibitrice de protéases à sérine de ces protéines. Des études phylogénétiques ont permis de regrouper les serpines selon des clades désignés par des lettres (Irving *et al.* 2000, Heit *et al.* 2013). On découvre rapidement que certaines serpines sont des inhibiteurs de caspases ou n'ont pas de fonction inhibitrice. C'est le cas de la CBG qui n'a qu'un rôle de transport et d'adressage. La nomenclature est cependant conservée pour faciliter les recherches. 36 membres ont été identifiés chez l'Homme et ont été répartis du clade A au clade I. La CBG appartient au clade A et en est le sixième membre : on peut donc également la désigner par SERPINA6.

2. LE GENE *SERPINA6*

La CBG est codée par le gène *SERPINA6* qui se situe au niveau du bras long du chromosome 14, en position 14q32.1. Il est constitué d'environ 19 kb et contient 5 exons (Figure 14). Il sera à l'origine de la synthèse d'un ARNm d'environ 1 400 nucléotides qui sera ensuite traduit en protéine CBG.

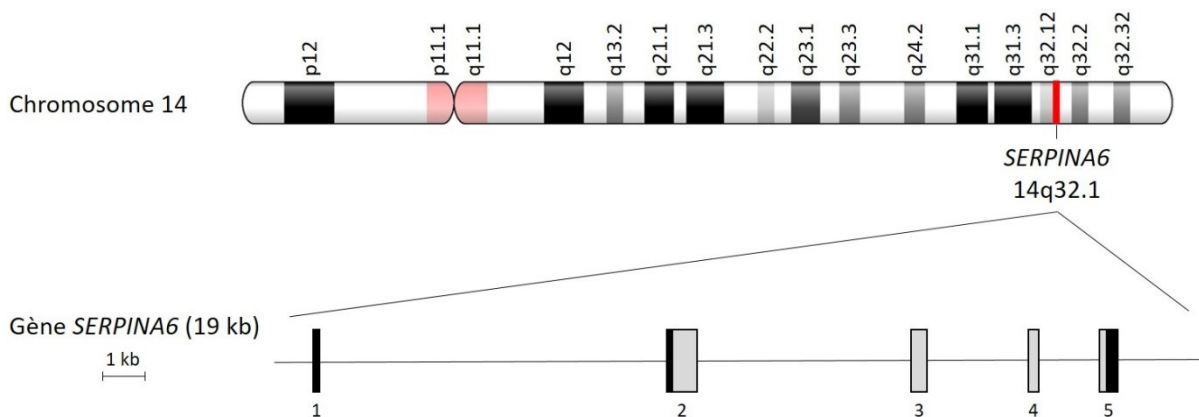


Figure 14 | Du chromosome 14 au gène *SERPINA6*. Représentation du chromosome 14 humain (en haut) et du gène *SERPINA6* (en bas) : en noir, les régions non traduites des exons (schéma du gène adapté à partir d'Underhill et Hammond 1989).

Le gène *SERPINA6* partage environ 40 % d'homologie de sa séquence avec le gène *SERPINA1* (α 1-antitrypsine ou AAT) et le gène *SERPINA3* (α 1-antichymotrypsine). Cette relation étroite s'étend même jusqu'à leur organisation. Le gène *SERPINA6* est en effet compris dans un cluster d'environ 370 kb de 10 gènes et un pseudogène de serpinines du clade A. Plus précisément, il est inclus au sein d'un locus de 90 kb contenant le gène *SERPINA1*, le pseudogène *SERPINA2* et le gène *SERPINA10* (*protein Z dependent proteinase inhibitor*) (Namciu *et al.* 2004). On suppose ainsi que ces gènes ont évolué récemment à partir d'une duplication d'un gène ancestral commun (Seralini *et al.* 1990).

3. LA PROTEINE CBG

a. STRUCTURE DE LA CBG

La CBG contient 3 feuillets β (A, B et C) et 10 hélices α (nommées de A à J). Comme les autres membres de la famille des serpinines, la CBG possède une boucle appelée *reactive center loop* (RCL), qui se situe au-dessus de la protéine. Cette région peut être coupée par différentes protéases du fait de son exposition. La coupure permet alors de faire passer la protéine d'un état dit stressé (S) à un état relâché (R) plus thermostable (Pemberton *et al.* 1988) (Figure 15).

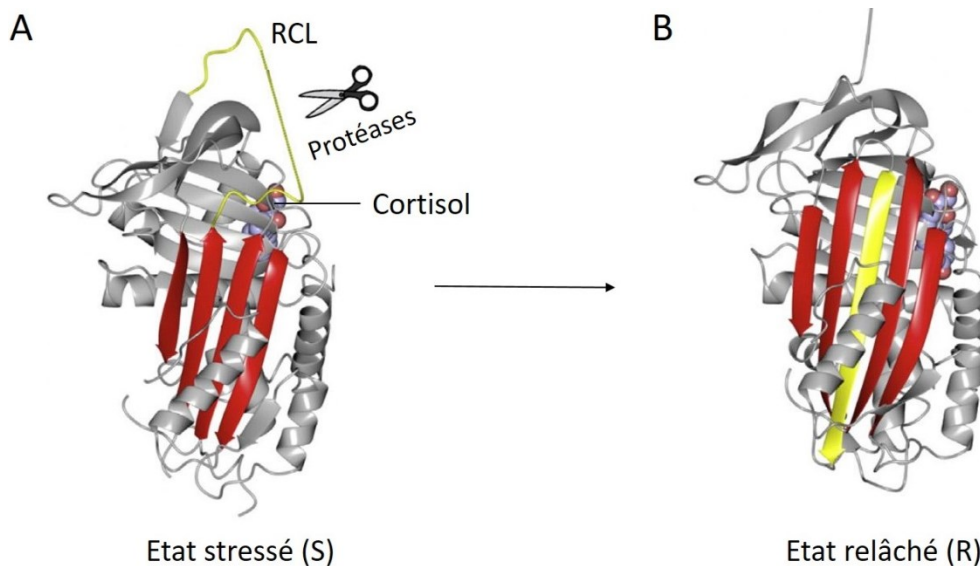


Figure 15 | Structure de la protéine CBG. Représentation de la CBG liant le cortisol sous sa forme S (A) et sous sa forme R après clivage du RCL (B). Le RCL est représenté en jaune et le feuillet β A en rouge (adaptée à partir d'Henley *et al.* 2016).

La CBG est une protéine constituée de 405 acides aminés pour un poids moléculaire de 45 kDa. Avant sa sécrétion dans le plasma, ses 22 premiers acides aminés, qui représentent le signal peptidique d'exportation cellulaire, sont excisés. Ainsi, la CBG circulante est composée de 383 acides aminés pour un poids théorique de 42 kDa (Hammond *et al.* 1987). La CBG étant cependant glycosylée, elle est généralement détectée avec un poids moléculaire compris entre 60 et 70 kDa. L'étude des glucides liés à la CBG révèle une variation des types de glucides en fonction des sites, contribuant ainsi à l'hétérogénéité du poids moléculaire apparent de la protéine (Sumer-Bayraktar *et al.* 2011).

La CBG comporte 6 asparagines correspondant à 6 sites de N-glycosylation : Asn⁹, Asn⁷⁴, Asn¹⁵⁴, Asn²³⁸, Asn³⁰⁸ et Asn³⁴⁷ (la position des asparagines est indiquée sans le peptide signal). Ces glycosylations semblent avoir un rôle important sur la fonction de la protéine. La glycosylation en position 238 a par exemple été montrée comme nécessaire à la CBG pour assurer sa liaison aux corticostéroïdes (Avvakumov *et al.* 1993, Avvakumov et Hammond 1994). La glycosylation sur ce site n'interagit pas avec le ligand de la CBG mais permet un repliement adéquat de cette dernière afin de permettre cette liaison (Avvakumov et Hammond 1994). Des variations de glycosylation de la protéine sont également à l'origine de variations d'affinité de liaison aux corticostéroïdes et peuvent la protéger contre des protéolyse (Simard *et al.* 2018).

b. EXPRESSION ET LOCALISATION DE LA CBG

Après avoir démontré l'existence de la CBG dans les années 1950 à partir de plasmas, la recherche autour de la CBG s'est poursuivie par une purification de la protéine et une étude de sa distribution dans la population générale. La CBG sera retrouvée dans tous les plasmas des sujets examinés parmi une cohorte de 10 124 patients (Rosner *et al.* 1973). La CBG semble donc être une protéine présente chez tous les individus de façon constitutive au niveau plasmatique. Notons que le renouvellement plasmatique de la protéine est lent puisque sa demi-vie est de 5 à 6 jours (Sandberg *et al.* 1964).

L'origine de sa synthèse chez l'homme n'a été déterminée que bien plus tard, en 1984. La CBG étant glycosylée et sécrétée dans le plasma, on supposait déjà qu'elle puisse être synthétisée par le foie. Des études réalisées sur des rats montrent que la protéine est retrouvée au niveau du foie et qu'elle est sécrétée ensuite dans le plasma (Weiser *et al.* 1979). La traduction en présence de méthionine radiomarquée des ARNm issus de foies de rats dans des modèles *in vitro* permet également de retrouver la CBG dans les milieux, confirmant sa synthèse hépatique (Wolf *et al.* 1981). Ce sont Kahn et ses collaborateurs qui démontreront qu'elle est synthétisée par les hépatocytes dans un modèle *in vitro* humain. Les chercheurs ont purifié la protéine à partir de milieux de culture d'une lignée issue d'un cancer hépatocellulaire, les HepG2, et ont réalisé des études de liaison de cortisol radiomarqué afin d'appuyer leur conclusion (Khan *et al.* 1984).

Des sites secondaires de synthèse ont également été trouvés mais la production de CBG semble y être plus faible (Figure 16). Elle est ainsi produite au niveau des reins, des poumons, du muscle cardiaque, du cerveau, de l'endomètre et des testicules (Hammond *et al.* 1987, Misao *et al.* 1994, Caldwell et Jirikowski 2014, Schafer *et al.* 2015). Des études sur des animaux (hamster, rat ou souris) ont montré la synthèse de CBG au niveau du pancréas, du tube digestif et du tissu adipeux, sans que ces résultats aient été confirmés chez l'homme (Lin *et al.* 1990, Scrocchi *et al.* 1993, del Mar Grasa *et al.* 2001) (Figure 16).

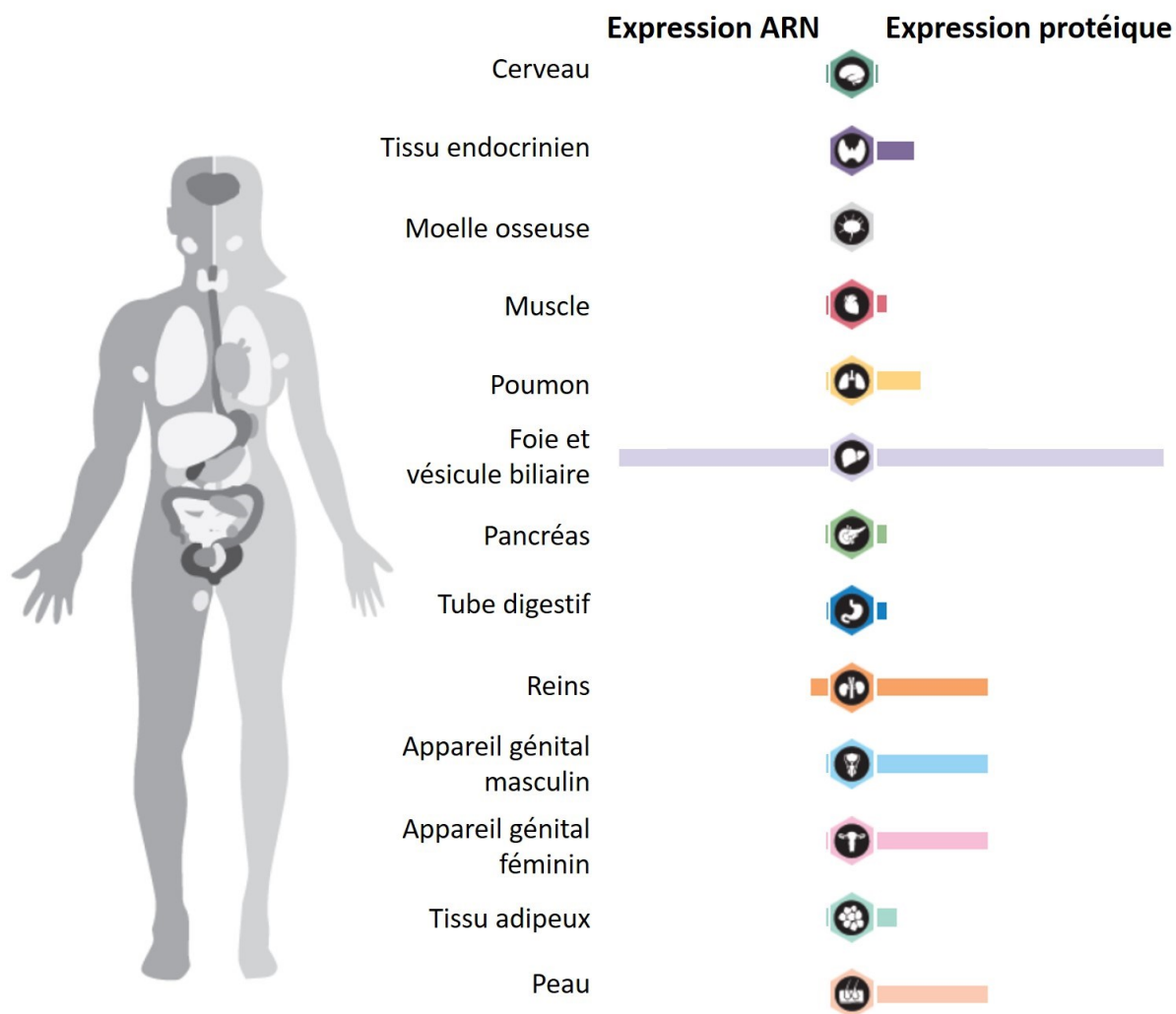


Figure 16 | Niveaux d'expression de la CBG en ARN et en protéine dans différents tissus (adaptée à partir de Proteinatlas.org).

Il est à noter que la CBG a également été retrouvée dans certains fluides corporels humains tels que la salive, le lait et l'urine (Murphy 1967, Rosner *et al.* 1976, Hammond et Langley 1986). Enfin, et de façon intéressante, la CBG a été détectée dans des lavages broncho-alvéolaires en très faible quantité, sans que l'on sache s'il s'agissait de la CBG pulmonaire libérée au niveau apical ou celle circulante qui aurait diffusé à travers l'épithélium (Loric *et al.* 1989).

4. FONCTIONS DE LA CBG

a. LA CBG REGULE LA BIODISPONIBILITE DE SES LIGANDS

La CBG étant un transporteur d'hormones, elle a longtemps été considérée sous le prisme de l'hypothèse de l'hormone libre. Cette hypothèse affirme que la seule part biologiquement active de

l'hormone est celle qui est libre, à savoir non liée à une protéine dans le plasma (Mendel 1989). Ainsi, la concentration d'une hormone dans un tissu est déterminée uniquement par sa concentration plasmatique libre plutôt que liée à sa protéine de transport. Cette hypothèse permet notamment d'expliquer au mieux les manifestations cliniques constatées chez les patients souffrant d'un déficit ou d'un excès d'hormones.

Selon cette hypothèse, la principale fonction de la CBG serait de réguler la biodisponibilité et la clairance métabolique des glucocorticoïdes. Une étude clinique a montré que les patients présentant un taux élevé de CBG plasmatique éliminaient plus lentement le cortisol radiomarqué injecté que ceux présentant un taux plus faible (Bright 1995). La CBG permet donc d'augmenter la demi-vie du cortisol plasmatique. Cela a été confirmé chez des patients présentant une mutation de la CBG la rendant incapable de lier ses ligands. Ces patients avaient une clairance métabolique augmentée et une demi-vie du cortisol diminuée (Perogamvros *et al.* 2011). La CBG peut donc être également considérée comme un réservoir à glucocorticoïdes.

L'hypothèse de l'hormone libre reste cependant trop simpliste. Différents paramètres peuvent jouer sur la distribution de l'hormone au niveau tissulaire. Ainsi, la localisation de la cellule ciblée, la perméabilité endothéliale, la composition de la matrice extracellulaire et la juxtaposition de différents types cellulaires au sein d'un même tissu peuvent influencer l'accessibilité d'une cellule à une hormone donnée (Hammond 2016). Le taux de cortisol libre n'est donc pas le seul paramètre déterminant sa concentration tissulaire. La CBG pourrait avoir un rôle actif dans la détermination de cette concentration, notamment par le biais de sa fonction d'adressage.

b. LA CBG TRANSPORTE ET ADRESSE SES LIGANDS

La CBG est la protéine qui lie les glucocorticoïdes, principalement le cortisol, dans le plasma avec une haute affinité. La CBG circule en faible quantité (30 à 52 pg/mL) dans le plasma comparé à l'albumine (40 g/L). Sa forte affinité pour le cortisol lui permet pourtant de jouer un rôle important dans la détermination de la concentration plasmatique de cortisol. La CBG lie ainsi de 80 % à 90 % du cortisol circulant, tandis que de 7 % à 15 % se lient à l'albumine et les moins de 5 % restants sont libres (Lewis *et al.* 2005). Il a également été montré que la CBG était capable de lier la progestérone lorsque la concentration de cette dernière était très élevée, comme en cas de grossesse (Benassayag *et al.* 2001). Dans cet unique contexte, l'équilibre de liaison avec le cortisol est déplacé vers la progestérone.

La CBG lie le cortisol au niveau d'une poche superficielle située entre le feuillet β B et l'hélice A et H. Comme les autres serpinines, la CBG établit une liaison covalente avec son ligand, ce qui stabilise la CBG dans sa conformation S et permet d'exposer son RCL. Lorsqu'il est clivé par l'élastase des neutrophiles entre la Val³⁴⁴ et la Thr³⁴⁵, un changement de conformation de la CBG se produit. Le segment coupé de RCL est alors inséré dans le feuillet β A (Figure 15), la protéine est stabilisée dans sa conformation R et perd son affinité pour le cortisol (Pemberton *et al.* 1988). 10 fois moins affine pour le cortisol (passage de $K_a = 1,4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ à $K_a = 1,6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$), la CBG libère le cortisol. Plus récemment, il a été montré que l'élastase de *P. aeruginosa* (LasB) pouvait également cliver la CBG sur un site distant de quelques acides aminés du site de l'élastase des neutrophiles (Simard *et al.* 2014). LasB est libérée par la bactérie sur les sites qu'elle infecte, tandis que les neutrophiles libèrent de l'élastase au niveau de zones inflammatoires. On considère donc que, en plus de son rôle de transporteur, la CBG est capable d'adresser spécifiquement les glucocorticoïdes sur le site de l'inflammation et de l'infection (Figure 17).

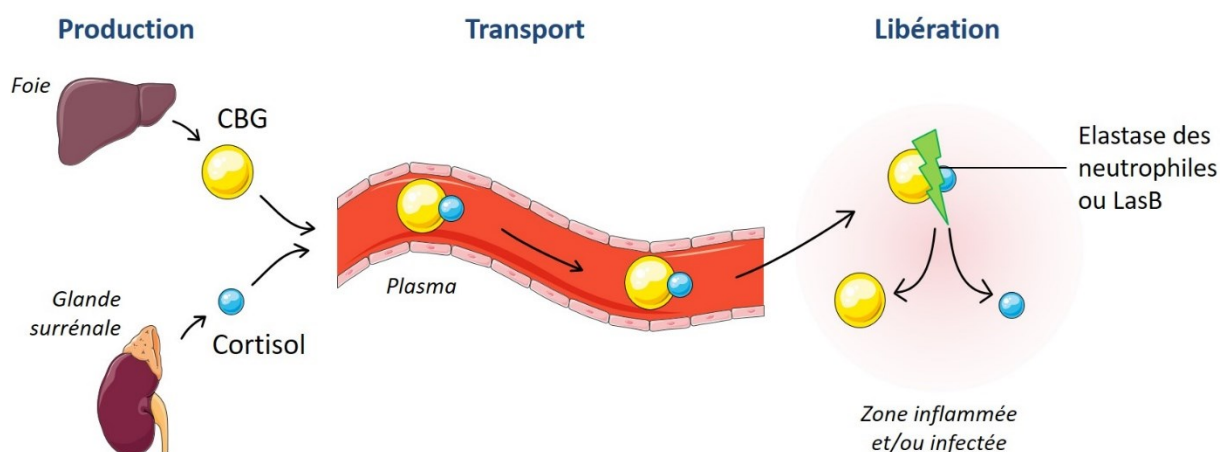


Figure 17 | La CBG transporte et adresse les glucocorticoïdes sur le site de l'inflammation et de l'infection. Le cortisol produit au niveau des glandes surrénales est libéré dans le plasma. La CBG produite par le foie est sécrétée dans le plasma où elle lie le cortisol. Elle le transporte ensuite jusqu'à un site inflammé ou infecté par *P. aeruginosa*. A ce niveau, la CBG est clivée par l'élastase des neutrophiles ou LasB, ce qui permet la libération du cortisol et lui permet d'agir.

La liaison de la CBG avec le cortisol est également dépendante de la température. Plusieurs études ont montré une diminution d'affinité entre ces deux molécules lorsque la température passe de 37 °C à 42 °C (Cameron *et al.* 2010, Henley *et al.* 2016). Cela est concordant avec le rôle d'adressage de la CBG. Les patients présentant une inflammation ou de la fièvre vont avoir une augmentation de leur température corporelle, ce qui leur permettra de libérer plus de cortisol et de résoudre l'inflammation au mieux.

Il est à noter qu'il a été montré que la chymotrypsine, une protéase sécrétée par le pancréas, est capable de cliver le RCL de la CBG (Lewis et Elder 2014). La découverte de ce site de coupure est à ce jour toujours incomprise et sa signification physiologique reste à élucider.

C. LES CBG EXTRAHEPATIQUES CONTROLERAIENT L'ACCESSIBILITE DES LIGANDS A LEURS RECEPTEURS

En plus du foie, la CBG est exprimée par différents organes comme le rein, le poumon ou les testicules (Hammond *et al.* 1987). Peu d'études se sont intéressées au rôle de ces CBG extrahépatiques. Il est communément supposé que ces CBG ne participent pas au taux de CBG plasmatique car elles seraient intracellulaires. Malgré leur faible niveau d'expression, ces CBG pourraient être régulées finement au niveau de la cellule et jouer un rôle local important. Le glucocorticoïde libéré à partir du plasma rentrerait dans la cellule et, à ce niveau, lierait la CBG intracellulaire. Le glucocorticoïde ainsi bloqué ne pourrait plus lier son récepteur, médiateur principal de ses actions intracellulaires, et ne pourrait plus agir (Figure 18).

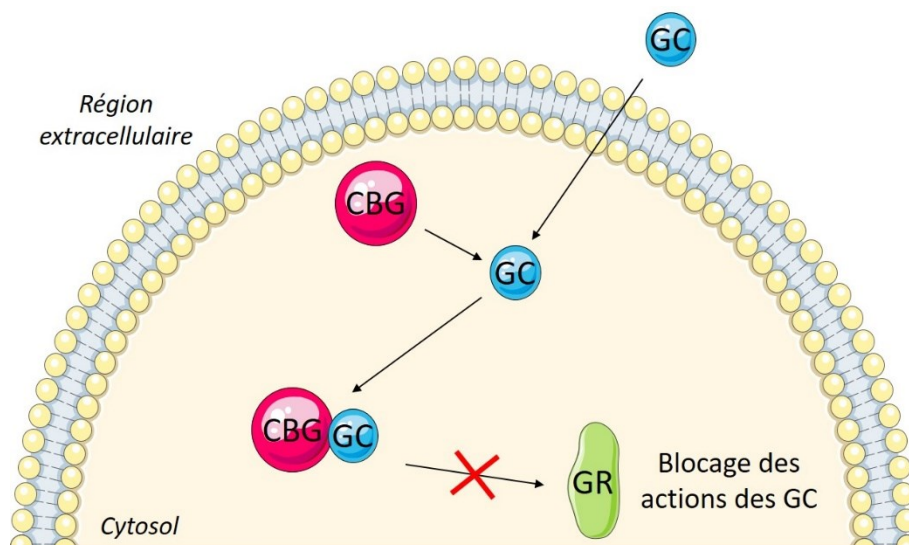


Figure 18 | La CBG intracellulaire bloque l'action des glucocorticoïdes. Le glucocorticoïde (GC) entre dans la cellule et se lie à la CBG intracellulaire. Cette liaison l'empêche de se lier à son récepteur (GR : récepteur des glucocorticoïdes) et l'empêche ainsi d'agir dans la cellule.

Ce rôle hypothétique des CBG extrahépatiques est soutenu par la régulation, mieux connue, d'autres hormones par leur protéine de liaison. C'est le cas de l'IGF (*insulin-like growth factor*) qui est transportée dans les fluides biologiques par des protéines appelées IGFBP (*IGF binding proteins*). Elles sont capables de réguler la biodisponibilité de l'IGF mais également de moduler son activité en

la liant localement, au niveau des tissus cibles (Duan et Xu 2005). La CBG pourrait permettre une régulation tout aussi fine des glucocorticoïdes.

En fonction des tissus exprimant ces CBG, la limitation des actions intracellulaires des glucocorticoïdes peut avoir de plus larges conséquences. Au niveau du cerveau, la CBG est exprimée par de nombreux types cellulaires dont les astrocytes (Pusch *et al.* 2009). Les glucocorticoïdes sont capables d'induire un remodelage de ces cellules et éventuellement leur mort. La CBG produite localement pourrait donc servir de tampon afin de protéger la cellule des effets délétères de ces molécules. La CBG semble également avoir un rôle sur le comportement et la mémoire, notamment en réponse au stress (Minni *et al.* 2012). L'implication de la CBG au niveau cérébral sur cette réaction émotionnelle reste à déterminer, mais elle pourrait moduler et contrôler cette réponse au stress. Au niveau des poumons, la CBG pourrait influencer la maturation fœtale de ces organes, notamment au niveau alvéolaire. La différenciation des cellules épithéliales alvéolaires et le contrôle de la prolifération cellulaire sont en effet dépendants de l'action des glucocorticoïdes (Bird *et al.* 2015). La CBG pulmonaire pourrait donc également jouer un rôle dans le développement et la maturation pulmonaire. Les rôles supposés de ces productions locales restent cependant encore à confirmer afin d'en comprendre pleinement la pertinence biologique.

d. LA CBG DECLENCHERAIT DES CASCADES DE SIGNALISATIONS INTRACELLULAIRES

Au début des années 1980, le lieu de synthèse principal de la CBG est établi au niveau du foie. Plusieurs groupes montrent ensuite que la protéine est détectée dans d'autres tissus, au sein même des cellules, sans que l'on sache s'il s'agit d'une production locale ou non. Une hypothèse est alors émise quant à une potentielle internalisation de la CBG circulante par des cellules cibles. Cette hypothèse repose sur l'existence d'un récepteur capable de lier la CBG afin de permettre son endocytose (Figure 19).

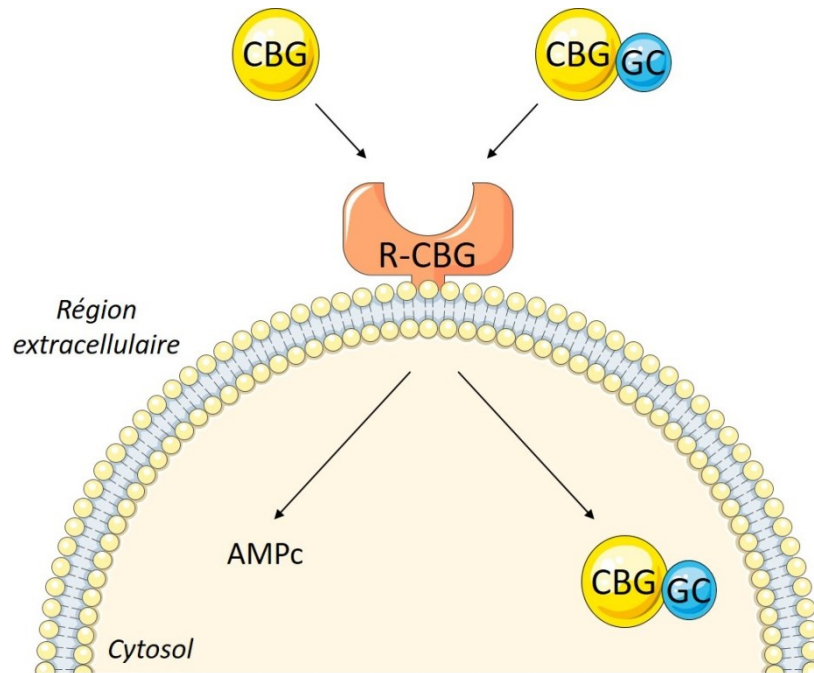


Figure 19 | Conséquences de la liaison de la CBG à son récepteur membranaire. La CBG seule ou liée à son ligand (GC : glucocorticoïde) se lie à son récepteur (R-CBG : récepteur de la CBG). Cette liaison entraîne l'internalisation de la CBG et/ou l'augmentation d'AMPc.

En 1983, Strel'chyonok et Avvakumov sont les premiers à montrer la présence de ce récepteur au niveau de la membrane plasmique de cellules hépatiques humaines (Strel'chyonok et Avvakumov 1983). Hryb et ses collaborateurs confirment ce résultat sur des membranes de cellules issues de prostate humaine. Leur étude souligne la spécificité de la liaison du récepteur à la CBG puisque l'albumine ou la transferrine sont incapables de déplacer l'équilibre de liaison. Ils démontrent également que cette liaison varie en fonction du temps et de la température (Hryb *et al.* 1986). La présence de ce récepteur a également été mise en évidence au niveau de l'endomètre (Avvakumov *et al.* 1989). Il est à noter que les études *in vitro* montrent que seulement de 2 % à 5 % de la CBG se lierait à son récepteur (Hryb *et al.* 1986, Maitra *et al.* 1993).

La liaison de la CBG à son récepteur semble également être dépendante d'une liaison préalable de la CBG avec l'un de ses ligands (Figure 19). Les données de la littérature sont contradictoires à ce sujet. Strel'chyonok et Avvakumov montrent que la CBG ne se lie à son récepteur que si elle est déjà liée à un glucocorticoïde, tandis que Maitra et ses collègues observent que la liaison de la CBG à un glucocorticoïde l'empêche de se lier à son récepteur (Strel'chyonok et Avvakumov 1991, Maitra *et al.* 1993). La CBG étant thermosensible, ces différences peuvent s'expliquer par des différences de protocole, la première étude ayant été réalisée à 4 °C tandis que la seconde l'a été à 37 °C.

A ce jour, le récepteur de la CBG n'a toujours pas été caractérisé ou cloné chez l'homme. Seules des études *in vitro* ont montré son existence de manière indirecte et une caractérisation partielle a été réalisée chez le rat (Maitra *et al.* 1993). Les quelques études de ce récepteur ont pourtant mené à l'émergence de deux hypothèses sur son rôle. La première indique que la CBG, liée à son ligand, serait internalisée dans la cellule et permettrait ainsi un contrôle plus fin de la distribution de ses ligands dans ses tissus cibles. Cette hypothèse confère ainsi à la CBG un rôle actif dans l'adressage de ses ligands. La seconde hypothèse considère la CBG comme une pro-hormone avec une activité intrinsèque, la liaison à son récepteur permettant d'activer un second messager. Nakhla et ses collaborateurs démontrent, en effet, que la liaison de la CBG à la membrane plasmique entraîne une activation de l'adénylate cyclase et une augmentation d'AMPc dans la cellule (Nakhla *et al.* 1988). La CBG induirait ainsi des cascades de signalisations intracellulaires rapides et permettrait aux glucocorticoïdes d'agir rapidement de façon non transcriptionnelle (Figure 19).

5. VARIATIONS PHYSIOLOGIQUES DES NIVEAUX DE CBG

Comme nous l'avons vu précédemment, la CBG peut être considérée comme un réservoir à glucocorticoïdes, étant capable de réguler leur biodisponibilité et de faire augmenter leur demi-vie. Des variations du taux de CBG peuvent ainsi avoir des conséquences sur le taux plasmatique de glucocorticoïdes libres et donc sur l'efficacité de leurs actions, selon l'hypothèse de l'hormone libre. Ces variations peuvent être physiologiques, c'est ce que je décrirai dans cette partie, ou être la conséquence d'une altération pathologique, sujet que je développerai dans les parties suivantes.

a. DIMORPHISME SEXUEL

Divers facteurs peuvent moduler le taux de CBG plasmatique, comme le sexe. Peu d'études se sont intéressées à l'effet de ce facteur sur le taux plasmatique de CBG. Certaines études ne montrent aucune différence du taux plasmatique de CBG entre hommes et femmes (Moore *et al.* 1978, Dunn *et al.* 1981). Moore et ses collaborateurs démontrent en particulier que ce taux ne varie pas en fonction du sexe, et ce, quel que soit l'âge des patients considérés (Moore *et al.* 1978) (Tableau 3). D'autres études ont cependant montré, sur leur cohorte, une différence de concentration plasmatique de CBG entre hommes et femmes (Lewis *et al.* 2004, Fernandez-Real *et al.* 2005). Ces études montrent, par utilisation d'un ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) ou d'un RIA (*radioimmunoassay*), que la concentration en CBG est significativement plus élevée dans les plasmas issus des femmes que dans ceux des hommes (Tableau 3). Cette même différence a été

observée sur des modèles animaux, comme le rat ou la souris, chez lesquels le taux plasmatique ainsi que l'expression au niveau hépatique sont en moyenne deux fois plus élevées chez les femelles que chez les mâles (Jansson *et al.* 1989, Minni *et al.* 2014, Adams *et al.* 2015, Gulfo *et al.* 2016).

Hommes	Femmes sans contraception	Femmes avec contraception	Méthode de mesure	Références
15,5 µg/100 mL	16,0 µg/100 mL	-	Liaison avec un ligand radiomarqué	Moore <i>et al.</i> 1978
700 nM	700 nM	-	Liaison avec un ligand radiomarqué	Dunn <i>et al.</i> 1981
40,8 mg/dL	43,8 mg/dL	-	RIA	Fernandez-Real <i>et al.</i> 2005
594 nM	659 nM	726 nM	ELISA	Lewis <i>et al.</i> 2004
-	37 µg/mL	90 µg/mL	RIA	Dibbelt <i>et al.</i> 1991
-	49,0 mg/L	110,9 mg/L	RIA	Qureshi <i>et al.</i> 2007

Tableau 3 | Mesure de la CBG plasmatique moyenne chez les hommes et les femmes avec ou sans contraception.

Les œstrogènes semblent être responsables de cette différence. Moore et ses collaborateurs, qui ne voyaient aucune différence dans leur cohorte, expliquent, dans un deuxième article, qu'il existe un seuil d'œstrogènes de 0,3 mg au-delà duquel l'expression de CBG est augmentée de manière dose dépendante (Moore *et al.* 1978). Quatre groupes de femmes ménopausées ont reçu des œstrogènes à quatre doses différentes (de 0,3 mg à 2,5 mg). Le dernier groupe a présenté une augmentation significative de CBG de 63 %. Cette augmentation a également été constatée chez les femmes prenant un contraceptif à base d'œstrogènes (Dibbelt *et al.* 1991, Wiegatz *et al.* 2003, Lewis *et al.* 2004, Qureshi *et al.* 2007) (Tableau 3). Cette différence est telle qu'elle pourrait permettre de mettre en évidence des différences de prise de contraceptif. Une étude a en effet réussi à montrer, par mesure de la CBG plasmatique, une différence entre les femmes qui prenaient leur contraceptif de manière régulière et celles qui ne le prenaient pas de façon irrégulière (Westhoff *et al.* 2013).

Les études *in vitro* des effets des œstrogènes sur l'expression de CBG sont pourtant contradictoires. Nader et ses collègues montrent que l'œstradiol n'a pas d'effet sur la sécrétion de CBG à partir de HepG2, une lignée de cellules hépatocytaires, mais que la réexpression du récepteur α aux œstrogènes permet de stimuler la libération de CBG (Nader *et al.* 2006). L'effet des œstrogènes serait donc médié par un mécanisme dépendant de ce récepteur. La même année, une étude montre au contraire que l'œstradiol fait diminuer la sécrétion de CBG dans des cellules HepG2 (Mihreshahi *et al.* 2006). Ces expériences, réalisées uniquement en duplicata, montrent une grande variabilité de réponses et une augmentation de la sécrétion totale des protéines. L'effet des œstrogènes *in vitro* reste donc à démontrer.

b. CAS DE LA GROSSESSE

La grossesse est un évènement qui implique de nombreux changements dans l'organisme, notamment au niveau endocrinien. Une augmentation de glucocorticoïdes libres est observée au niveau plasmatique pour la majorité des mammifères (Edwards et Boonstra 2018). C'est le cas de l'espèce humaine où cette augmentation est également accompagnée d'une augmentation plasmatique de CBG, chez la mère, dès la neuvième semaine d'aménorrhée (Rosenthal *et al.* 1969, Moore *et al.* 1978, Abou-Samra *et al.* 1984, Benassayag *et al.* 2001). Cette augmentation de CBG peut provenir d'une augmentation de sa synthèse hépatique, en réponse à l'augmentation d'œstrogènes, et/ou d'une synthèse de CBG par le placenta (Misao *et al.* 1999). L'augmentation de CBG, de cortisol total et libre se fait de manière progressive tout au long de la grossesse (Jung *et al.* 2011) (Figure 20A). Les taux de CBG et de cortisol chutent ensuite pour revenir à un niveau normal, environ deux à trois semaines après l'accouchement (Scott *et al.* 1990).

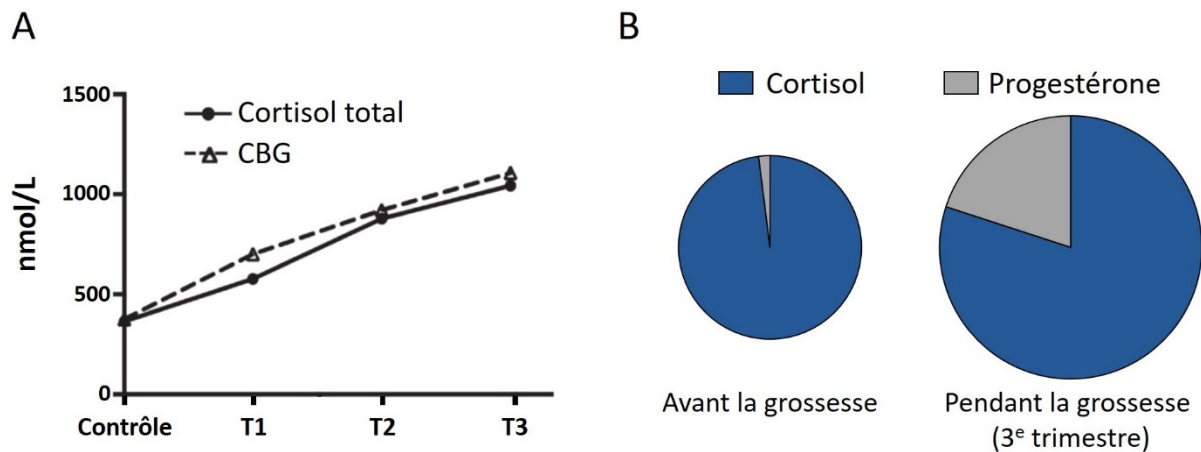


Figure 20 | Influence de la grossesse sur la CBG, le cortisol et la progestérone. **A)** Mesure du cortisol total et de la CBG plasmatique au cours de la grossesse (T1 : premier trimestre, T2 : deuxième trimestre et T3 : troisième trimestre) (adaptée à partir d'Edwards et Boonstra 2018). **B)** Occupation proportionnelle estimée de la CBG par le cortisol et la progestérone avant et pendant la grossesse (adaptée à partir d'Hammond 2016).

L'augmentation des niveaux de cortisol est impliquée dans divers processus dont l'accouchement, la réponse aux besoins énergétiques de la mère et le développement fœtal. La hausse de CBG semble être la conséquence de l'augmentation de cortisol libre. La CBG permettrait ainsi de réguler la hausse de cortisol et protégerait le fœtus d'une trop forte exposition aux glucocorticoïdes pendant la grossesse.

La grossesse s'accompagne également d'une augmentation de progestérone, un ligand de faible affinité pour la CBG. La hausse de son taux plasmatique est telle que la progestérone peut déplacer une partie des glucocorticoïdes de la CBG (Dunn *et al.* 1981) (Figure 20B). La CBG devient

alors un régulateur du niveau de progestérone et l'un de ses potentiels transporteurs au niveau de l'interface mère-fœtus (Benassayag *et al.* 2001).

Par ailleurs, des études ont montré qu'une forme de CBG circulante, retrouvée dans le plasma de femmes enceintes, possédait un motif de glycosylation différent (Mitchell *et al.* 2004). Cette forme spécifique, représentant 10 % de la CBG circulante, ne serait composée que d'oligosaccharides tri-antennaires, tandis que les autres formes sont un mélange d'oligosaccharides bi et tri-antennaires (Strel'chyonok *et al.* 1984). Cette CBG possède une forte affinité pour les membranes plasmiques du syncytiotrophoblaste, un tissu placentaire (Strel'chyonok et Avvakumov 1991). Cela indique un potentiel rôle d'adressage spécifique de la CBG afin de faciliter le transport mère-fœtus du cortisol lors de la grossesse.

C. VARIATIONS AU COURS DE LA VIE

Chez le fœtus, des variations de l'expression de la CBG ont été observées. Des études réalisées sur des rats ont permis de montrer que les niveaux de CBG chutent au niveau plasmatique et hépatique, avant et après la naissance, pour ensuite ré-augmenter progressivement pendant un mois (Smith et Hammond 1991, Elfahime *et al.* 1992). Ce taux faible a également été constaté au cours des premières semaines de vie de nouveau-nés (Scott et Wells 1995). Cette baisse de CBG à la fin de la grossesse permet une augmentation, chez le fœtus, des taux de glucocorticoïdes libres qui peuvent être nécessaires à la maturation d'organes, comme les poumons. La concentration plasmatique de CBG augmente ensuite progressivement pour atteindre la concentration d'un adulte au bout de 6 semaines (Scott et Wells 1995, Kari *et al.* 1996). Le taux de CBG plasmatique apparaît ensuite comme étant stable, sans qu'aucune variation n'ait été notée chez des sujets âgés (Wilkinson *et al.* 2001).

La CBG pourrait cependant subir des variations diurnes, mais les données de la littérature à ce sujet sont discordantes. Certaines études montrent que le taux de CBG ne varie pas au cours de la journée (De Moor *et al.* 1962), tandis que d'autres montrent que la capacité de liaison de la CBG pour le cortisol subit un rythme circadien, avec un taux plus faible la nuit (Figure 21). La chute de ce taux a cependant été mesurée à différents temps : entre 3 h et 9 h du matin (Doe *et al.* 1964), à 4 h du matin (Angeli *et al.* 1978, Frairia *et al.* 1988) ou à minuit (Deuschle *et al.* 1996). La raison de ces variations s'explique principalement par des différences de protocoles : la fréquence des prélèvements n'a pas toujours permis de déterminer l'heure exacte de la diminution du taux de CBG plasmatique, avec certaines études qui n'ont même pas pu réaliser des prélèvements sur la nuit.

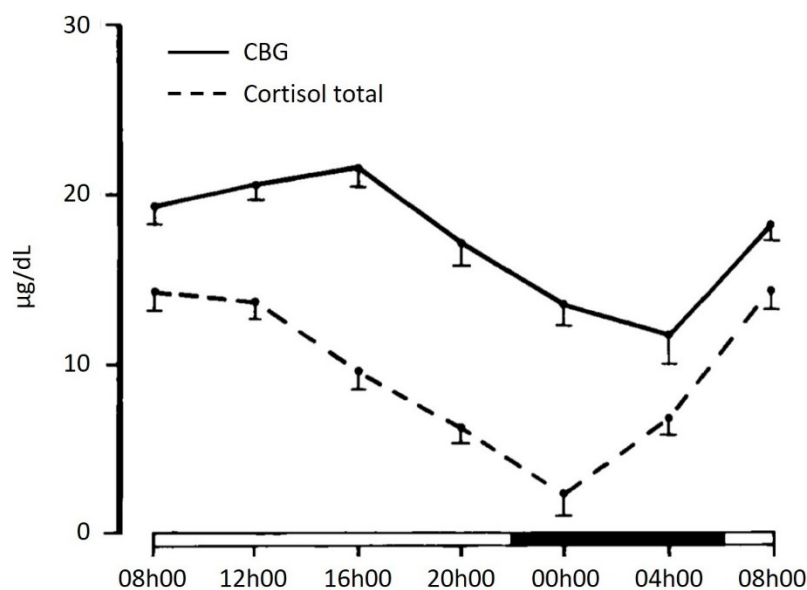


Figure 21 | Variations diurnes de la concentration plasmatique de CBG et de cortisol total (adaptée à partir de Frairia *et al.* 1988). Mesures réalisées sur des plasmas prélevés toutes les 4 h sur 20 sujets sains (moyenne \pm erreur-type).

Les glucocorticoïdes peuvent avoir un rôle dans ce cycle circadien, le taux de cortisol plasmatique étant lui-même sujet à des variations diurnes (Figure 21). La concentration plasmatique de cortisol libre est en effet faible la nuit puis augmente progressivement pour atteindre un pic le matin, vers 8 h, et diminue lentement au cours de la journée. Une étude réalisée sur des rats surrénalectomisés montre une perte des variations cycliques des taux de CBG plasmatique. Les rats ont ensuite reçu en continu pendant 24 h de la corticostérone, aucune variation du taux de CBG n'a été observée. L'administration discontinue de corticostéroïdes rétablit les variations de CBG où le taux de CBG diminue lorsque le taux de glucocorticoïdes diminue (Hsu et Kuhn 1988). L'effet des glucocorticoïdes sur la régulation plasmatique de la CBG reste cependant controversé, comme montré en cas de stress.

d. STRESS

Le stress est une réaction physiologique qui regroupe l'ensemble des réponses d'un organisme soumis à une pression extérieure. Un stress aigu induit, par exemple, une élévation des niveaux de glucocorticoïdes et pourrait donc provoquer également une variation du taux de CBG.

Différentes études sur des modèles animaux se sont intéressées à l'effet d'un stress sur la production de CBG ainsi qu'à la libération de corticostérone, principal glucocorticoïde retrouvé chez les rongeurs. Qian et ses collaborateurs montrent qu'en cas de stress intense (limitation physique ou nage forcée) la CBG est rapidement libérée au niveau plasmatique à partir des foies de rats dans les

15 premières minutes suivant l'action stressante (Qian *et al.* 2011). Les chercheurs ont ainsi observé un délai temporel entre l'augmentation de corticostérone totale et celle de corticostérone libre. La libération de CBG permet donc d'introduire un retard de réponse et de constituer ainsi une réserve de glucocorticoïdes. Les études menées sur un plus long terme indiquent que le taux de CBG est ensuite diminué, et ce, même au niveau hépatique (Verhoog *et al.* 2014). L'évènement stressant doit cependant être long, intense, et la diminution de CBG plasmatique ne sera observée que 6 h après le stress induit et jusqu'à 72 h après (Fleshner *et al.* 1995, Marti *et al.* 1997, Tannenbaum *et al.* 1997). Divers types d'évènements stressants sont également capables d'induire cette diminution. Tinnikov a exposé ses rats à des stress dits classiques (nage forcée ou anesthésie à l'éther) et à des stress métaboliques (jeûnes ou bains de glace) et a constaté une diminution de la CBG plasmatique quel que soit le type de stress, chez les femelles (Tinnikov 1999).

Cette chute de CBG a été imputée à l'action des glucocorticoïdes, molécules étant connues pour être augmentées dans les situations de stress. Bien que la régulation de la CBG par les glucocorticoïdes ait été largement étudiée dans la littérature, aucun consensus à ce sujet n'a émergé. L'administration de glucocorticoïdes synthétiques chez des patients adultes fait diminuer les niveaux plasmatiques de CBG, en particulier lorsqu'ils sont administrés à des doses pharmacologiques (Schlechte et Hamilton 1987). Cette diminution a également été constatée par injection d'un glucocorticoïde de synthèse (dexaméthasone) réalisée sur des rats, ainsi que par stimulation sur des lignées hépatocytaires humaines (HepG2) et murines (BWTG3) (Feldman *et al.* 1979, Smith et Hammond 1992, Verhoog *et al.* 2014). Pourtant une autre étude, réalisée également sur les HepG2, ne montre aucun effet de la dexaméthasone sur la synthèse hépatique de CBG, quelle que soit la dose utilisée (Emptoz-Bonneton *et al.* 1997). Jung et ses collaborateurs rapportent également que l'administration d'hydrocortisone sur des sujets sains, par voie orale ou en intraveineuse, ne fait pas varier les niveaux de CBG plasmatiques (Jung *et al.* 2014). De manière intéressante, une étude a montré que la dexaméthasone faisait augmenter la production de CBG pendant la vie fœtale, tandis qu'elle l'inhibe à l'âge adulte (Berdusco *et al.* 1993). Les études sur l'effet des glucocorticoïdes sur l'expression de CBG sont donc dépendantes du modèle, de l'âge, de la dose et du type de glucocorticoïde utilisé, les synthétiques étant plus efficaces à réguler la CBG.

La CBG semble de plus avoir un rôle clé dans la réponse de l'organisme au stress. L'utilisation de souris KO (*knock-out*) pour la *Cbg* en condition de stress a montré que la CBG est importante pour réguler l'accès du cerveau aux glucocorticoïdes libres. L'absence de CBG, induisant une diminution de corticostérone libre, permet de meilleures performances dans des exercices de mémoire en situation stressante et une réponse émotionnelle diminuée chez les femelles (Minni *et al.* 2012, Minni *et al.* 2014). La CBG influence donc les fonctions cérébrales qui pilotent les réponses au stress.

e. INFLAMMATION

Les études réalisées sur la régulation de la CBG en conditions inflammatoires tendent à montrer un effet inhibiteur de l'inflammation sur l'expression de CBG. En 1993, Bartalena et ses collaborateurs montrent en premier que l'IL-6, cytokine centrale dans l'inflammation, faisait diminuer la synthèse de CBG par les HepG2 (Bartalena *et al.* 1993). Les auteurs ont constaté une diminution de la sécrétion de CBG dans les milieux ainsi qu'une baisse en ARNm, de façon dose et temps dépendants. Ils n'observent cependant pas de variations dans la vitesse de transcription et émettent alors l'hypothèse que l'IL-6 ferait diminuer la stabilité de l'ARNm CBG. L'effet *in vitro* de l'IL-6 sur l'expression de CBG a été confirmé quelques années plus tard par une autre équipe qui montre une diminution de CBG pouvant aller de 30 % à 40 % (Emptoz-Bonneton *et al.* 1997) (Figure 22A).

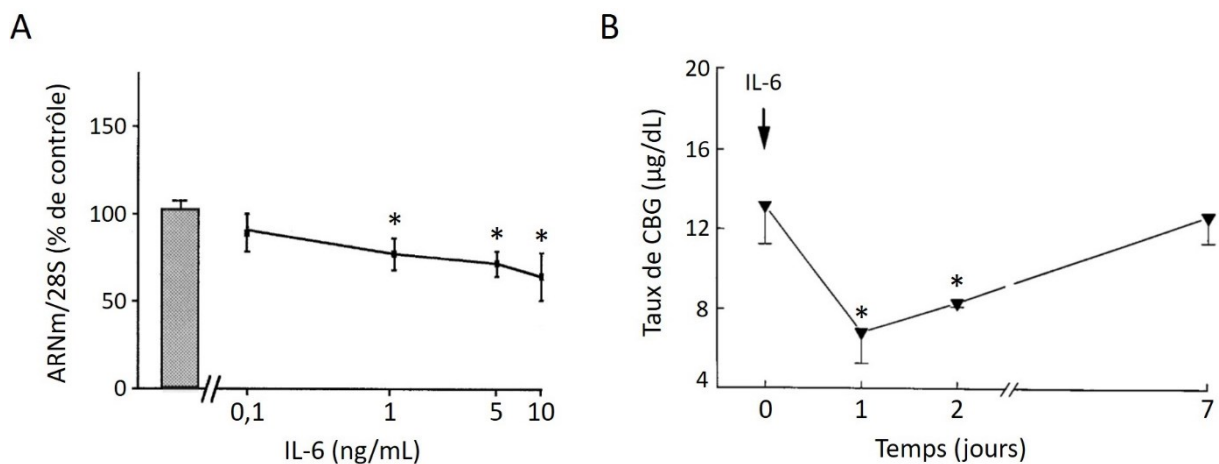


Figure 22 | Effet de l'IL-6 sur la synthèse et la sécrétion de CBG *in vitro* et *in vivo*. **A)** Mesure de l'ARNm de la CBG, comparée à celui du 28S, à partir de culture de cellules HepG2 stimulées pendant 48 h. Moyenne de 3 expériences indépendantes ± erreur-type ; * p < 0,05 vs. contrôle (d'après Emptoz-Bonneton *et al.* 1997). **B)** Mesure au cours du temps de la concentration de CBG plasmatique après une injection de 3,0 µg/kg d'IL-6 recombinante humaine, chez 15 hommes sains. Moyenne ± erreur-type ; * p < 0,02 vs. contrôle (d'après Tsigos *et al.* 1998).

De manière intéressante, cette diminution est d'autant plus importante que les cellules sont traitées avec une combinaison d'IL-6 et de dexaméthasone. La combinaison de ces deux molécules fait augmenter l'expression d'une sous-unité du récepteur à l'IL-6 et potentialise ainsi les effets de l'IL-6. Ces deux articles sont à l'origine du classement de la CBG en tant que protéine de phase aiguë négative chez l'homme, classement déjà effectué chez le rat en 1980 (Savu *et al.* 1980). Cela permet ainsi de mesurer la sévérité de l'inflammation par l'importance de la diminution de la CBG : la CBG pourrait donc être un biomarqueur de l'inflammation (Hill *et al.* 2016) (pour plus de détails, lire la partie sur les pathologies à composante inflammatoire II.7.b., p.63). L'effet de l'IL-6 a également été étudié *in vivo* sur des patients sains. Une injection d'une forte dose d'IL-6 (3,0 µg/kg) fait diminuer le

taux de CBG plasmatique, qui ne revient à son niveau normal qu'au bout de 7 jours (Tsigos *et al.* 1998) (Figure 22B).

Pourtant, Emptoz-Bonneton et ses collaborateurs montrent également dans leur article qu'une autre molécule pro-inflammatoire, l'IL-1 β , provoque une augmentation de la sécrétion de CBG en même temps que sa diminution en ARNm (Emptoz-Bonneton *et al.* 1997). L'IL-1 β agirait ainsi de manière post-transcriptionnelle et/ou directement sur le mécanisme de sécrétion de la CBG. L'inflammation pourrait donc agir sur la CBG selon différents mécanismes qu'il reste à élucider.

6. MUTATIONS ET POLYMORPHISMES DU GENE *SERPINA6*

L'idée que la CBG jouerait un rôle important dans la réaction inflammatoire est soutenue par les différentes études sur les modèles animaux déficients pour la CBG. Les variations de ses niveaux et de son affinité pour ses ligands, observées chez des patients possédant une mutation du gène *SERPINA6*, ont également permis de mieux comprendre les fonctions de la CBG.

a. APPORT DES MODELES ANIMAUX

L'étude du premier modèle de souris KO *Serpina6* date de 2006 (Petersen *et al.* 2006). Ces souris sont viables, fertiles, ne présentent pas d'anomalies phénotypiques ou de différences architecturales décelables au niveau du foie, des reins, du thymus et des glandes surrénales. La CBG ne semble donc pas être nécessaire à la survie. Aucune différence au niveau du poids, des électrolytes ou des métabolites n'a été notée. La clairance de la corticostérone est cependant plus élevée, et le taux plasmatique de corticostérone total abaissé, tandis que celui de sa fraction libre est augmenté. Cela indique un rôle important de la CBG dans le maintien d'une réserve de glucocorticoïdes circulants. Une baisse d'activité a pu être observée chez ces souris KO. Un autre modèle de souris, généré quelques années plus tard, ne montre cependant aucune différence d'activité (Richard *et al.* 2010). Cette différence est expliquée par le fait que les souris de la deuxième étude ont bénéficié d'une phase d'habituation afin de ne pas favoriser de stress. La première étude démontre que les souris déficientes pour la Cbg sont également plus susceptibles au choc septique : l'injection de LPS (lipopolysaccharide) de *Salmonella enterica* est responsable d'une diminution de la survie de ces souris, comparée aux souris hétérozygotes. Cela s'accompagne d'une augmentation des taux de cytokines au niveau plasmatique et au niveau pulmonaire, où l'infiltration du nombre de

monocytes est anormalement élevée. Ces résultats suggèrent un contrôle insuffisant et inapproprié de la réponse inflammatoire en absence de Cbg.

Des différences existent également entre les souches de rongeurs. Une étude génétique a en effet révélé que les souris C57BL/6 étaient plus sensibles à un challenge pro-inflammatoire avec du TNF- α que les souris DBA/2, et que ce trait était lié au locus *Serpina6* (Libert *et al.* 1999). Il a de plus été montré récemment que les rats Sprague Dawley Harlan présentaient un taux plus faible de CBG plasmatique comparé aux rats de chez Charles River (Bodnar *et al.* 2015). Les rats Harlan sont également plus sensibles à un challenge pro-inflammatoire dans un modèle induit d'arthrite ou après traitement avec du LPS (Turnbull et Rivier 1999, Bodnar *et al.* 2015). Un taux plus faible de corticostérone chez les rats Harlan pourrait ainsi être à la base d'une plus grande susceptibilité à l'inflammation. L'ensemble de ces études tend à montrer le rôle clé de la CBG dans le contrôle de la réponse inflammatoire.

L'étude chez des rats a également permis de révéler la présence de polymorphismes sur le gène *Serpina6* qui influencent l'affinité de la Cbg pour la corticostérone. Smith et Hammond révèlent que les rats BioBreeding, dérivés des rats Wistar, ont une affinité pour la corticostérone diminuée de 50 % comparée à celle des Wistar (Smith et Hammond 1991). La comparaison des ADNc de la CBG leur montre qu'il existe chez les rats BioBreeding un polymorphisme provoquant la substitution de la méthionine 276 en isoleucine, à l'origine de la baisse d'affinité. Les mêmes types de variants génétiques ont été retrouvés chez l'homme, où les conséquences sur la protéine sont diverses.

b. ETUDES CHEZ L'HOMME

De très rares cas de mutations du gène *SERPINA6* ont été retrouvés chez des patients qui présentent un taux plasmatique de cortisol total faible, en association avec différentes manifestations cliniques dont de la fatigue et une douleur chronique. A ce jour, la littérature rapporte l'existence de 19 mutations ayant des conséquences sur l'affinité de la protéine pour ses ligands ou sur son taux plasmatique (Tableau 4).

Nom	Nomenclature ADNc	Nomenclature protéine	Conséquences sur la CBG	Références
Louvain	c.344T>A	p.Leu115His	Affinité diminuée	Van Baelen <i>et al.</i> 1982
Lyon	c.1165G>A	p.Asp389Asn	Affinité et quantité diminuées	Emptoz-Bonneton <i>et al.</i> 2000
Athènes	c.1178G>C	p.Trp393Ser	Perte totale d'affinité	Hill <i>et al.</i> 2012
	c.108C>A	p.His36Gln	Affinité diminuée	Simard <i>et al.</i> 2015
	c.331C>T	p.His111Tyr	Affinité diminuée	Simard <i>et al.</i> 2015
	c.776G>T	p.Gly259Val	Perte totale d'affinité	Perogamvros <i>et al.</i> 2010
	c.845G>T	p.Arg282Leu	Perte totale d'affinité	Simard <i>et al.</i> 2015
	c.901A>T	p.Ile301Phe	Affinité diminuée, activité résiduelle après clivage du RCL	Simard <i>et al.</i> 2015
<i>Null</i>	c.32G>A	p.Trp11X	Absence de la protéine	Torpy <i>et al.</i> 2001
Santiago	c.13delC	p.Leu5CysfsX26	Absence de la protéine	Torpy <i>et al.</i> 2012
	c.107A>G	p.His36Arg	Capacité diminuée	Simard <i>et al.</i> 2015
	c.209T>A	p.Ile70Asn	Production/sécrétion diminuée	Simard <i>et al.</i> 2015
	c.218C>T	p.Ala73Val	Production/sécrétion diminuée	Lin <i>et al.</i> 2012
	c.371A>G	p.Glu124Gly	Capacité diminuée	Lin <i>et al.</i> 2012
	c.601A>G	p.Ile201Val	Activité résiduelle après clivage du RCL	Simard <i>et al.</i> 2015
	c.736G>T	p.Ala246Ser	Production/sécrétion augmentée	Torpy <i>et al.</i> 2004
	c.804C>A	p.Pro268Gln	Pas de sécrétion	Simard <i>et al.</i> 2015
	c.832G>A	p.Ala278Thr	Reconnaissance par anticorps différente	Simard <i>et al.</i> 2015
	c.1114A>G	p.Thr371Ala	Reconnaissance par anticorps différente	Simard <i>et al.</i> 2015

Tableau 4 | Mutations identifiées du gène *SERPINA6* (adapté à partir de Simard *et al.* 2015).

La première mutation de la CBG a été identifiée en 1982 chez 3 individus issus de 3 familles différentes et a été nommée Louvain (Van Baelen *et al.* 1982). Bien que les niveaux plasmatiques de CBG soient normaux, la CBG produite a une affinité pour le cortisol 3 fois moindre que la CBG normale. Cette perte d'affinité est causée par une mutation provoquant la substitution d'une leucine en histidine (Van Baelen *et al.* 1993). Le phénotype associé à cette mutation n'a cependant pas été étudié et ne permet pas d'en connaître les implications cliniques. La mutation de Lyon, une autre mutation caractérisée par une perte d'affinité de la CBG pour le cortisol, a quant à elle été plus étudiée. Emptoz-Bonneton et ses collaborateurs rapportent le cas d'une femme touchée par cette mutation et qui présente une asthénie chronique et de l'hypotension, et qui a développé une

dépression (Emptoz-Bonneton *et al.* 2000). Le taux de CBG plasmatique est abaissé, et l'affinité de cette CBG pour le cortisol est diminuée de 4 fois comparée aux valeurs normales. Les auteurs constatent également une diminution du taux plasmatique de cortisol total, tandis que sa fraction libre est augmentée. Ces mêmes résultats ont été retrouvés chez une femme possédant également cette mutation et qui présentait une asthénie et une somnolence chronique (Brunner *et al.* 2003). Depuis, de nombreuses autres mutations provoquant une perte d'affinité et les mêmes symptômes ont été découvertes chez divers individus (Tableau 4).

D'autres types de mutation sont capables d'altérer la quantité de CBG au niveau plasmatique (Tableau 4). La mutation *Null* provoque une absence totale de la protéine dans les plasmas de patients homozygotes pour cette mutation (Torpy *et al.* 2001). Les patients souffrent d'hypotension et de fatigue et ont un taux plasmatique de cortisol total et libre diminué. D'autres mutations agissant sur le taux de CBG plasmatique détecté ont été mises en évidence dont la mutation Santiago (Torpy *et al.* 2012). Les patients hétérozygotes pour cette mutation ont une concentration plasmatique de CBG réduite de 50 %, à l'exception d'une personne prenant une contraception orale à base d'œstrogènes. Les patients se plaignent également de douleurs idiopathiques et d'une fatigue, en particulier après l'exercice. Il est à noter que l'administration exogène de glucocorticoïdes ne permet pas de pallier ces symptômes, soulignant ainsi le rôle important d'adressage de la CBG.

De manière intéressante, une étude d'association pangénomique (*genome wide association*) réalisée sur 12 597 sujets a montré que certains variants alléliques du gène *SERPINA6* sont associés à des taux plus faibles de cortisol plasmatique le matin (Bolton *et al.* 2014). Certains de ces polymorphismes ont également été associés à des altérations du taux plasmatique de CBG. L'ensemble de ces résultats ont été répliqués sur une cohorte de 1 077 adolescents (Anderson *et al.* 2014). La CBG possède donc un rôle central dans la variabilité du taux plasmatique de cortisol. La CBG semble de plus avoir un rôle dans la distribution de la masse grasse. Des études ont en effet corrélé négativement le taux de CBG plasmatique avec l'indice de masse corporelle, le rapport taille/hanches et la résistance à l'insuline (Fernandez-Real *et al.* 2002). Un allèle du gène *SERPINA6* semble notamment impliqué dans la corrélation avec le rapport taille/hanches chez les femmes obèses (Barat *et al.* 2005). Ce même variant allélique a été retrouvé comme étant augmenté chez des hommes présentant une obésité morbide comparé au reste de la population (30 % *versus* 18 %, $p = 0,02$) (Richard *et al.* 2009). Ce polymorphisme influence également l'indice de masse corporelle ainsi que le tour de taille. Les patients présentant cet allèle ont de plus une tendance à la diminution du taux plasmatique de CBG.

7. ALTERATIONS PATHOLOGIQUES DES NIVEAUX DE CBG

a. MALADIES ENDOCRINIENNES

Les maladies thyroïdiennes peuvent influencer le métabolisme des corticostéroïdes, l'hyperthyroïdisme étant associé à une augmentation de leur catabolisme (Linquette *et al.* 1976). Des conséquences ont également été observées sur la CBG dont le taux plasmatique diminue chez des patients présentant de l'hyperthyroïdisme (Caron *et al.* 1989) (Figure 23). L'inverse a également été constaté chez des patients souffrant d'hypothyroïdisme (Dumoulin *et al.* 1995) (Figure 23). Après un traitement permettant un retour à l'euthyroïdie chez ces deux types de patients, la concentration en CBG se normalise (Caron *et al.* 1989, Dumoulin *et al.* 1995, Agbaht et Gullu 2014). Les hormones semblent ainsi réguler négativement l'expression de la CBG puisque les études *in vitro* montrent qu'une longue exposition de cellules HepG2 à la triiodothyronine la fait diminuer (Barlow *et al.* 1994).

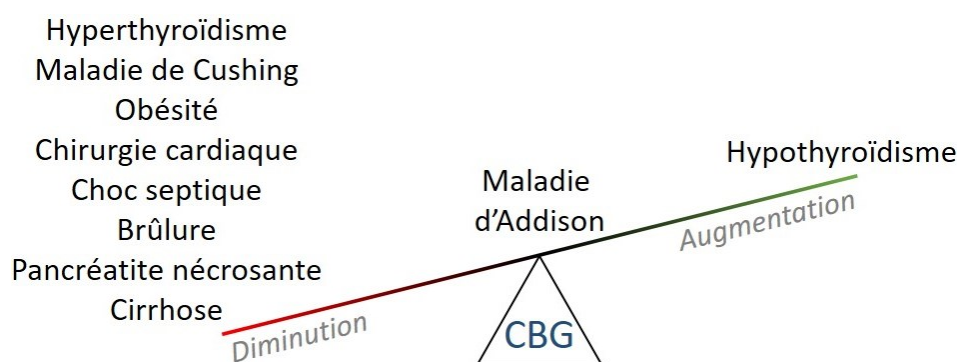


Figure 23 | Variations des niveaux plasmatiques de CBG en fonction du contexte pathologique.

Des modifications des taux plasmatiques de CBG ont également été observées pour des pathologies liées à une altération du taux de cortisol. Ainsi, chez les patients souffrant de la maladie de Cushing, maladie définie par un hypercortisolisme chronique, on observe une diminution des taux plasmatiques de CBG accompagnée d'une augmentation des taux de cortisol libre (De Moor *et al.* 1966, Frairia *et al.* 1988) (Figure 23). La diminution de la concentration en CBG est associée à une diminution de la capacité de liaison pouvant aller jusqu'à 40 % (Schlechte et Hamilton 1987). La diminution de la CBG pourrait être la conséquence de la régulation de l'expression de son gène par le cortisol. Pourtant, les niveaux de CBG semblent être normaux chez les patients atteints de la maladie d'Addison, maladie caractérisée notamment par un défaut de sécrétion de cortisol (De Moor *et al.* 1966, Racadot *et al.* 1976) (Figure 23). Notons que cette maladie est également associée à un défaut de sécrétion des minéralocorticoïdes. La régulation de la CBG dans ce contexte ne peut donc pas être expliquée seulement sous le prisme du taux de cortisol.

Les niveaux de CBG semblent également diminués au cours de l'obésité (Fernandez-Real *et al.* 2001) (Figure 23). Comme nous l'avons vu précédemment, certains polymorphismes du gène *SERPINA6* ont été associés à une diminution de la concentration plasmatique de CBG et à certains paramètres liés à l'obésité, telle la résistance à l'insuline (Fernandez-Real *et al.* 2002). Pourtant, plusieurs études ont produit des résultats contradictoires sur le taux de CBG plasmatique et la sensibilité à l'insuline (Fernandez-Real *et al.* 2001, Lewis *et al.* 2004, Holt *et al.* 2007). *In vitro*, sur les HepG2, l'insuline est capable de faire diminuer la sécrétion et la production en ARNm de la CBG (Crave *et al.* 1995). *In vivo*, chez des sujets minces, l'injection d'insuline provoque une brève diminution de la CBG plasmatique, mais pas chez les sujets obèses (Fernandez-Real *et al.* 2001). La régulation de la CBG plasmatique dans un contexte d'obésité semble donc plus complexe que cela. Cette régulation est d'autant plus complexe que l'obésité est également une pathologie inflammatoire chronique, type de pathologie faisant également varier le taux de CBG.

b. PATHOLOGIES A COMPOSANTE INFLAMMATOIRE

Etant donné le rôle de la CBG dans l'inflammation, plusieurs études se sont intéressées à sa régulation dans un contexte pathologique et inflammatoire. Savu et son équipe montrent une déplétion de l'activité de liaison du cortisol par la CBG, chez des patients en choc septique, reflet d'une diminution du taux plasmatique (Savu *et al.* 1981) (Figure 23). Pugeat et ses collaborateurs démontrent ensuite directement la diminution de la concentration plasmatique de la CBG chez les patients en choc septique ($22,9 \pm 5,9$ mg/L *versus* contrôle : $39,9 \pm 6,5$ mg/L) (Pugeat *et al.* 1989). Le suivi d'un patient 9 jours après le choc révèle un retour progressif à la normale du taux de CBG. La diminution de CBG n'a cependant pas été observée pour les chocs toxiques, hémorragiques ou cardiogéniques. La diminution de la CBG au cours du choc septique a été imputée à la régulation de la CBG par l'inflammation, l'IL-6 étant capable d'inhiber son expression et sa sécrétion. Le taux plasmatique d'IL-6 a en effet été corrélé avec le taux de CBG plasmatique chez ces patients : plus le taux d'IL-6 est élevé et plus celui de la CBG est faible (Beishuizen *et al.* 2001). Le taux de CBG a été récemment corrélé directement avec la sévérité du choc : les patients n'ayant pas survécu au choc présentaient le taux plasmatique de CBG le plus faible (Nenke *et al.* 2015).

Cette même diminution de CBG a été retrouvée chez des patients ayant subi des brûlures ou souffrant d'une pancréatite nécrosante (Bernier *et al.* 1998, Muller *et al.* 2007) (Figure 23). Dans le cas des patients brûlés, cette diminution a également été corrélée à une augmentation d'IL-6. L'ensemble des données de la littérature sur les maladies possédant une composante inflammatoire suggère que la CBG pourrait être utilisée comme un biomarqueur du degré de l'inflammation.

Soulignons que, dans le cas de la pancréatite, la diminution de CBG dans les 48 premières heures a même été proposée comme un marqueur prédictif d'une future infection, avec une valeur prédictive positive de 100 % et une valeur prédictive négative de 87,5 % (Muller *et al.* 2007).

c. PROCEDURES CHIRURGICALES

Tinnikov et ses collaborateurs sont les premiers à montrer, chez des enfants subissant une opération cardiaque, que le taux de CBG plasmatique diminuait de moitié au cours de la procédure, tandis que celui du cortisol augmentait (Tinnikov *et al.* 1993) (Figure 23). Le taux de CBG restait également abaissé le jour suivant l'opération. Cette diminution a été confirmée sur d'autres cohortes (Vogeser *et al.* 1999, Wald *et al.* 2011). Roth-Isigkeit et ses collègues notent cependant une baisse du pourcentage de l'hématocrite pendant l'opération et pendant les deux jours suivants (Roth-Isigkeit *et al.* 2000). La correction par l'hémodilution montre que le taux de CBG n'est que légèrement diminué, et ce, uniquement le jour de l'opération. La concentration de cortisol corrigée, totale et libre, est quant à elle toujours augmentée pendant plusieurs jours post-opératoires. Leur étude montre ainsi que, dans ce contexte, la sécrétion du cortisol semble être le principal déterminant du taux de cortisol libre, le niveau de CBG n'étant pas altéré.

d. MALADIES HEPATIQUES

La CBG étant principalement produite par le foie, les études se sont intéressées à son niveau plasmatique dans un contexte de pathologies hépatiques. Peu de temps après sa découverte, Doe et ses collaborateurs montrent que les patients souffrant de cirrhose avaient une concentration plasmatique de CBG abaissée (Doe *et al.* 1964). Plusieurs études valident ensuite ce résultat sur différents types de cirrhose dont des cirrhoses provoquées par une atrésie des voies biliaires, le virus de l'hépatite B ou C, et une maladie autoimmune (Coolens *et al.* 1987, McDonald *et al.* 1993) (Figure 23). La diminution de la concentration plasmatique de CBG semble être corrélée à la sévérité de la cirrhose : plus l'atteinte hépatique est prononcée et plus le taux de CBG chute (Wiest *et al.* 2008). De manière intéressante, une autre étude s'intéressant à la recherche de nouveaux marqueurs de fibrose hépatique a détecté la CBG comme un potentiel biomarqueur, son taux plasmatique diminuant également avec l'augmentation de la sévérité de la pathologie (Gangadharan *et al.* 2012). La diminution de la CBG plasmatique a été expliquée par une baisse probable de la synthèse au niveau hépatique, sans qu'aucune étude n'ait pu le démontrer à ce jour.

OBJECTIFS

La mucoviscidose est une maladie qui touche de nombreux organes, dont les poumons, le pancréas et le foie. L'atteinte pulmonaire reste aujourd'hui la première cause de mortalité et de morbidité chez les patients touchés par la maladie. L'inflammation chronique, peu contrôlée et renforcée par les colonisations bactériennes, contribue à la dégradation progressive de l'épithélium des voies aériennes des patients et aboutit à une insuffisance respiratoire.

Plusieurs traitements anti-inflammatoires peuvent être utilisés afin de contrôler cette inflammation et d'en limiter les dommages sur l'épithélium pulmonaire. Les glucocorticoïdes (GC) de synthèse représentent actuellement le principal outil du médecin avec 37,3 % des patients traités par GC inhalés et plus de 16 % par GC oraux (Vaincre la mucoviscidose et Ined 2016). Leur administration est cependant associée à des effets secondaires tels qu'un retard de croissance ou l'apparition d'un diabète. Des alternatives non stéroïdiennes ont été proposées, comme l'azithromycine ou l'ibuprofène, mais du fait qu'elles ne puissent être utilisées régulièrement ou qu'elles nécessitent un contrôle minutieux du dosage, les glucocorticoïdes restent toujours préférés des praticiens pour traiter l'inflammation.

Des études précédentes dans notre laboratoire ont de plus montré que ces molécules étaient efficaces *in vitro*, puisqu'elles permettaient de faire diminuer l'inflammation dans des cellules bronchiques issues de patients CF (Rebeyrol *et al.* 2012). Les effets secondaires provoqués par l'administration des GC semblent être liés à leurs actions pléiotropes sur le métabolisme et le développement par exemple. Ces effets secondaires pourraient être diminués en ciblant spécifiquement leurs actions anti-inflammatoires par l'utilisation de leur protéine de transport, la *corticosteroid-binding globulin* (CBG).

L'objectif de ce travail était d'étudier la CBG dans le contexte de la mucoviscidose afin d'optimiser le traitement anti-inflammatoire par GC des patients.

Nous avons donc, dans un premier temps, étudié son expression au niveau hépatique puis sa libération au niveau plasmatique chez les patients afin de déterminer la régulation de son expression dans ce contexte pathologique. La CBG étant également exprimée au niveau pulmonaire et l'inflammation chez les patients étant principalement pulmonaire, nous nous sommes intéressés dans un second temps à son expression au niveau pulmonaire. L'expression locale de CBG pourrait en effet moduler l'efficacité d'un traitement anti-inflammatoire en recaptant le GC. L'ensemble de nos résultats permet de proposer la CBG comme nouvel outil thérapeutique dans le contexte de la mucoviscidose, afin d'optimiser le traitement par GC.

RESULTATS

I. ARTICLE

Cet article a été publié en juin 2018 dans le journal *Frontiers in Pharmacology* (Tchoukaev *et al.* 2018).

1. CONTEXTE DE L'ETUDE

La mucoviscidose est une maladie génétique causée par des mutations du gène *CFTR*. La large distribution d'expression du canal CFTR fait de la mucoviscidose une maladie multi organe touchant les poumons, le foie, les intestins, le pancréas, l'appareil génital et les glandes sudoripares.

Au niveau hépatique, l'absence ou le dysfonctionnement de CFTR conduit à une obstruction des canaux biliaires où s'accumule une bile contenant des acides biliaires cytotoxiques. Cela peut mener à une fibrose focale pouvant évoluer en cirrhose multilobaire. L'atteinte pulmonaire reste pourtant la principale cause de morbidité et de mortalité des patients. A ce niveau, on constate une déshydratation du liquide de surface des voies aériennes et une altération de la clairance mucociliaire. Des cycles d'infection et d'inflammation se mettent en place et induisent une dégradation progressive de l'épithélium, menant à terme, à une insuffisance respiratoire. L'inflammation chronique, peu contrôlée et renforcée par la colonisation bactérienne importante, contribue à la dégradation de cet épithélium.

Les traitements anti-inflammatoires, au premier rang desquels on trouve les glucocorticoïdes (GC), représentent un outil essentiel pour limiter les lésions pulmonaires. En France, 37,3 % des patients ont été traités, en 2015, par GC inhalés et plus de 16 % par GC oraux (Vaincre la mucoviscidose et Ined 2016). Pourtant, leur efficacité ainsi que leur rapport bénéfice/risque sont souvent discutés dans le contexte de la mucoviscidose, ce qui rend leur utilisation encore controversée. De manière intéressante, des études précédentes de notre laboratoire ont montré, qu'*in vitro*, les GC étaient efficaces pour réduire l'inflammation dans des cellules épithéliales bronchiques CF (Rebeyrol *et al.* 2012). Une meilleure compréhension de leur mode d'action dans le contexte CF est donc nécessaire. Nous nous sommes en particulier intéressés à la CBG, encore peu étudiée, et représentant un mode de régulation extracellulaire des GC permettant de cibler leurs actions anti-inflammatoires.

2. RESULTATS

La CBG étant principalement produite par le foie, nous avons dans un premier temps étudié l'expression de la CBG hépatique à partir de foies issus de patients CF cirrhotiques (cir) et non-CF cir. Nous avons observé une augmentation significative de la CBG, chez les patients CF comparés aux non-CF, au niveau transcriptionnel et protéique (Figure 1 de l'article). Nous nous sommes ensuite intéressés à son taux plasmatique afin de déterminer si cette augmentation hépatique était également suivie d'une augmentation de la libération de la protéine dans le plasma. Notre étude montre que la concentration en CBG est identique entre les patients CF et non-CF (CF : $270,3 \pm 64,4$ nM ; non-CF : $260,2 \pm 98,1$ nM) (Figure 2A de l'article). Cette absence d'augmentation nous a amenés à mesurer la concentration plasmatique de l'élastase chez ces deux groupes. L'élastase est en effet capable de couper la CBG et pourrait ainsi induire sa dégradation. Nos résultats montrent une augmentation d'un facteur 2 du taux de complexe élastase/AAT chez les patients CF ($186,83$ ng/mL) par rapport à celui des contrôles ($85,92$ ng/mL) (Figure 2B de l'article).

Le site principal de l'inflammation chez les patients CF étant le poumon, nous avons voulu, dans un second temps, évaluer l'expression de la CBG au niveau pulmonaire. Aucune donnée de la littérature n'indiquait où s'exprimait la CBG pulmonaire. Nous avons donc tout d'abord déterminé le patron d'expression pulmonaire de la CBG. Nous avons trouvé que la CBG était exprimée au niveau bronchique et bronchiolaire, tandis qu'elle était indétectable au niveau alvéolaire (Figure 3 de l'article). Enfin, nous avons comparé l'expression de la CBG pulmonaire entre les patients CF et non-CF. Son expression était diminuée au niveau bronchique de 52 % et au niveau bronchiolaire de 45 % chez les patients CF (Figure 4 de l'article).

3. CONCLUSION

L'étude réalisée montre une augmentation de la CBG au niveau hépatique chez les patients CF, indépendamment du statut cirrhotique du patient. Au niveau plasmatique, le taux de CBG chez les patients est identique au groupe contrôle, tandis que le complexe élastase/AAT est augmenté. Notre étude suggère ainsi que la CBG serait libérée en quantité plus importante chez les patients CF, mais qu'elle serait ensuite partiellement coupée au niveau plasmatique par l'élastase.

Au niveau pulmonaire, la CBG, exprimée au niveau bronchique et bronchiolaire, est diminuée chez les patients CF. Cette diminution pourrait permettre de potentialiser les effets des GC localement. En effet, selon l'hypothèse retrouvée dans la littérature, les CBG extrahépatiques

auraient un rôle antagoniste de la CBG hépatique. Lorsque le GC entrerait dans la cellule au niveau pulmonaire, la CBG locale le recapterait et le bloquerait, l'empêchant ainsi d'exercer ses effets anti-inflammatoires. La diminution de la CBG pulmonaire chez les patients CF implique donc une diminution du blocage des GC. Cela suggère une optimisation des effets des GC au sein même des cellules des voies aériennes CF.

Nous avons montré que la concentration plasmatique de CBG était conservée, tandis que la CBG pulmonaire était diminuée chez les patients CF. Un GC de synthèse liant la CBG pourrait donc être utilisé, afin d'être transporté sur le site de l'inflammation, le poumon dans le contexte de la mucoviscidose. À ce niveau, la CBG locale étant diminuée, le GC pourrait agir plus facilement. Cette étude permet, de cette façon, de proposer la CBG comme un nouvel outil thérapeutique afin d'optimiser le traitement par GC chez les patients CF.



Opposite Expression of Hepatic and Pulmonary Corticosteroid-Binding Globulin in Cystic Fibrosis Patients

Anastasia Tchoukaev¹, Jessica Taytard^{1,2}, Nathalie Rousselet¹, Carine Rebeyrol¹, Dominique Debray^{1,3}, Sabine Blouquit-Laye⁴, Marie-Pierre Moisan⁵, Aline Foury⁵, Loïc Guillot¹, Harriet Corvol^{1,2}, Olivier Tabary¹ and Philippe Le Rouzic^{1*}

¹ INSERM, Centre de Recherche Saint-Antoine, Sorbonne Université, Paris, France, ² Pediatric Respiratory Department, Trousseau Hospital, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Paris, France, ³ Pediatric Hepatology Unit, Necker Enfants Malades Hospital, Paris, France, ⁴ INSERM U1173, UFR des Sciences de la Santé Simone Veil, Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, Versailles, France, ⁵ INRA, Laboratoire NutriNeuro, UMR 1286, Université de Bordeaux, Bordeaux, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Sabina Passamonti,
University of Trieste, Italy

Reviewed by:

Sandra Kraljević Pavelić,
University of Rijeka, Croatia

John M. Rimoldi,
University of Mississippi,
United States

*Correspondence:

Philippe Le Rouzic
philippe.le-rouzic@inserm.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Drug Metabolism and Transport,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 23 March 2018

Accepted: 08 May 2018

Published: 05 June 2018

Citation:

Tchoukaev A, Taytard J, Rousselet N, Rebeyrol C, Debray D, Blouquit-Laye S, Moisan M-P, Foury A, Guillot L, Corvol H, Tabary O and Le Rouzic P (2018) Opposite Expression of Hepatic and Pulmonary Corticosteroid-Binding Globulin in Cystic Fibrosis Patients. *Front. Pharmacol.* 9:545. doi: 10.3389/fphar.2018.00545

Cystic fibrosis (CF) is characterized by a chronic pulmonary inflammation. In CF, glucocorticoids (GC) are widely used, but their efficacy and benefit/risk ratio are still debated. In plasma, corticosteroid-binding globulin (CBG) binds 90% of GC and delivers them to the inflammatory site. The main goal of this work was to study CBG expression in CF patients in order to determine whether CBG could be used to optimize GC treatment. The expression of CBG was measured in liver samples from CF cirrhotic and non-CF cirrhotic patients by qPCR and Western blot and in lung samples from non-CF and CF patients by qPCR. CBG binding assays with ³H-cortisol and the measurement of the elastase/α1-antitrypsin complex were performed using the plasmas. CBG expression increased in the liver at the transcript and protein level but not in the plasma of CF patients. This is possibly due to an increase of plasmatic elastase. We demonstrated that pulmonary CBG was expressed in the bronchi and bronchioles and its expression decreased in the CF lungs, at both levels studied. Despite the opposite expression of hepatic and pulmonary CBG in CF patients, the concentration of CBG in the plasma was normal. Thus, CBG might be useful to deliver an optimized synthetic GC displaying high affinity for CBG to the main inflammatory site in the context of CF, e.g., the lung.

Keywords: corticosteroid-binding globulin, cystic fibrosis, glucocorticoids, liver, lung

INTRODUCTION

Cystic fibrosis (CF) is the most frequent autosomal recessive genetic disorder among the Caucasian population. This disease is caused by mutations in the *CFTR* gene (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) which encodes a chloride channel (Riordan et al., 1989). Due to the wide expression of *CFTR*, CF is a multi-organ disease, affecting the lungs, the liver, the digestive tract, the pancreas, the reproductive tract and the sweat glands.

In the liver, *CFTR* is expressed at the apical membrane of the cholangiocytes (Cohn et al., 1993). Its absence or dysfunction leads to a decrease in bile flow, and the retention of endogenous hydrophobic bile acids that may be responsible for cell membrane injury (Debray et al., 2017). This, in turn, causes inflammation and collagen deposition around the bile ducts and portal tracts, leading to focal biliary and periportal fibrosis, which can progress to multilobular

cirrhosis with portal hypertension (Feranchak and Sokol, 2001). The German registry reports that up to 32% of CF patients develop liver disease (Nährlich et al., 2016). Lung disease still remains the main cause of morbidity and mortality in CF patients. In CF airways, the lack of functional CFTR indeed leads to the stagnation of an abnormally thick mucus, which is favorable to pathogens colonization. Characteristic inflammation and infection cycles appear, inducing a progressive pulmonary degradation, and, eventually, lead to lung failure (Jacquot et al., 2008; Pittman and Ferkol, 2015). Chronic and poorly controlled inflammation, reinforced by an important bacterial colonization, contributes to the deterioration of the epithelium in CF airways.

Anti-inflammatory treatments, primarily glucocorticoids (GC), represent one of the main tools for the practitioner to delay lung injury. In France, 37.3% of CF patients were treated with inhaled GC in 2015 and more than 16% with oral GC (Vaincre la Mucoviscidose and Ined, 2017). Nevertheless, the use of GC is still controversial in the CF context. Indeed, a multi-centric study failed to show any beneficial effects, whatsoever, of inhaled GC in CF patients and highlighted the fact that at high doses, they can cause adverse effects (Balfour-Lynn and Welch, 2016). In 1985, a pioneer study showed that oral GC could help in preventing the decrease of the pulmonary function in CF patients (Auerbach et al., 1985), but these results were quickly contradicted by other studies showing major side effects associated with a long-term use (Eigen et al., 1995; Lai et al., 1999). More recently, a multi-centric study on the use of oral GC confirmed those side effects (Cheng et al., 2015). Controversially, previous works from our laboratory showed that, *in vitro*, GC are efficient to reduce the inflammation in bronchial epithelial CF cells (Rebeyrol et al., 2012). A better understanding of the mode of action of GC is therefore needed in the context of CF. We were interested in particular on their extracellular regulation through their specific binding globulin, corticosteroid-binding globulin (CBG), which is poorly studied.

Corticosteroid-binding globulin, or SERPINA6, is a glycoprotein that is mainly produced by the liver, and more specifically by the hepatocyte (Khan et al., 1984). It is released in the plasma where it binds approximately 90% of GC. At the inflammatory site, CBG is cleaved by activated neutrophils elastase, leading to a conformational change of CBG and resulting in the local release of bound GC (Pemberton et al., 1988; Hammond, 1990). Recent studies show that CBG is also cleaved specifically by elastase (LasB) from *Pseudomonas aeruginosa*, which represents the main bacteria found in CF airways (Simard et al., 2014). CBG is therefore the protein that addresses the GC to the inflammatory and infection site and, in particular, to the lung in the context of CF. Furthermore, some studies show that CBG is also produced by other organs, including the lung (Hammond et al., 1987). This local expression could modulate the efficiency of GC in the lung, the main site of inflammation in CF patients, but its function and pattern of expression are still unknown.

The goal of this study was to investigate the expression of hepatic and pulmonary CBG in CF patients in order to determine if CBG could be used to optimize GC treatment.

MATERIALS AND METHODS

Subjects and Samples

Liver and lung specimens as well as blood samples were collected and processed in compliance with the standard guidelines for human research (Declaration of Helsinki) and the current French public health legislation (articles L.1235-2 and L.1245-2, code de la santé publique¹). Written consent for using the liver or lung tissue samples for research purposes was obtained from the patients or parents.

The liver samples were obtained during liver transplantation from 9 CF cirrhotic (cir) patients (18 ± 2 years old, seven men and two women) and 5 non-CF cir patients (22 ± 2 years old, three men and two women), who developed cirrhosis due to biliary atresia (BA).

The lung lobes were obtained from 10 non-CF patients who underwent surgery (61 ± 6 years old, 10 men) and from 19 CF patients (30 ± 7 years old, 10 men and 9 women) who underwent lung transplantation. The samples from the non-CF patients were obtained from a non-pathologic area without any inflammation. After dissection of the tissue, the samples were directly frozen in liquid nitrogen before extraction.

The blood samples were collected after obtaining an informed consent from each patient included in the study, including: 32 non-CF patients (22 ± 7 years old, 13 men and 19 women) with 22 young healthy adults and 10 non-CF cir patients (8 BA and 2 autoimmune cirrhosis); and 31 CF patients (13 ± 3 years old, 21 men and 10 women) with 10 cir patients, 8 patients without liver involvement, 12 with focal fibrosis and 1 with liver steatosis. The blood samples were immediately centrifuged for 15 min at 4,000 rpm at 4°C. The plasma was aliquoted and kept at -80°C until use.

RNA Extraction

The hepatic (500 mg) or lung samples (100 mg) were grinded using the Polytron device (PT 3,100 Kinematica, Luzern, Switzerland) at high speed in 1 mL of TRIzolTM (Thermo Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France). After that, we followed the modified Chomczynski and Sacchi protocol (Chomczynski and Sacchi, 1987). The RNA pellets were finally dissolved in 50 to 100 μL of sterile water.

Reverse Transcription (RT) and Quantitative PCR (qPCR)

The total RNA (1 μg) was heated at 65°C for 5 min and was then cooled down on ice. After that, we followed Promega's recommendations for the RT (Charbonnières-les-Bains, France). Then, the mix was incubated for 1 h at 37°C .

The transcripts levels were assessed by qPCR using CBG (Hs00156318_m1), GAPDH (Hs02786624_g1), and 18S (Hs03928992_g1) TaqManTM probes obtained from Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific). The CBG transcripts were normalized to the 18S transcripts levels in the hepatic samples and to the GAPDH transcripts levels in the pulmonary samples.

¹www.legifrance.gouv.fr

The experiments were performed in duplicate for each qPCR point. A total of 1 μ L of RT product was mixed with TaqManTM Fast Universal PCR Master Mix 2X (Thermo Fisher Scientific) for a final volume of 10 μ L. The qPCR experiments were done using Thermo fisher's thermocycler StepOnePlus and were analyzed with StepOne Software v2.2.2.

Protein Extraction and Western Blot

Cubes of livers (3 mm) were grinded in lysis buffer (Tris-HCl pH 7.5 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, NP-40 1%, deoxycholate 0.5%, and SDS 0.1%). The samples were agitated at 1,300 rpm at 4°C for 30 min and then centrifuged at 15,000 g for 10 min at 4°C. The upper phase was collected, and the protein concentrations were assessed by a BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific).

The livers proteins (30 μ g) were reduced in lysis buffer with Laemmli 1 \times and β -mercaptoethanol (1/5) by heating for 5 min at 100°C and were separated on 10% SDS-polyacrylamide gels. Then, the proteins were transferred to nitrocellulose membranes (iBlotTM transfer system, Thermo Fisher Scientific). Non-specific sites were blocked for 1 h in 5% milk in Tris buffer saline tween (TBS-T). The membranes were incubated overnight at 4°C with a rabbit polyclonal anti-human CBG antibody (1/2,500), kindly provided by Dr. John G. Lewis (Christchurch, New Zealand) or a mouse anti-human β -actin antibody (A2228, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France; 1/20,000) for 1 h. The membranes were then incubated for 1 h with an anti-rabbit IgG HRP-linked antibody (1/5,000) from Cell Signaling (Leiden, Netherlands; reference: 7074) or an anti-mouse IgG HRP-linked antibody (1/5,000; reference: 7076). The chemiluminescent images were captured using the Chemidoc Touch (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) following exposure to the SuperSignal West Femto kit (Thermo Fisher Scientific). The quantifications were made using ImageJ software.

CBG Binding Assay

The binding capacity of CBG for cortisol was measured at 4°C by a solid phase binding assay using concanavalin A-sepharose (modified from Pugeat et al., 1984) (reference: 17-0440-01, Dutscher, Brumath, France). Briefly, the endogenous glucocorticoid from plasma free of fibrin was first adsorbed onto activated charcoal (plasma/charcoal vol/vol) by agitation for 30 min at room temperature followed by a centrifugation at 10,000 rpm at 4°C for 15 min. CBG was then adsorbed onto a solid phase matrix of con A-sepharose by incubating it for 30 min in 50 μ L of stripped plasma with 250 μ L of conA-sepharose. Each tube was then washed, and after centrifugation for 15 min at 4,000 rpm at 4°C, the aqueous phase containing the non-adsorbed proteins, such as albumin, was removed. ³H-cortisol (30,000 cpm, Perkin Elmer, Villebon-sur-Yvette, France, ref: NET-396) and increasing concentrations of unlabelled cortisol (0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, and 500 ng/tube, reference: H-4001, Sigma-Aldrich) were added. The mixture was agitated and incubated for 45 min at 4°C with mixing before being centrifuged at 4,000 rpm for 15 min at 4°C. The upper phase was removed and 2.5 mL of scintillate liquid was added [Ecolite(+)TM, MP

Biomedicals, Illkirch-Graffenstaden, France]. Every tube was counted for 3 min by a Hidex 300 SL detector (Hidex, Turku, Finland).

The binding capacity of CBG for cortisol was calculated by a Scatchard analysis using "bound" as the quantity of cortisol specifically bound to the glycoproteins adsorbed to the gel and "free" as the concentration of cortisol in the aqueous phase.

Elastase/ α 1-Antitrypsin Complex Measurements

The concentration of the elastase/ α 1-antitrypsin (AAT) complex in the plasmas was measured according to the manufacturer's recommendations (QIA96, Sigma-Aldrich).

Statistical Analysis

The horizontal bar on each graph represents the mean. The outliers were identified by Grubbs' test². The data were compared using a Student's *t*-test for comparing two groups and a one-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test for comparing more than two groups. All the analyses were performed on GraphPad Prism version 7 software: *p* < 0.05 was considered significant. For each graph, the significant difference is represented as: **p* < 0.05, ***p* < 0.01, and ****p* < 0.001.

RESULTS

Expression of CBG in the Livers of CF Patients

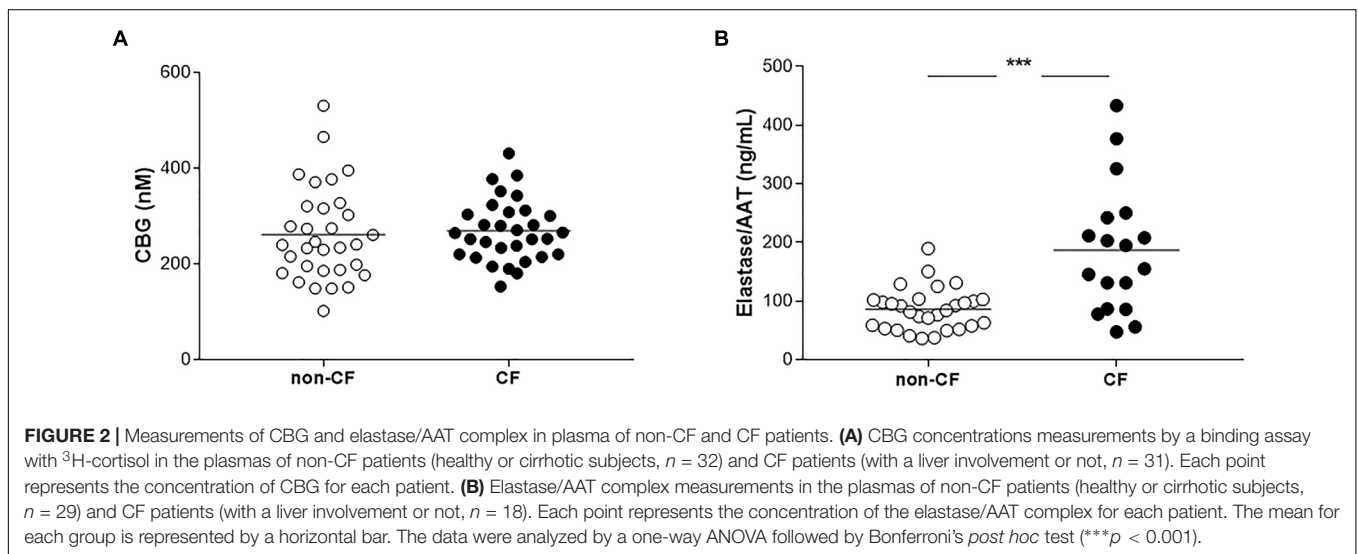
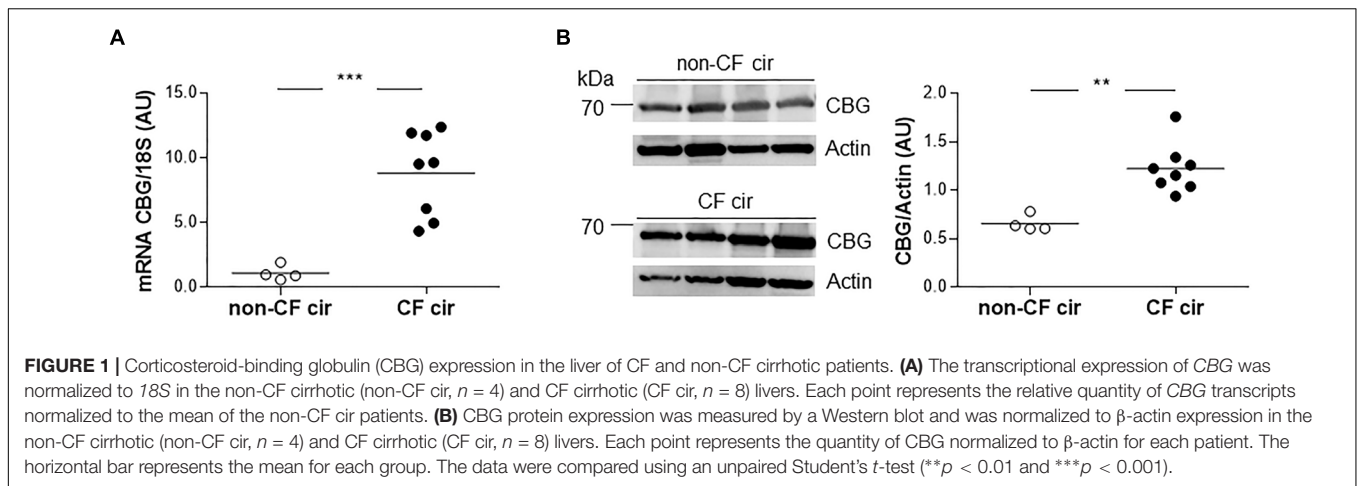
Since the main CBG production site is in the liver, we first studied the expression of hepatic CBG in liver tissue from CF cirrhotic (cir) and non-CF cir patients. A significant eightfold increase in CBG transcripts was found in the CF cir livers compared to the non-CF cir livers with a significant *p*-value < 0.0001 (Figure 1A). The variation between these groups was confirmed at the protein level by a Western blot (80% of increase; *p* < 0.01) (Figure 1B).

CBG and Elastase/ α 1-Antitrypsin Complex Measurements in the Plasma of CF Patients

To assess if the increase in CBG in the liver of CF patients resulted in an increase in the protein release into the plasma, we measured the concentration of CBG in the plasma of CF and non-CF patients using a binding assay with concanavalin A-sepharose. For all the subjects, the mean concentration of CBG was similar without any significant differences (non-CF: 260.2 \pm 98.1 nM; CF: 270.3 \pm 64.4 nM) (Figure 2A).

Because neutrophils elastase cleaves CBG and is thus responsible for the release of GC, we therefore measured the plasmatic concentration of elastase in the two groups. We found a significant twofold increase of the mean of elastase/AAT complex in the plasma of the CF patients compared to the non-CF, 186.83 ng/mL vs. 85.92 ng/mL (*p* < 0.0001) (Figure 2B).

²<http://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>



Pattern of Expression of Pulmonary CBG

Because the main site of inflammation in CF is the lung, we evaluated the expression of CBG in the lung tissue. We first studied the pattern of CBG expression in the lung of the non-CF patients. Due to the possible contamination by the hepatic CBG protein that could circulate and be found in the lung, especially considering the low pulmonary expression compared to the hepatic one, we only measured the local expression of CBG by real-time quantitative PCR. *CBG* mRNA expression was measured in the bronchial, bronchiolar, and alveolar biopsies. We found the expression of CBG in the bronchi and bronchioles (mean expression in arbitrary unit: 1.14 and 2.25, respectively) while barely any *CBG* mRNA was detectable in the alveoli (mean expression in arbitrary unit: 0.09 with a $p < 0.0001$) (Figure 3).

Expression of CBG in the Lungs of CF Patients

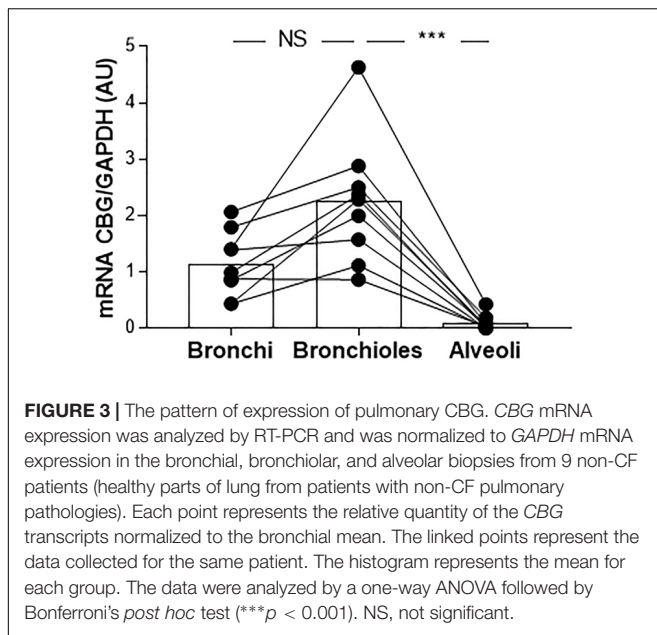
Finally, we compared the CBG expression between the non-CF and CF patients in the bronchial and bronchiolar biopsies, since CBG was not expressed in the alveolus. The *CBG* transcripts

expression was decreased in the bronchi (by 52%, $p < 0.001$) and bronchioles (by 45%, $p < 0.01$) of the CF patients compared to the non-CF patients (Figure 4).

DISCUSSION

Despite serious side effects, GC represent one of the main anti-inflammatory therapies for CF patients. Given that CBG could be used to deliver GC specifically to the inflammatory site (e.g., the lung in CF), the aim of this work was to study the hepatic and pulmonary CBG expression in CF patients. CBG was never studied in this context, even though it could lead to the optimization of GC treatment for CF patients. In this study, we demonstrated that the CBG expression in CF patients was upregulated in the liver and downregulated in the lung, while the plasmatic level remained unchanged compared to the non-CF patients.

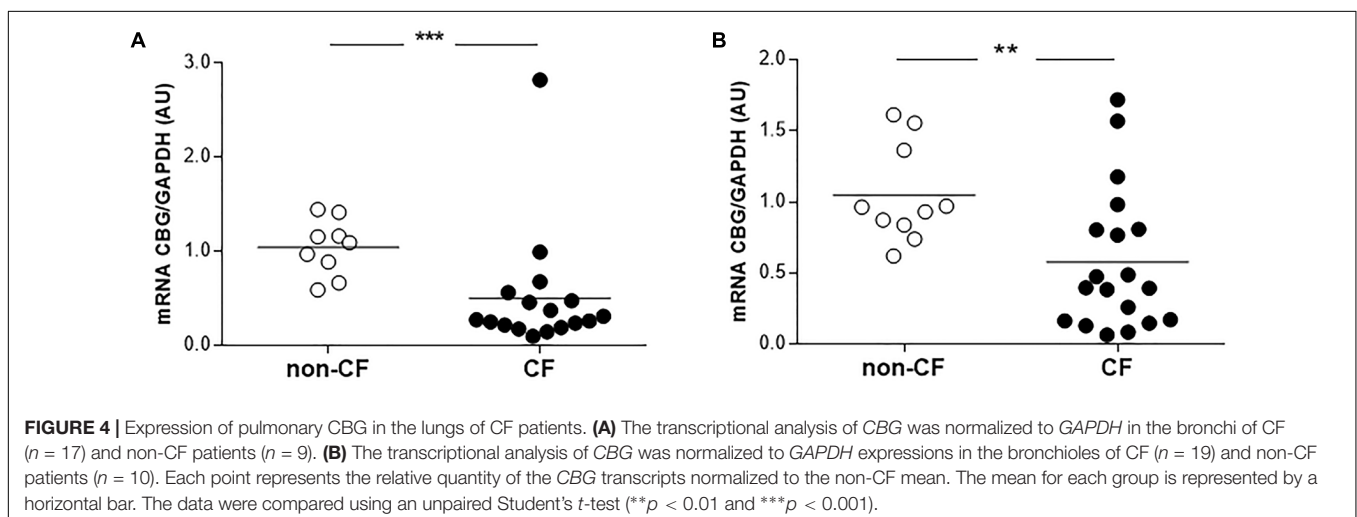
We showed an increase in the CBG transcripts and protein in the liver of the CF patients (Figure 1). A pioneer study suggested a slight decrease in plasmatic CBG capacity in



CF patients who had low liver function, presumably due to disturbed protein synthesis by the liver (Nowaczynski et al., 1987). Our findings do not support this assessment. To our knowledge, no increase in CBG expression in the liver was ever described in a pathological context. Cirrhotic livers from CF and non-CF patients were chosen to compare, at best, the results, and it seems that this increase is therefore specific of the context of CF. However, because CBG is expressed and secreted by hepatocytes (Khan et al., 1984), whereas CFTR is exclusively expressed by another cell type, cholangiocytes (Cohn et al., 1993), this increase does not seem to be the direct consequence of a dysfunction of the CFTR channel within the cell. We hypothesize that it would rather be the specific microenvironment of the CF liver that would be responsible for this regulation. Indeed, the cholangiocyte abnormalities caused by CF, leading to toxic bile acids accumulation in the liver, are

responsible for inflammation with the release of proinflammatory cytokines, growth factors and the activation of hepatic stellate cells to synthesize collagen (Leeuwen et al., 2014). The particular environment and architectural reshaping of the liver in CF patients is unique, not resembling any other liver pathologies (Staufer et al., 2014). The pathogenesis of CF liver disease has still largely been unknown. Further investigation about the physiopathology of CF liver disease would be fundamental to better understand the new regulation we observed here.

We then focused our work on the level of plasmatic CBG, which, if it is enough, could be used to deliver GC in CF patients. Some studies show a decreased in CBG concentration in the plasma in a pathological context, such as in burned patients (Bernier et al., 1998), during a septic shock (Pugeat et al., 1989) or in the plasma of patients with metabolic disorders (Fernandez-Real et al., 2001). A decreased in CBG concentrations was also described in the plasma of cirrhotic patients, but these studies included heterogeneous groups of patients with various causes of cirrhosis other than BA (Coolens et al., 1987; McDonald et al., 1993; Wiest et al., 2008). This could explain why we did not see this decrease in our cohort (data not shown). We showed that the mean concentration of CBG in CF patients was the same as the control group (Figure 2A). This specific and interesting result, considering the increase of CBG in the liver of CF patients, lead us to two hypotheses, including that the absence of an increase in plasmatic CBG could be explained by hepatic retention and/or the increased cleavage of CBG in the plasma. The plasmatic concentration of other proteins produced and secreted by the liver, such as AAT, were, however, not shown to be disrupted in CF patients (Birrer et al., 1994). Hepatic retention is thus unlikely to be the mechanism explaining the normal plasmatic CBG concentrations observed in the CF patients. CBG is therefore possibly released but is then partially cleaved in the plasma. In CF, exacerbated neutrophilic activity with sustained elastase release could be responsible for this cleavage. It is well known that this protease targets CBG, which leads to the release of GC and the irreversible inactivation of CBG (Pemberton et al., 1988). In physiological conditions, neutrophil elastase is inhibited by



anti-proteases, mainly AAT. These inhibitors can, however, be briefly overwhelmed by bursts of elastase, which are frequent in CF patients who have several pulmonary exacerbations per year (Stenbit and Flume, 2011). Interestingly, we showed an increase of elastase/AAT complex in our CF plasmas (**Figure 2B**), confirming previous work and supporting the hypothesis that the absence of an increase of plasmatic CBG is explained by an increase in the cleavage of CBG (Meyer et al., 1991). This result is in contrast with the work of Nenke et al. (2016) who showed a decrease of CBG cleavage in AAT deficient patients. The authors, however, postulated that others antiproteases than AAT could inhibit elastase in plasma. Considering that, the bursts of elastase in CF patients are significantly high enough to damage the pulmonary epithelium, elastase does not seem to be counteracted in CF context as it could be in AAT deficiency. The elastase secreted by *P. aeruginosa* cleaves CBG, as recently shown (Simard et al., 2014). Given that CF patients are colonized early, and it is predominantly by this bacteria (Vaincre la Mucoviscidose and Ined, 2017), this protease could also explain the absence of the increase in plasmatic CBG observed.

In CF, the main site of inflammation is the lung; thus, we decided to study the expression of the pulmonary form of CBG. We showed the similarity of the two CBG forms, and the lung and the hepatic CBG had a 100% identity (GenBank: MG652288), confirming the preliminary results from Hammond et al. (1987). No data, however, exists on its expression along the airways. We showed, for the first time, that the pulmonary CBG is expressed in the bronchi and bronchioles but not in the alveoli (**Figure 3**). The role of extrahepatic CBG is discussed in the literature (Sivukhina and Jirikowski, 2014; Meyer et al., 2016). A local and intracellular production of CBG is suggested to work as an inhibitor of GC intracellular actions. Indeed, when GC enter the airway cells, pulmonary CBG would bind these GC, resulting in their containment and the blockade of their anti-inflammatory effects. The hypothesis of an opposite role of hepatic and pulmonary CBG is supported by the fact that, in CF, they are regulated in an opposite manner. The pulmonary CBG level is decreased (**Figure 4**) while the hepatic CBG level is increased (**Figure 1**). This opposite pattern of regulation is also observed in a model of acute pancreatitis in mice (Gulfo et al., 2016). Following the hypothesis on the role of the pulmonary CBG, the decrease observed in the lung of CF patients would mean a decrease in GC blockade. This suggests that the optimization of GC occurs locally, in the CF airway cells.

REFERENCES

- Auerbach, H. S., Williams, M., Kirkpatrick, J. A., and Colten, H. R. (1985). Alternate-day prednisone reduces morbidity and improves pulmonary function in cystic fibrosis. *Lancet* 2, 686–688. doi: 10.1016/S0140-6736(85)92929-0
- Balfour-Lynn, I. M., and Welch, K. (2016). Inhaled corticosteroids for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst. Rev.* 23:CD001915. doi: 10.1002/14651858.CD001915.pub5
- Bernier, J., Jobin, N., Emptoz-Bonneton, A., Pugeat, M. M., and Garrel, D. R. (1998). Decreased corticosteroid-binding globulin in burn patients: relationship with interleukin-6 and fat in nutritional support. *Crit. Care Med.* 26, 452–460. doi: 10.1097/00003246-199803000-00014

Interestingly, some studies show that the main GC prescribed for CF patients (prednisone and prednisolone) have very poor to no affinity for CBG (Dunn et al., 1981; Pugeat et al., 1981). This lack of affinity leads to the use of high doses to obtain enough GC at the inflammatory site. GC are, however, not limited exclusively to this site, as if they were binding to CBG, but they act within the whole body with metabolic, immune, and developmental side effects (Oray et al., 2016). Using a GC with a high affinity for CBG could be a way of reducing the side effects, as already suggested in the literature (Chan et al., 2014; Henley et al., 2016). We showed that the concentration of CBG in the plasma of the CF patients was the same as the control subjects and that there was a decrease in pulmonary CBG in CF patients. It seems, therefore, that the binding properties of CBG could be a potential tool to optimize GC treatment in CF patients.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AT and PLR performed and designed the experiments, interpreted the results, and wrote the manuscript. JT, NR, and CR performed the experiments. DD provided all of the plasmas and liver samples and wrote the manuscript. SB-L provided all the bronchial, bronchiolar, and alveolar samples and wrote the manuscript. M-PM designed the experiments and wrote the manuscript. AF helped to perform the CBG binding experiments. LG, HC, and OT interpreted the experiments and wrote the manuscript.

FUNDING

This research was funded by grants from INSERM, UPMC Paris 06 and the French non-profit organization “Vaincre la Mucoviscidose.” AT and CR received a Ph.D. fellowship from the “Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche” in France. JT obtained a grant from the French organization “La Fondation du Souffle.”

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. John Goodwin Lewis who kindly provided us with the rabbit polyclonal anti-human CBG antibody.

- Birrer, P., McElvaney, N. G., Rudeberg, A., Sommer, C. W., Liechti-Gallati, S., Kraemer, R., et al. (1994). Protease-antiprotease imbalance in the lungs of children with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150, 207–213. doi: 10.1164/ajrccm.150.1.7912987
- Chan, W. L., Zhou, A., and Read, R. J. (2014). Towards engineering hormone-binding globulins as drug delivery agents. *PLoS One* 9:e113402. doi: 10.1371/journal.pone.0113402
- Cheng, K., Ashby, D., and Smyth, R. L. (2015). Oral steroids for long-term use in cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst. Rev.* 24:CD000407. doi: 10.1002/14651858.CD000407.pub4
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159. doi: 10.1016/0003-2697(87)90021-2

- Cohn, J. A., Strong, T. V., Picciotto, M. R., Nairn, A. C., Collins, F. S., and Fitz, J. G. (1993). Localization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in human bile duct epithelial cells. *Gastroenterology* 105, 1857–1864. doi: 10.1016/0016-5085(93)91085-V
- Coolens, J. L., Van Baelen, H., and Heyns, W. (1987). Clinical use of unbound plasma cortisol as calculated from total cortisol and corticosteroid-binding globulin. *J. Steroid Biochem.* 26, 197–202. doi: 10.1016/0022-4731(87)90071-9
- Debray, D., Narkewicz, M. R., Bodewes, F., Colombo, C., Housset, C., de Jonge, H. R., et al. (2017). Cystic Fibrosis-related liver disease: research challenges and future perspectives. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 65, 443–448. doi: 10.1097/MPG.0000000000001676
- Dunn, J. F., Nisula, B. C., and Rodbard, D. (1981). Transport of steroid hormones: binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 53, 58–68. doi: 10.1210/jcem-53-1-58
- Eigen, H., Rosenstein, B. J., FitzSimmons, S., and Schidlow, D. V. (1995). A multicenter study of alternate-day prednisone therapy in patients with cystic fibrosis. Cystic fibrosis foundation prednisone trial group. *J. Pediatr.* 126, 515–523. doi: 10.1016/S0022-3476(95)70343-8
- Feranchak, A. P., and Sokol, R. J. (2001). Cholangiocyte biology and cystic fibrosis liver disease. *Semin. Liver Dis.* 21, 471–488. doi: 10.1055/s-2001-19030
- Fernandez-Real, J. M., Pugeat, M., Emptoz-Bonneton, A., and Ricart, W. (2001). Study of the effect of changing glucose, insulin, and insulin-like growth factor-I levels on serum corticosteroid binding globulin in lean, obese, and obese subjects with glucose intolerance. *Metabolism* 50, 1248–1252. doi: 10.1053/meta.2001.25647
- Gulfo, J., Ledda, A., Gea-Sorli, S., Bonjoch, L., Closa, D., Grasa, M., et al. (2016). New Roles for Corticosteroid binding globulin and opposite expression profiles in lung and liver. *PLoS One* 11:e0146497. doi: 10.1371/journal.pone.0146497
- Hammond, G. L. (1990). Molecular properties of corticosteroid binding globulin and the sex-steroid binding proteins. *Endocr. Rev.* 11, 65–79. doi: 10.1210/edrv-11-1-65
- Hammond, G. L., Smith, C. L., Goping, I. S., Underhill, D. A., Harley, M. J., Reventos, J., et al. (1987). Primary structure of human corticosteroid binding globulin, deduced from hepatic and pulmonary cDNAs, exhibits homology with serine protease inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 5153–5157. doi: 10.1073/pnas.84.15.5153
- Henley, D., Lightman, S., and Carrell, R. (2016). Cortisol and CBG - Getting cortisol to the right place at the right time. *Pharmacol. Ther.* 166, 128–135. doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.06.020
- Jacquot, J., Tabary, O., Le Rouzic, P., and Clement, A. (2008). Airway epithelial cell inflammatory signalling in cystic fibrosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 1703–1715. doi: 10.1016/j.biocel.2008.02.002
- Khan, M. S., Aden, D., and Rosner, W. (1984). Human corticosteroid binding globulin is secreted by a hepatoma-derived cell line. *J. Steroid Biochem.* 20, 677–678. doi: 10.1016/0022-4731(84)90142-0
- Lai, H. C., Kosorok, M. R., Allen, D. B., FitzSimmons, S. C., Rosenstein, B. J., Campbell, P. W., et al. (1999). Long-term growth evaluation in children with cystic fibrosis with history of regular use of alternate-day prednisone therapy. *Pediatr. Pulmonol.* 28:297.
- Leeuwen, L., Fitzgerald, D. A., and Gaskin, K. J. (2014). Liver disease in cystic fibrosis. *Paediatr. Respir. Rev.* 15, 69–74. doi: 10.1016/j.prrv.2013.05.001
- McDonald, J. A., Handelsman, D. J., Dilworth, P., Conway, A. J., and McCaughan, G. W. (1993). Hypothalamic-pituitary adrenal function in end-stage non-alcoholic liver disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 8, 247–253. doi: 10.1111/j.1440-1746.1993.tb01195.x
- Meyer, E. J., Nenke, M. A., Rankin, W., Lewis, J. G., and Torpy, D. J. (2016). Corticosteroid-Binding globulin: a review of basic and clinical advances. *Horm. Metab. Res.* 48, 359–371. doi: 10.1055/s-0042-108071
- Meyer, K. C., Lewandoski, J. R., Zimmerman, J. J., Nunley, D., Calhoun, W. J., and Dopico, G. A. (1991). Human neutrophil elastase and elastase/alpha 1-antitrypsin complex in cystic fibrosis. Comparison with interstitial lung disease and evaluation of the effect of intravenously administered antibiotic therapy. *Am. Rev. Respir. Dis.* 144, 580–585. doi: 10.1164/ajrccm/144.3_Pt_1.580
- Nährlich, L., Burkhart, M., and Wiese, B. (2016). *German CF-Registry Annual Report 2015*. Available at: https://www.muko.info/fileadmin/user_upload/angebote/qualitaetsmanagement/register/annual_report_2015.pdf
- Nenke, M. A., Holmes, M., Rankin, W., Lewis, J. G., and Torpy, D. J. (2016). Corticosteroid-binding globulin cleavage is paradoxically reduced in alpha-1 antitrypsin deficiency: implications for cortisol homeostasis. *Clin. Chim. Acta* 452, 27–31. doi: 10.1016/j.cca.2015.10.028
- Nowaczynski, W., Nakielana, E. M., Murakami, T., and Shurmans, J. (1987). The relationship of plasma aldosterone-binding globulin to blood pressure regulation in young adults with cystic fibrosis. *Clin. Physiol. Biochem.* 5, 276–286.
- Oray, M., Abu Samra, K., Ebrahimiadib, N., Meese, H., and Foster, C. S. (2016). Long-term side effects of glucocorticoids. *Expert Opin. Drug Saf.* 15, 457–465. doi: 10.1517/14740338.2016.1140743
- Pemberton, P. A., Stein, P. E., Pepys, M. B., Potter, J. M., and Carrell, R. W. (1988). Hormone binding globulins undergo serpin conformational change in inflammation. *Nature* 336, 257–258. doi: 10.1038/336257a0
- Pittman, J. E., and Ferkol, T. W. (2015). The Evolution of cystic fibrosis care. *Chest* 148, 533–542. doi: 10.1378/chest.14-1997
- Pugeat, M., Bonneton, A., Perrot, D., Rocle-Nicolas, B., Lejeune, H., Grenot, C., et al. (1989). Decreased immunoreactivity and binding activity of corticosteroid-binding globulin in serum in septic shock. *Clin. Chem.* 35, 1675–1679.
- Pugeat, M. M., Chrousos, G. P., Nisula, B. C., Loriaux, D. L., Brandon, D., and Lipsett, M. B. (1984). Plasma cortisol transport and primate evolution. *Endocrinology* 115, 357–361. doi: 10.1210/endo-115-1-357
- Pugeat, M. M., Dunn, J. F., and Nisula, B. C. (1981). Transport of steroid hormones: interaction of 70 drugs with testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 53, 69–75. doi: 10.1210/jcem-53-1-69
- Rebeyrol, C., Saint-Criq, V., Guillot, L., Riffault, L., Corvol, H., Chadelat, K., et al. (2012). Glucocorticoids reduce inflammation in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *Cell Signal.* 24, 1093–1099. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.01.005
- Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., et al. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245, 1066–1073. doi: 10.1126/science.2475911
- Simard, M., Hill, L. A., Underhill, C. M., Keller, B. O., Villanueva, I., Hancock, R. E., et al. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* elastase disrupts the cortisol-binding activity of corticosteroid-binding globulin. *Endocrinology* 155, 2900–2908. doi: 10.1210/en.2014-1055
- Sivukhina, E. V., and Jirikowski, G. F. (2014). Adrenal steroids in the brain: role of the intrinsic expression of corticosteroid-binding globulin (CBG) in the stress response. *Steroids* 81, 70–73. doi: 10.1016/j.steroids.2013.11.001
- Staufner, K., Halilbasic, E., Trauner, M., and Kazemi-Shirazi, L. (2014). Cystic fibrosis related liver disease—another black box in hepatology. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 13529–13549. doi: 10.3390/ijms150813529
- Stenbit, A. E., and Flume, P. A. (2011). Pulmonary exacerbations in cystic fibrosis. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 17, 442–447. doi: 10.1097/MCP.0b013e32834b8c04
- Vaincre la Mucoviscidose and Ined (2017). *Registre Français de la Mucoviscidose – Bilan des Données 2016*. Available at: http://www.vaincrelamuco.org/sites/default/files/registre_francais_de_la_mucoviscidose_-_bilan_des_donnees_2016.pdf
- Wiest, R., Moleda, L., Zietz, B., Hellerbrand, C., Scholmerich, J., and Straub, R. (2008). Uncoupling of sympathetic nervous system and hypothalamic-pituitary-adrenal axis in cirrhosis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 23, 1901–1908. doi: 10.1111/j.1440-1746.2008.05456.x

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Tchoukaev, Taytard, Rousselet, Rebeyrol, Debray, Blouquit-Laye, Moisan, Foury, Guillot, Corvol, Tabary and Le Rouzic. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

II. RESULTATS COMPLEMENTAIRES

1. MATERIEL ET METHODES

a. BIOPSIES ET PLASMAS

Les biopsies de foies et de poumons et les échantillons de sang ont été collectés et traités en accord avec la législation française de la santé publique (articles L.1235-2 et L.1245-2, code de la santé publique) et en accord avec la déclaration d'Helsinki. Un consentement écrit pour l'utilisation des tissus hépatiques et pulmonaires pour la recherche a été obtenu pour chaque patient ou parent.

Les biopsies hépatiques ont été collectées au cours d'une transplantation hépatique de 8 patients CF cir (19 ans \pm 2, 6 hommes et 2 femmes) et 4 patients non-CF cir (23 ans \pm 3, 2 hommes et 2 femmes) ayant développé une cirrhose par atrophie des voies biliaires.

Les lobes pulmonaires ont été obtenus à partir de 8 patients non-CF (61 ans \pm 7, 8 hommes) au cours d'une intervention chirurgicale et de 19 patients CF (30 ans \pm 7 ans, 10 hommes et 9 femmes) au cours d'une transplantation pulmonaire. Les échantillons issus des patients non-CF ont été prélevés dans les parties saines ne présentant pas d'inflammation. Après dissection des tissus, les échantillons ont été directement congelés dans de l'azote liquide avant extraction.

Les échantillons de sang ont été recueillis, entre 09h00 et 11h00 du matin, après obtention d'un consentement éclairé pour chaque patient. Le Tableau 5 résume les caractéristiques de notre cohorte de patients inclus dans l'étude plasmatique. Les échantillons ont été immédiatement centrifugés pendant 15 min à 4 000 tours par minute à 4 °C. Les plasmas ont été aliquotés et stockés à -80 °C.

		Nombre		Âge (moyenne \pm écart-type)	Hommes	Femmes
Non-CF	Sujets sains	34	23	26 \pm 5	8	15
	Cirrhose (cir)		11	12 \pm 5	5	6
CF	Sans atteinte hépatique	34	9	12 \pm 4	4	5
	Cirrhose (cir)		12	13 \pm 4	9	3
	Fibrose focale		12	12 \pm 3	9	3
	Stéatose		1	16	1	0

Tableau 5 | Âge, sexe et nombre de patients inclus dans l'étude plasmatique en fonction de leur atteinte hépatique.

b. CULTURE CELLULAIRE

La lignée hépatocytaire HepG2, dérivée d'un hépatoblastome (ATCC, LGC Standards, Molsheim, France), a été utilisée pour l'étude hépatique. Les cellules de cette lignée ont été cultivées dans un milieu MEM (*minimum essential media*), avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), HEPES (20 mM), pénicilline et streptomycine (100 U/mL) et pyruvate de sodium (1 mM). Afin d'étudier les interactions entre les hépatocytes et les cholangiocytes, nous avons utilisé les HepG2 et la lignée de cholangiocytes Mz-ChA-1, issue d'un adénocarcinome de la vésicule biliaire. Ces dernières ont été cultivées dans un milieu DMEM (*Dulbecco's modified eagle medium*), 10 % SVF, HEPES (10 mM) et pénicilline et streptomycine (100 U/mL). Ces cellules nous ont été fournies par la D^{re} Laura Fouassier. Plusieurs modèles ont été utilisés pour l'étude au niveau pulmonaire. Les lignées épithéliales bronchiques 16HBE14o- (non-CF) et CFBE41o- (CF, F508del/F508del) ont été fournies par le Dr Dieter C. Gruenert (Institute for Human Genetics, San Francisco, États-Unis) et ont été cultivées dans un milieu MEM avec 10 % de SVF et pénicilline et streptomycine (100 U/mL). Les lignées glandulaires MM39 (non-CF) et CFKM4 (CF) ont été fournies par le D^r Olivier Tabary et ont été cultivées dans un milieu DMEM/F12 avec 10 % Ultrosor G[™] et pénicilline et streptomycine (100 U/mL). Les lignées épithéliales bronchiques S9 (non-CF) et IB3-1 (CF, F508del/W1282X), achetées chez ATCC, ont été cultivées dans un milieu MEM avec 10 % de SVF et pénicilline et streptomycine (100 U/mL). Les cultures primaires d'épithélium bronchique ont été obtenues à partir de patients CF (F508del/F508del) (Epithelix SARL, Genève, Suisse). Les cellules ont été différenciées en interface air-liquide (MucilAir[™]) et ont été cultivées suivant les recommandations du fournisseur. Tous les milieux et les suppléments ont été fournis par Thermo Fisher Scientific sauf mention contraire (Illkirch-Graffenstaden, France).

Afin d'étudier les niveaux d'inflammation en cas de surexpression de CBG, nous avons mis au point un modèle cellulaire de surexpression stable de CBG. Les cellules HepG2 ont été transfectées pendant 48 h avec un plasmide de surexpression de la CBG, pCMV6-CBG-myc-ddk à 1 µg (OriGene, Herford, Allemagne), avec de la Lipofectamine[®] 3000 (Thermo Fisher Scientific). Les cellules transfectées sont ensuite repiquées dans des boîtes de Pétri et l'agent de sélection, la généticine à 800 µg/mL, est ajouté 24 h plus tard afin d'éliminer les cellules HepG2 n'ayant pas intégré le gène de résistance issu du plasmide. Les colonies résistantes se forment ensuite en 2 à 3 semaines. Après mise en culture isolée de chaque clone, les surnageants ont été collectés et utilisés pour réaliser un ELISA permettant de vérifier que les clones exprimaient bien la CBG recombinante marquée en myc. L'anticorps de capture monoclonal de souris anti-myc (05-419, Millipore, Burlington, États-Unis), dilué à 5 µg/mL dans 100 µL de PBS 1X, est fixé la nuit à 4 °C ou 1 h à température ambiante sur une plaque 96 puits. Après 3 lavages au PBS-Tween 20, 0,05 % (PBS-T), la plaque est saturée dans du

PBS-T et lait 5 % pendant 1 h. Les surnageants, dilués au 1/2 dans du PBS-T et lait 2 %, sont incubés pendant 2 h. L'anticorps de détection, l'anticorps polyclonal de lapin anti-CBG humaine fourni par le Dr John G. Lewis, est dilué au 1/1 000^e dans du PBS-T et lait 2 % et laissé 1 h. Un anticorps anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase (7074, Cell Signaling, Leyde, Pays-Bas), dilué au 1/1 000^e, est déposé et laissé 1 h. La révélation se fait par dépôt de TMB (3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine) laissé pendant 20 min à l'obscurité. La réaction est arrêtée par de l'acide sulfurique 2N. La lecture se fait à 450 nm (fluostar OPTIMA, BMG Labtech, France). Quatre clones ont été ainsi sélectionnés pour la suite des études, les clones HepG2-C1, HepG2-C5, HepG2-C8 et HepG2-C16.

Afin d'étudier la régulation de la CBG, les cellules HepG2, 16HBE et CFBE ont été stimulées avec différentes molécules : des cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-1 β , IL-6 ou IL-8 recombinantes humaines, des molécules anti-inflammatoires dexaméthasone (dex) et hydrocortisone, des facteurs de virulence LPS et flagelline de *Pseudomonas aeruginosa*, ou une molécule pro-fibrosante TGF- β 1 (*transforming growth factor β 1*). Les cytokines pro-inflammatoires ont été fournies par ImmunoTools GmbH (Friesoythe, Allemagne), le TGF- β 1 par PeproTech (Rocky Hill, États-Unis), la flagelline par InvivoGen (San Diego, États-Unis) et la dexaméthasone, l'hydrocortisone et le LPS par Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Les cellules ont été lavées au PBS 1X (*phosphate buffered saline*) puis placées 24 h avant la stimulation dans un milieu de culture sans SVF (déprivation) et ont été stimulées dans un milieu déprivé. Les temps et les concentrations des molécules utilisées sont indiqués sur chaque figure.

Afin d'étudier une potentielle communication entre cholangiocytes et hépatocytes, nous avons stimulé les cellules HepG2 avec un milieu conditionné de cellules Mz-ChA-1 (Figure 24).

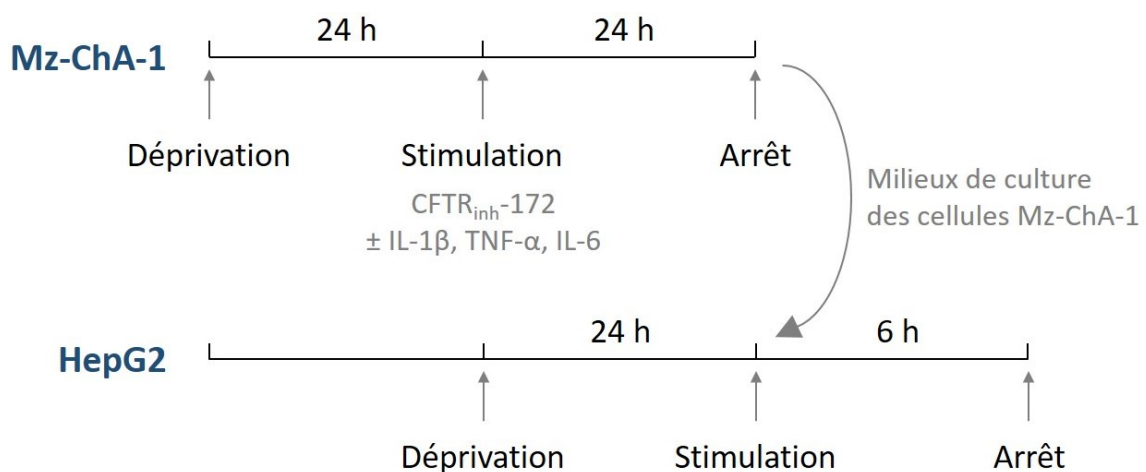


Figure 24 | Protocole de stimulation des cellules HepG2 par le milieu conditionné des cellules Mz-ChA-1.

Les cellules Mz-ChA-1 ont été stimulées pendant 24 h avec un inhibiteur fonctionnel de CFTR (CFTR_{inh}-172, VWR International, Pessac, France) à 5 et 10 μ M, avec ou sans cytokines pro-inflammatoires IL-1 β (10 ng/mL), TNF- α (10 ng/mL) ou IL-6 (10 ng/mL). Le milieu de culture a ensuite été prélevé pour être déposé sur les cellules HepG2 qui ont été ainsi stimulées pendant 6 h.

Afin de déterminer l'influence de l'expression de l'AAT sur celle de la CBG hépatique, nous avons transfecté les cellules HepG2 pendant l'ensemencement avec un siRNA (*small interferin RNA*) dirigé contre le gène de l'AAT (*SERPINA1*) à la concentration de 10 nM pendant 48 h (s10457, Ambion, Thermo Fisher Scientific).

Afin d'inhiber l'expression de CFTR, les cellules 16HBE ont été transfectées avec un siRNA *CFTR* (s2946, Ambion, Thermo Fisher Scientific) à une concentration de 10 nM avec l'agent de transfection HiPerfect (Qiagen, Courtaboeuf, France) pendant 48 h.

c. EXTRACTION DES ARN TOTAUX

L'extraction des ARN totaux à partir des biopsies pulmonaires a suivi le protocole précédemment décrit (Tchoukaev *et al.* 2018).

A partir des expériences sur les lignées cellulaires, les ARN totaux ont été extraits à l'aide du kit NucleoSpin® II (Macherey Nagel, Duren, Allemagne), en suivant les recommandations du fournisseur, pour un volume final de 40 μ L. La concentration en ARN des échantillons a été déterminée à l'aide d'un NanoDrop.

d. TRANSCRIPTION INVERSE ET PCR SEMI-QUANTITATIVE

La transcription inverse (RT) a été réalisée en utilisant l'enzyme rétrotranscriptase MMLV (*moloney murine leukemia virus*, 8 U/ μ L), en présence de *random primers* pour les études hépatiques ou d'oligo(dT) pour les études pulmonaires (20 μ g/ μ L), dNTP (0,5 mM), inhibiteur de RNase (1,6 U/ μ L) et tampon 1X (tous les réactifs sont fournis par Promega, Lyon, France). Le volume réactionnel de 25 μ L est incubé pendant 1 h à 37 °C.

Les niveaux de transcrits ont été évalués par qPCR (*quantitative polymerase chain reaction*) en utilisant des sondes TaqMan™ CBG (Hs01547823_m1), IL-8 (Hs00174103_m1) AAT (Hs01097800_m1), GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, Hs02786624_g1) et HPRT (hypoxanthine phosphoribosyltransférase, Hs02800695_m1) (Applied Biosystems). Les niveaux

transcriptionnels de CBG, d'AAT et d'IL-8 ont été normalisés à ceux de l'HPRT au niveau hépatique et à ceux de la GAPDH au niveau pulmonaire. Pour chaque gène et chaque condition, la qPCR est réalisée en duplicat. 1 µl d'ADNc est mis en présence de TaqMan™ Fast Universal PCR Master Mix 2X (Thermo Fisher Scientific) dans un volume réactionnel final de 10 µl. Les qPCR sont effectuées avec le thermocycler StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific) et analysées avec le logiciel StepOnePlus v2.2.2.

e. EXPERIENCE DE LIAISON DE LA CBG

La capacité de liaison de la CBG pour le cortisol a été mesurée à 4 °C par des expériences de liaison de cortisol radiomarqué sur une phase solide constituée de concanavoline A-sépharose (Tchoukaev *et al.* 2018). Brièvement, après absorption des glucocorticoïdes endogènes sur du charbon, la CBG a été adsorbée sur une phase solide de concanavoline A-sépharose. L'albumine, protéine non glycosylée, n'est pas retenue et est éliminée avec la phase aqueuse. Une compétition entre du ³H-cortisol à une concentration donnée, et du cortisol non marqué, à différentes concentrations, a lieu sur la phase solide. La capacité de liaison de la CBG pour le cortisol est calculée par une analyse de Scatchard où le « lié » correspond à la quantité de cortisol liée aux glycoprotéines adsorbées sur le gel et le « libre » à la concentration de cortisol dans la phase aqueuse.

f. ELISA

Les dosages d'IL-6 et de cortisol plasmatiques ont été réalisés par ELISA selon les recommandations des fournisseurs à partir des kits HS600B (R&D Systems bio-technie, Minneapolis, Etats-Unis) et EIAHCOR (Thermo Fisher Scientific) respectivement.

g. WESTERN BLOT

Les protéines de foies ont été extraites, réduites et séparées sur gel comme décrit précédemment (Tchoukaev *et al.* 2018). Le Western blot réalisé ensuite suit le protocole établi dans l'article. L'anticorps de souris anti-AAT humain a été utilisé au 1/2 000^e (référence : sc-166018, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Allemagne).

h. ANALYSES STATISTIQUES

Sur les graphiques en nuage de points, la barre horizontale représente la moyenne. Sur les histogrammes, les valeurs sont représentées par la moyenne \pm écart-type. Les valeurs statistiquement aberrantes ont été enlevées après un test de Grubb, réalisé en ligne sur le site <https://www.graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>. Les données sont comparées par un test t de Student pour comparer deux groupes et par un test ANOVA suivi d'un test de Bonferroni lorsque plus de deux groupes sont comparés. Un test non paramétrique de Mann-Whitney a été réalisé pour comparer les moyennes de cortisol plasmatique. La corrélation réalisée a été faite selon la corrélation de Pearson. Toutes les analyses ont été réalisées sur le logiciel GraphPad Prism version 7 où $p < 0,05$ était considéré comme significatif. Pour chaque figure, la différence significative est représentée de la façon suivante : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$.

2. REGULATION DE LA CBG HEPATIQUE

Afin de comprendre l'augmentation de la CBG hépatique, observée dans nos biopsies issues de patients CF, nous avons étudié la régulation de cette CBG dans des modèles *in vitro* stimulés par différentes molécules.

a. REGULATION EN CONDITIONS PRO-INFLAMMATOIRES

Notre première hypothèse était que l'inflammation pouvait être responsable de l'augmentation de CBG, constatée dans les foies de patients CF. Des données de la littérature datant des années 1990 semblent indiquer que l'inflammation pourrait réguler l'expression de la CBG (Bartalena *et al.* 1993, Emptoz-Bonneton *et al.* 1997). Mais cette régulation dépendrait de la dose et de la molécule considérée et repose sur une mesure des transcrits par Northern blot. Nous avons réévalué l'impact de l'inflammation avec une technique plus précise, la PCR quantitative, et en stimulant la même lignée hépatocytaire, les HepG2, avec différentes molécules pro-inflammatoires.

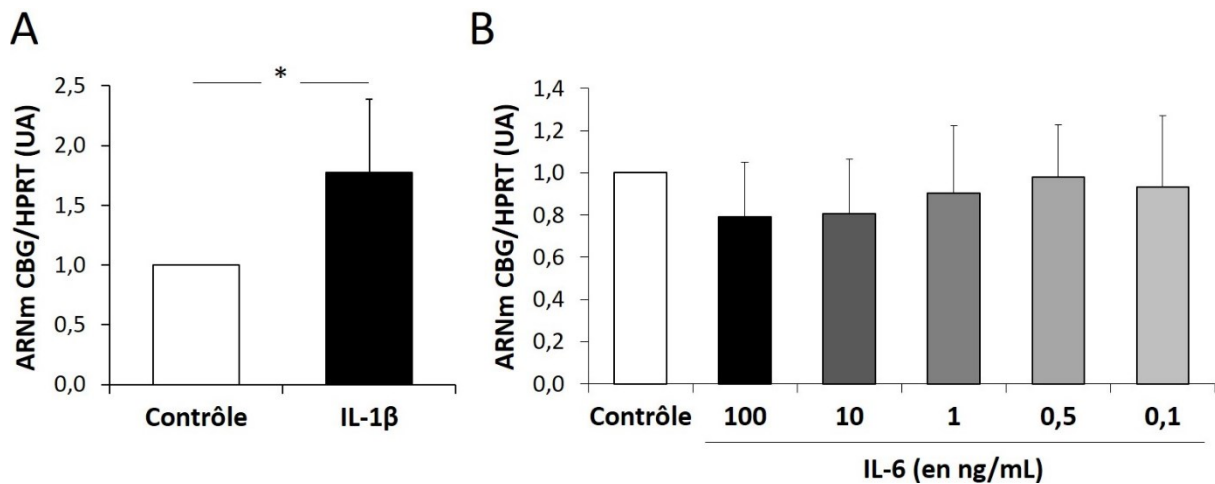


Figure 25 | Régulation de la CBG hépatique par l'IL-1 β et l'IL-6. **A)** Mesure des transcrits de CBG normalisés à ceux de l'HPRT, après stimulation de la lignée hépatocytaire HepG2 pendant 6 h par l'IL-1 β à 10 ng/mL (n = 5). * p < 0,05 **B)** Mesure des transcrits de CBG normalisés à ceux de l'HPRT, après stimulation de la lignée hépatocytaire HepG2 pendant 6 h par l'IL-6 (de 0,1 à 100 ng/mL) (n = 5).

Nous avons d'abord testé les molécules utilisées dans la littérature : l'IL-1 β et l'IL-6. Des études de dose-réponse réalisées au laboratoire avec l'IL-1 β indiquent que la dose de 10 ng/mL est la plus efficace (données non montrées). Il s'agit également d'une des doses les plus efficaces de l'article d'Emptoz-Bonneton et de ses collaborateurs (Emptoz-Bonneton *et al.* 1997). A cette dose, on observe une augmentation des transcrits de CBG de 78 % (Figure 25A). En revanche, l'IL-6 ne semble pas avoir d'effet sur la transcription de CBG, quelle que soit la dose utilisée (Figure 25B).

Nous avons souhaité stimuler les HepG2 avec d'autres molécules pro-inflammatoires dont le TNF- α et l'IL-8, ce dernier étant un marqueur de l'inflammation dans le contexte de la mucoviscidose.

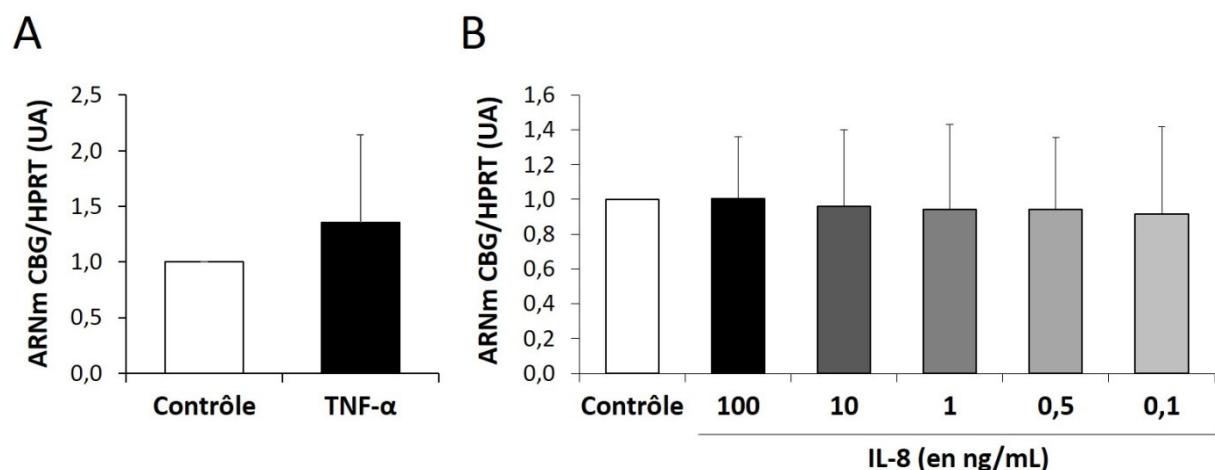


Figure 26 | Régulation de la CBG hépatique par le TNF- α et l'IL-8. **A)** Mesure des transcrits de CBG normalisés à ceux de l'HPRT, après stimulation de la lignée hépatocytaire HepG2 pendant 6 h avec du TNF- α à 10 ng/mL (n = 5). **B)** Mesure par qPCR des transcrits de CBG normalisés à ceux de l'HPRT, après stimulation de la lignée hépatocytaire HepG2 pendant 6 h par l'IL-8 (de 0,1 à 100 ng/mL) (n = 4).

Nos données montrent que le TNF- α , à sa dose la plus efficace, et l'IL-8, quelle que soit la dose utilisée, n'ont pas d'effet sur l'expression de la CBG (Figure 26).

Malgré la confirmation de la régulation de la CBG par l'IL-1 β , l'ensemble de nos données semble montrer que l'inflammation n'a pas d'effet significatif sur l'expression de la CBG au niveau hépatique.

b. REGULATION EN CONDITIONS ANTI-INFLAMMATOIRES

A l'inverse, nous avons voulu étudier la régulation de la CBG en conditions anti-inflammatoires. Les patients CF sont en effet régulièrement traités par des anti-inflammatoires qui pourraient avoir un impact sur l'expression de la CBG au niveau hépatique.

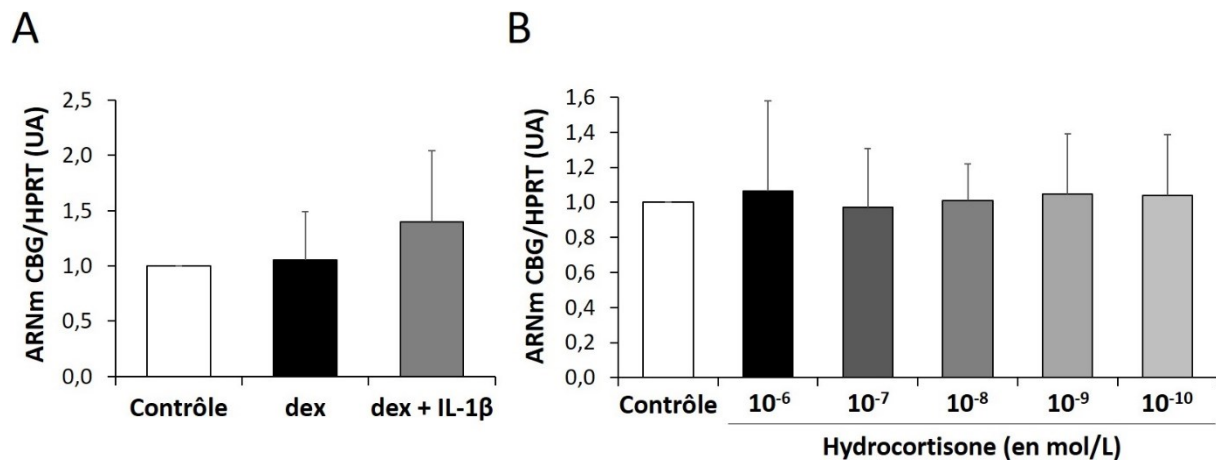


Figure 27 | Régulation de la CBG hépatique en conditions anti-inflammatoires. **A)** Mesure des transcrits de CBG normalisés à ceux de l'HPRT, après stimulation de la lignée hépatocytaire HepG2 pendant 6 h avec de la dexaméthasone (dex à 10⁻⁵ M) \pm IL-1 β (10 ng/mL) (n = 5). **B)** Mesure des transcrits de CBG normalisés à ceux de l'HPRT, après stimulation de la lignée hépatocytaire HepG2 pendant 6 h avec de l'hydrocortisone (10⁻⁶ à 10⁻¹⁰ mol/L) (n = 4).

La dexaméthasone, un GC de synthèse, et l'hydrocortisone n'ont pas d'effet sur la synthèse de CBG, quelle que soit la dose utilisée (Figure 27). Nous avons également stimulé nos cellules avec une cytokine anti-inflammatoire, l'IL-4, sans voir d'effet sur la transcription de CBG (données non montrées). Nos résultats montrent de manière intéressante que la co-stimulation des HepG2 par la dexaméthasone et l'IL-1 β abroge l'effet inducteur de l'IL-1 β sur l'expression de CBG (Figure 27A). Il semblerait donc que la réponse anti-inflammatoire seule n'ait pas d'effet sur la régulation de la CBG, mais qu'elle puisse atténuer celui de la réponse pro-inflammatoire.

c. REGULATION EN CONDITIONS PRO-INFECTIEUSES

Les patients CF étant régulièrement infectés par des pathogènes, nous avons voulu ensuite déterminer si l'infection pouvait être à l'origine de l'augmentation de la CBG observée chez ces patients. Nous avons donc stimulé nos cellules HepG2 avec du LPS et de la flagelline de *P. aeruginosa*, principal pathogène retrouvé dans les voies aériennes des patients CF.

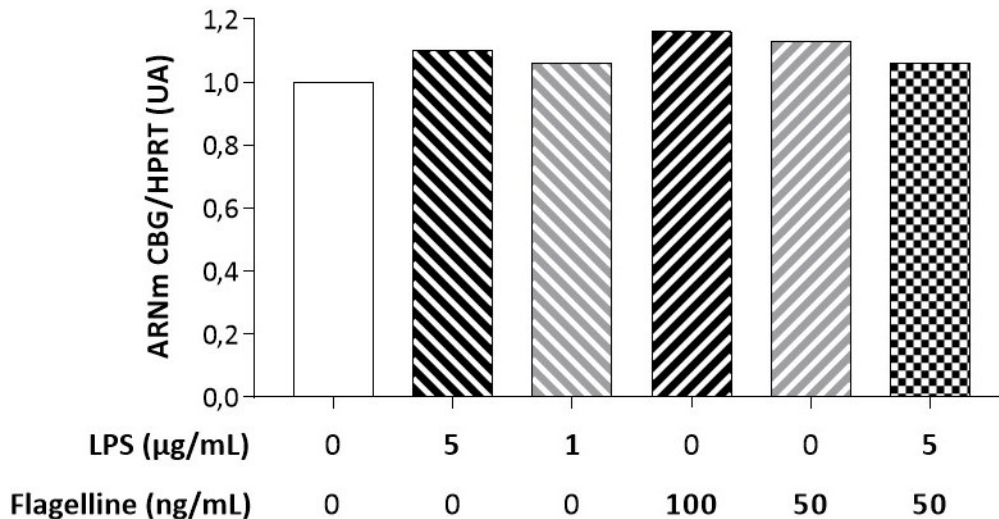


Figure 28 | Effet du LPS et de la flagelline de *P. aeruginosa* sur l'expression de CBG. Mesure des transcrits de CBG normalisés à ceux de l'HPRT, après stimulation de la lignée hépatocytaire HepG2 pendant 24 h avec du LPS et/ou de la flagelline de *P. aeruginosa* (n = 2).

Nos résultats montrent que les deux facteurs de virulence testés pendant 24 h, seuls ou en combinaison, n'ont aucun effet sur la transcription de la CBG au niveau hépatique (Figure 28). Nous avons obtenu les mêmes résultats pour des stimulations sur 6 h (données non montrées). L'infection par *P. aeruginosa* ne semble donc pas influencer l'expression de la CBG hépatique.

d. REGULATION EN CONDITION PRO-FIBROSANTE

L'augmentation de CBG observée chez les patients CF a été mesurée dans des foies qui étaient cirrhotiques. Ces foies avaient donc subi une profonde réorganisation architecturale par développement d'une fibrose ayant évolué ensuite en cirrhose. Le TGF- β 1, molécule pro-fibrosante, a été associé à la fibrose hépatique et a été directement impliqué dans la mise en place de la CFLD (Lewindon *et al.* 2002). Nous avons donc décidé de regarder si ce facteur était responsable de l'augmentation de CBG, en stimulant nos cellules HepG2 avec cette molécule.

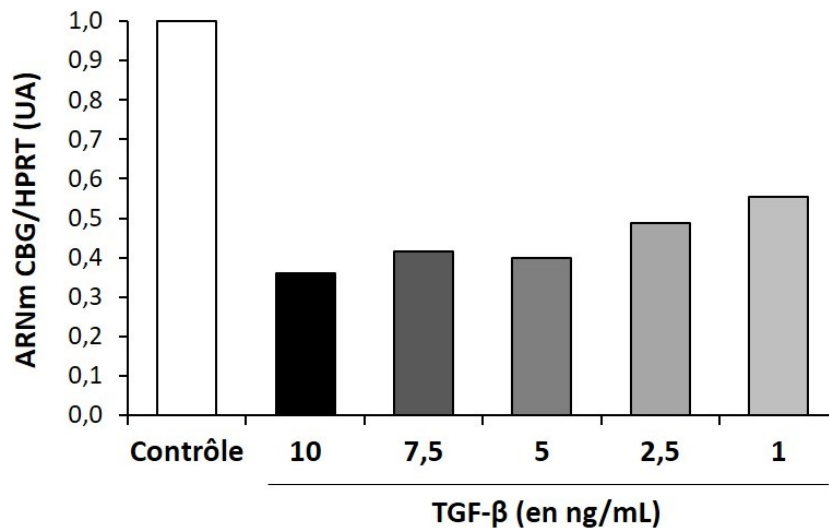


Figure 29 | Effet du TGF-β1 sur l'expression de CBG. Mesure des transcrits de CBG normalisés à ceux de l'HPRT, après stimulation de la lignée hépatocytaire HepG2 pendant 20 h avec du TGF-β1 (de 1 à 10 ng/mL) (n = 1).

De manière surprenante, le TGF-β1 fait diminuer les niveaux de transcrits de CBG de 44 % à 64 % (Figure 29). Une tendance à la diminution avait également été observée pour des stimulations de 6 h (données non montrées). Cet effet a été accentué par une stimulation sur 20 h (Figure 29). La mise en place de la CFLD chez les patients CF ne semble donc pas être responsable de l'augmentation de CBG.

e. EFFET DE L'INHIBITION DE CFTR DANS LES CHOLANGIOCYTES

Au niveau hépatique, la CBG est exprimée et sécrétée par les hépatocytes (Khan *et al.* 1984), tandis que le canal CFTR est uniquement exprimé par les cholangiocytes (Cohn *et al.* 1993). L'augmentation de CBG dans les foies de patients CF ne semblent donc pas être une conséquence directe du dysfonctionnement de CFTR, au sein d'une même cellule. Nous avons émis l'hypothèse que le dysfonctionnement de CFTR au niveau des cholangiocytes puisse induire l'expression d'un messenger induisant, à son tour, l'augmentation de CBG au niveau des hépatocytes. Nous avons inhibé l'activité de CFTR dans les cholangiocytes par un inhibiteur spécifique, le CFTR_{inh}-172 (Melis *et al.* 2014). Le milieu de culture de ces cellules a ensuite été déposé sur les HepG2 pour y étudier la variation d'expression de la CBG.

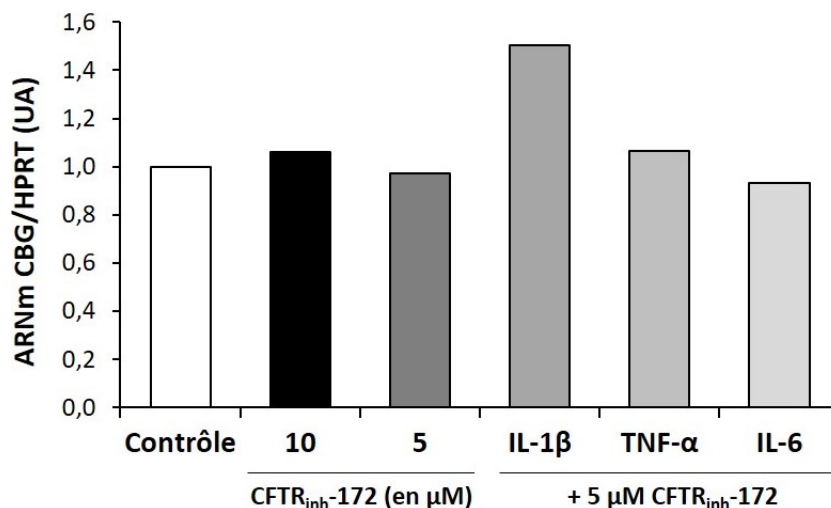


Figure 30 | Effet de l'inhibition de CFTR dans les cholangiocytes sur l'expression de CBG au niveau hépatocytaire. Mesure des transcrits de CBG normalisés à ceux de l'HPRT, après stimulation de la lignée hépatocytaire HepG2 pendant 6 h avec un milieu conditionné, déposé pendant 24 h sur la lignée de cholangiocytes Mz-ChA-1, contenant CFTR_{inh}-172 (5 ou 10 μM) ± IL-1β (10 ng/mL), TNF-α (10 ng/mL) ou IL-6 (10 ng/mL) (n = 1).

L'inhibition de l'activité de CFTR au niveau des cholangiocytes par le CFTR_{inh}-172 n'a pas d'effet sur l'expression de la CBG au niveau des hépatocytes (Figure 30). La co-stimulation du CFTR_{inh}-172 avec des molécules pro-inflammatoires montre les mêmes résultats sur l'expression de CBG, que lorsque les cellules sont stimulées avec ces molécules pro-inflammatoires seules (Figure 30). Les mêmes résultats ont été obtenus pour une stimulation de 24 h des cellules HepG2 (données non montrées). Le défaut d'activité de CFTR au niveau des cholangiocytes ne serait donc pas à l'origine de l'augmentation de CBG observée chez les patients CF.

f. EFFET DE LA SUREXPRESSION DE CBG SUR L'INFLAMMATION

Enfin, nous nous sommes intéressés à la conséquence de l'augmentation de CBG sur l'inflammation dans nos cellules hépatocytaires. Nous avons donc comparé les niveaux d'expression d'IL-8 entre la lignée HepG2 et des clones transfectés de manière stable avec un plasmide de surexpression de la CBG.

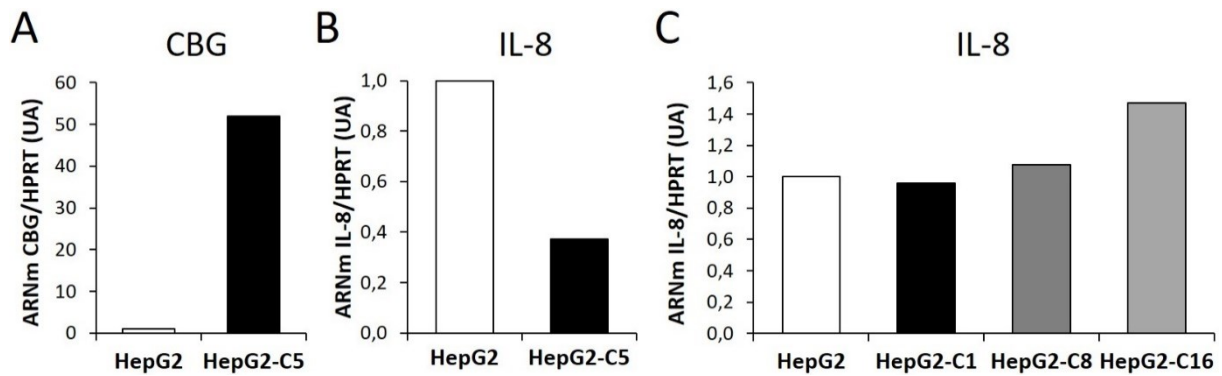


Figure 31 | Effet de la surexpression de la CBG sur les niveaux d'IL-8. **A)** Mesure des transcrits de CBG normalisés à ceux de l'HPRT dans les cellules HepG2 et HepG2-C5 (n = 2). **B)** Mesure des transcrits d'IL-8 normalisés à ceux de l'HPRT dans les cellules HepG2 et HepG2-C5 (n = 2). **C)** Mesure des transcrits d'IL-8 normalisés à ceux de l'HPRT dans les cellules HepG2, HepG2-C1, HepG2-C8 et HepG2-C16 (n = 2).

Dans les cellules HepG2-C5, on mesure une surexpression de 52 fois de la CBG en transcrits (Figure 31A). Cette surexpression est associée à une diminution de 63 % des transcrits d'IL-8 (Figure 31B). Pourtant, la même mesure, réalisée sur d'autres clones de surexpression, montre que les transcrits d'IL-8 peuvent être stables ou augmentés selon le clone considéré (Figure 31C). L'étude de l'effet de la surexpression de CBG sur l'inflammation semble donc difficile par ce modèle.

3. RESULTATS COMPLEMENTAIRES SUR LE PLASMA

a. EFFET DE L'ATTEINTE HEPATIQUE SUR LE TAUX DE CBG PLASMATIQUE

Nous n'avons pas trouvé de différences de concentration plasmatique de CBG entre les patients CF et non-CF (Tchoukaev *et al.* 2018). Les données de la littérature indiquent que l'atteinte hépatique, et en particulier la cirrhose, pourrait faire chuter cette concentration (McDonald *et al.* 1993). Nous avons séparé nos patients en fonction de leur atteinte hépatique afin de déterminer l'impact de cette manifestation dans notre cohorte.

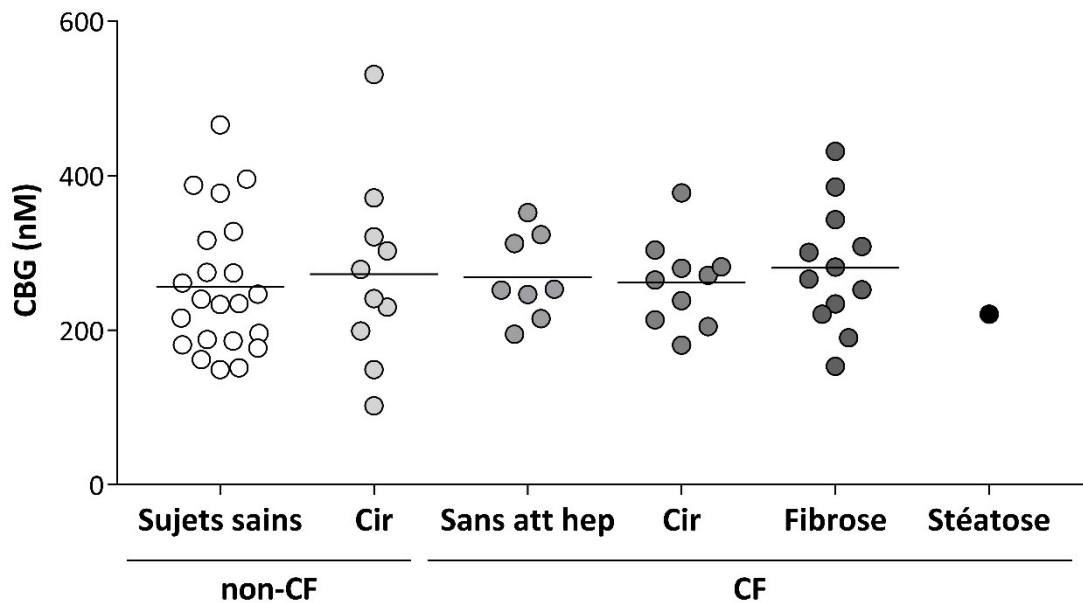


Figure 32 | Mesure de la CBG dans les plasmas de patients CF et non-CF en fonction de leur atteinte hépatique. Mesure de la concentration de CBG dans les plasmas de patients non-CF (sujets sains, n = 22 ; cirrhose ou cir, n = 10) et CF (sans atteinte hépatique ou sans att hep, n = 8 ; cirrhose ou cir, n = 10 ; fibrose hépatique, n = 12 ; stéatose, n = 1).

Les résultats de la Figure 32 montrent qu’avec ou sans atteinte hépatique, quelle qu’elle soit, la moyenne du taux de CBG plasmatique ne varie pas chez les patients CF et non-CF. Le statut hépatique de nos sujets ne semble donc pas influencer le taux de CBG plasmatique dans notre cohorte.

b. EFFET DU DIMORPHISME SEXUEL SUR LE TAUX DE CBG PLASMATIQUE

Des études indiquent que le taux plasmatique de CBG est inchangé entre hommes et femmes (Moore *et al.* 1978), tandis que d’autres affirment que ce taux est plus élevé chez les femmes (Fernandez-Real *et al.* 2005). Nous nous sommes donc intéressés à cette potentielle différence au sein de notre cohorte.

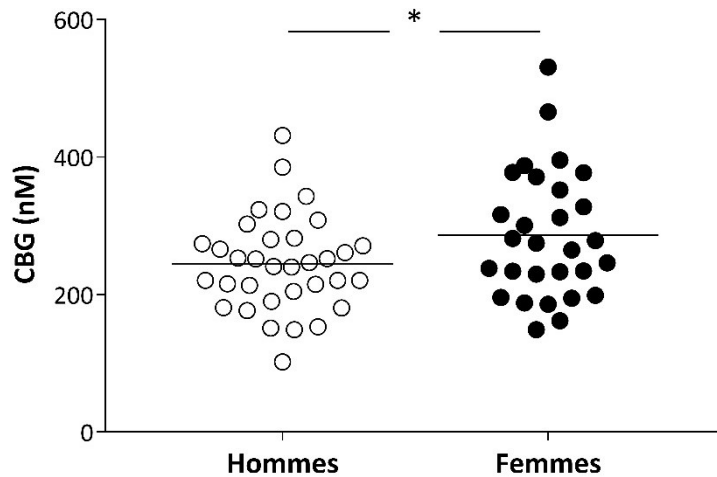


Figure 33 | Mesure de la CBG dans les plasmas des hommes (n = 34) et des femmes (n = 29). * p < 0,05

Nous avons mesuré une concentration plasmatique moyenne de CBG chez les hommes de 245,4 nM ± 69,0 et chez les femmes de 288,3 nM ± 92,6 (Figure 33). Dans notre cohorte, la concentration de CBG plasmatique est donc plus élevée chez les femmes que chez les hommes.

c. MESURE DE L'IL-6

Les patients atteints de mucoviscidose sont régulièrement en état d'exacerbation pulmonaire, état définissant un épisode aigu de détérioration clinique. Ces périodes sont notamment marquées par une élévation de cytokines pro-inflammatoires au niveau plasmatique, telles que l'IL-6 et la CRP (protéine C réactive) (Shoki *et al.* 2013). Nous étions en particulier intéressés par la mesure de l'IL-6 dans nos plasmas, cette cytokine ayant été montrée comme un inhibiteur de la synthèse et de la sécrétion de CBG (Emptoz-Bonneton *et al.* 1997).

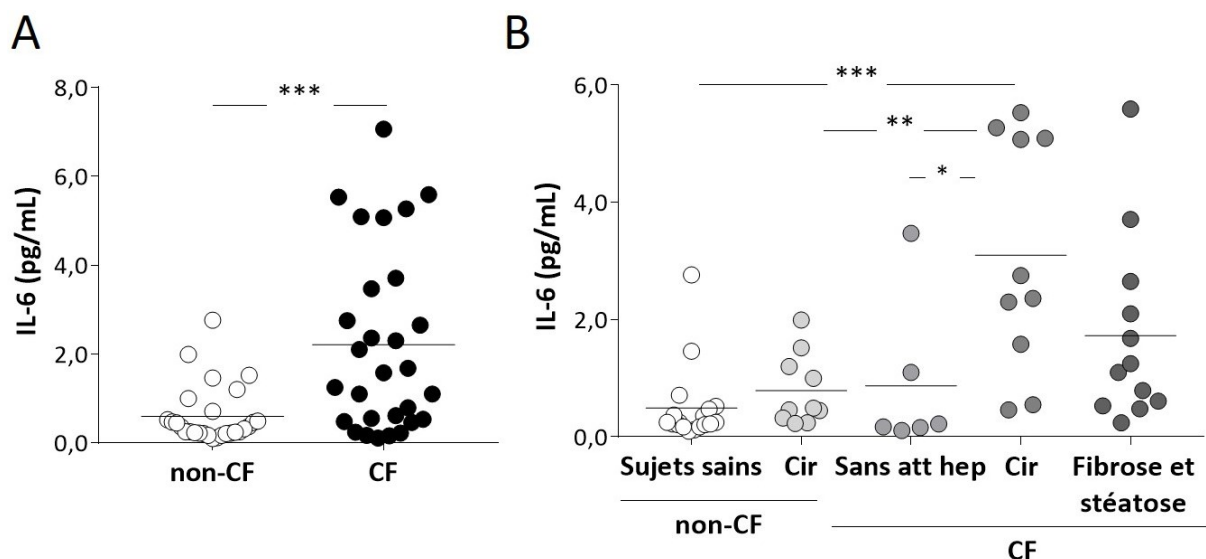


Figure 34 | Mesure de la concentration plasmatique d'IL-6 chez les patients non-CF et CF, en fonction de l'atteinte hépatique ou non. **A)** Mesure de l'IL-6 plasmatique chez des patients non-CF (n = 28) et CF (n = 29). **B)** Mesure de l'IL-6 plasmatique en fonction de l'atteinte hépatique chez des patients non-CF (sujets sains, n = 18 ; cirrhotiques ou cir, n = 10) et CF (sans atteinte hépatique ou sans att hep, n = 6 ; cirrhose ou cir, n = 10 ; avec une fibrose ou une stéatose, n = 11). * p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001

Sur notre cohorte, l'IL-6 plasmatique est augmentée chez les patients CF comparée aux non-CF (non-CF : 0,6 pg/mL \pm 0,6 ; CF : 2,2 pg/mL \pm 2,0) (Figure 34A). La grande hétérogénéité de la mesure de ce taux chez les patients CF nous a poussés à déterminer quel sous-groupe de patients CF présentait le taux d'IL-6 plasmatique le plus élevé. En séparant nos patients CF en fonction de leur atteinte hépatique, nous avons trouvé que les patients CF cirrhotiques avaient le taux le plus élevé d'IL-6 avec une moyenne de 3,10 pg/mL \pm 1,99, tandis que la moyenne n'est que de 0,49 pg/mL \pm 0,65 chez les sujets sains (Figure 34B).

Des études ont de plus montré une corrélation entre le taux plasmatique de CBG et celui de l'IL-6 en cas de choc septique : plus le taux d'IL-6 est élevé et plus celui de la CBG est faible (Beishuizen *et al.* 2001). Jamais étudié dans le cadre de la mucoviscidose, nous nous sommes intéressés à l'analyse de cette corrélation dans notre cohorte.

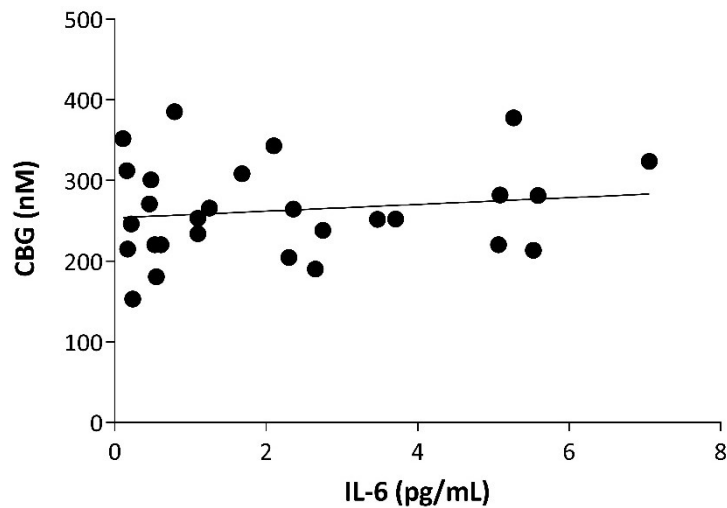


Figure 35 | Corrélation entre le taux d'IL-6 et le taux de CBG dans les plasmas de patients CF (n = 28).

La corrélation effectuée au sein de notre cohorte montre que les taux plasmatiques d'IL-6 et de CBG ne sont pas corrélés dans le contexte de la mucoviscidose ($p = 0,4517$) (Figure 35).

d. MESURE DU CORTISOL TOTAL

La CBG est la protéine d'adressage et de transport du cortisol. Ayant montré que le taux de CBG plasmatique chez nos patients CF était conservé, nous avons voulu vérifier que le taux de cortisol était lui aussi bien conservé dans notre cohorte.

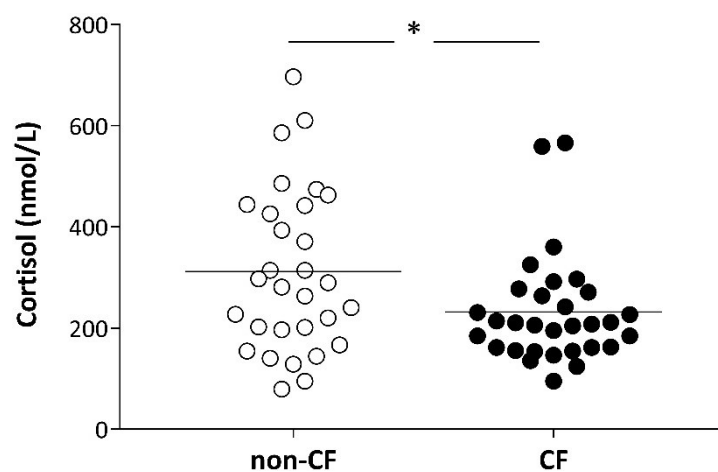


Figure 36 | Mesure du cortisol total plasmatique chez les patients non-CF (n = 30) et CF (n = 31). * $p < 0,05$

La Figure 36 montre que le taux plasmatique de cortisol total est abaissé chez les patients CF, passant de $311,4 \text{ nmol/L} \pm 160,8$ à $231,3 \text{ nmol/L} \pm 107,2$ (Figure 36).

4. REGULATION DE LA CBG PULMONAIRE

Afin de mieux comprendre la diminution de CBG pulmonaire observée chez les patients CF, il nous a fallu étudier sa régulation, jusqu'alors inconnue.

a. EXPRESSION DE LA CBG DANS DIFFERENTS MODELES CELLULAIRES

Plusieurs modèles cellulaires étaient disponibles au laboratoire afin d'étudier la CBG pulmonaire. Nous avons mesuré l'expression de la CBG dans ces modèles.

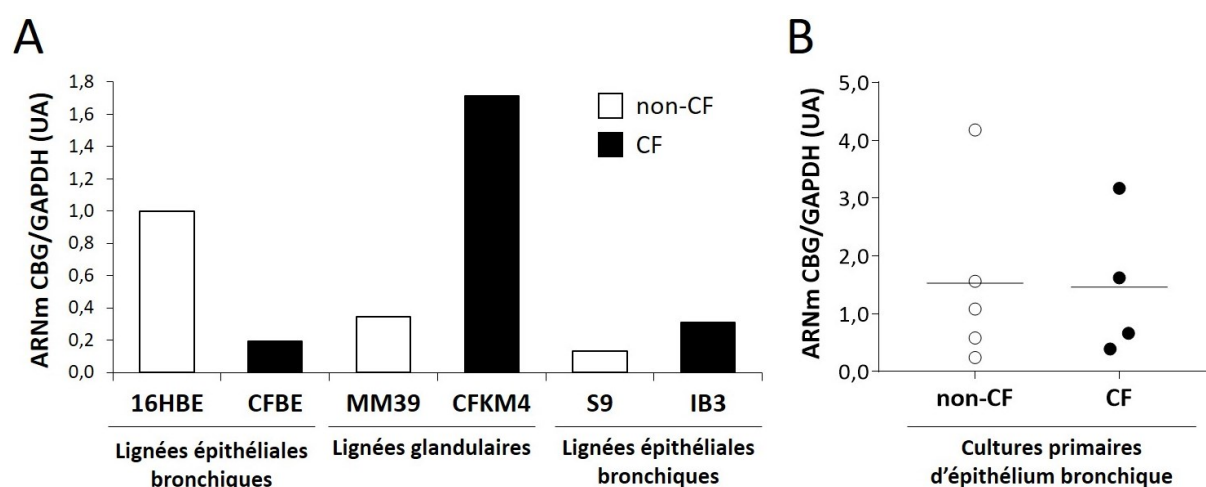


Figure 37 | Expression de la CBG pulmonaire dans différents modèles cellulaires non-CF et CF. **A)** Mesure des transcrits de CBG normalisés à ceux de la GAPDH, dans des lignées épithéliales bronchiques non-CF (16HBE et S9) et CF (CFBE et IB3) et une lignée glandulaire non-CF (MM39) et CF (CFKM4) (n = 1). **B)** Mesure des transcrits de CBG normalisés à ceux de la GAPDH dans des cultures primaires d'épithélium bronchique non-CF (n = 5) et CF (n = 4).

L'étude des lignées non-CF et CF révèle que, seul chez le couple 16HBE/CFBE, l'expression de CBG est diminuée chez le modèle CF (Figure 37A). La même mesure effectuée dans des cultures primaires issues d'épithélium bronchique de patients non-CF et CF ne montre aucune différence des transcrits moyens de CBG (Figure 37B). Le modèle des 16HBE et CFBE nous est apparu comme étant le meilleur modèle cellulaire afin d'étudier la CBG pulmonaire, les variations de CBG à l'état basal reproduisant la diminution de CBG observée dans les biopsies pulmonaires des patients CF.

b. REGULATION EN CONDITIONS PRO- ET/OU ANTI-INFLAMMATOIRES

L'inflammation pourrait être responsable de la diminution de CBG au niveau pulmonaire. Nous avons donc étudié l'expression de CBG dans une lignée bronchique non-CF (16HBE) et CF (CFBE) stimulé par des molécules pro- et/ou anti-inflammatoires.

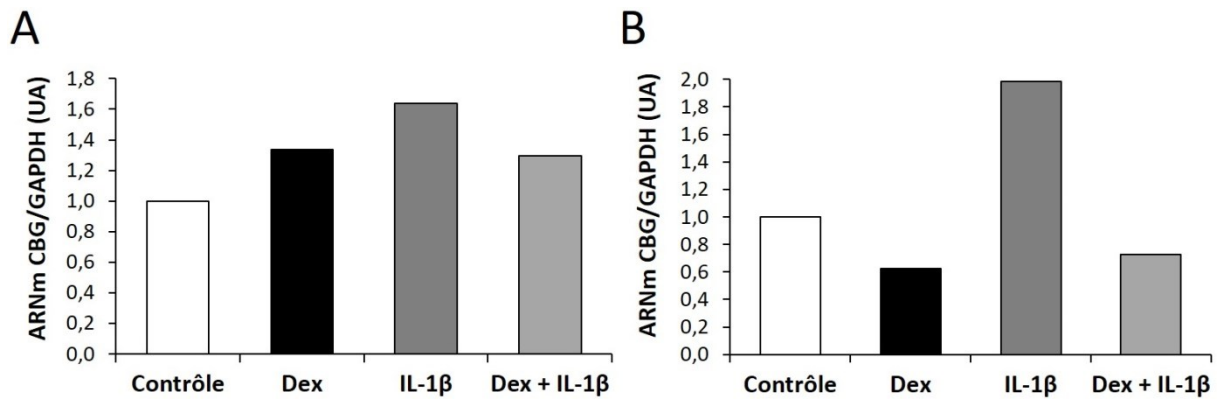


Figure 38 | Régulation de la CBG pulmonaire en conditions pro- et/ou anti-inflammatoires. **A)** Mesure des transcrits de CBG normalisés à ceux de la GAPDH, après stimulation de la lignée bronchique non-CF 16HBE pendant 6 h avec de la dexaméthasone (dex, 10^{-5} μ M) \pm IL-1 β (10 ng/mL) (n = 2). **B)** Mesure des transcrits de CBG normalisés à ceux de la GAPDH, après stimulation de la lignée bronchique CF CFBE pendant 6 h avec de la dexaméthasone (dex, 10^{-5} μ M) \pm IL-1 β (10 ng/mL) (n = 2).

Nous avons observé une tendance à l'augmentation de l'expression de CBG en condition pro-inflammatoire dans les cellules non-CF (d'un facteur 1,64) et CF (d'un facteur 2) (Figure 38). La même tendance a été obtenue avec une stimulation par du TNF- α (données non montrées). La dexaméthasone semble faire diminuer les transcrits de CBG dans les cellules CF, mais pas dans les cellules non-CF (Figure 38). L'inflammation semble donc stimuler la synthèse de CBG pulmonaire tandis qu'un contexte anti-inflammatoire la ferait diminuer dans un modèle CF.

c. EFFET DE L'INHIBITION DE CFTR

La diminution de la CBG au niveau pulmonaire chez les patients CF pourrait être la conséquence de l'absence d'un canal CFTR fonctionnel à la membrane apicale des cellules épithéliales pulmonaires. Pour tester cette hypothèse, nous avons mesuré l'expression de la CBG dans les cellules 16HBE transfectées avec un siRNA dirigé contre *CFTR*.

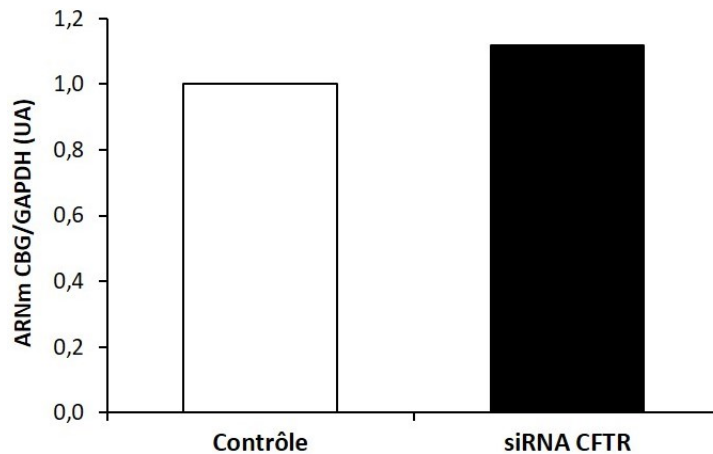


Figure 39 | Effet de l'inhibition de l'expression de CFTR par siRNA sur l'expression de CBG pulmonaire. Mesure des transcrits de CBG normalisés à ceux de la GAPDH, après transfection de la lignée bronchique non-CF 16HBE avec un siRNA dirigé contre *CFTR* (10 nM pendant 48 h) (n = 1).

La Figure 39 montre que l'inhibition de l'expression de CFTR par un siRNA ne semble pas modifier l'expression de la CBG pulmonaire. La diminution de CBG observée chez les patients CF ne serait donc pas la conséquence d'un défaut d'expression du canal CFTR à la membrane apicale.

5. ETUDE DE L'AAT AU NIVEAU HEPATIQUE ET PULMONAIRE

L'AAT a pour première fonction d'inhiber l'élastase des neutrophiles. Elle est produite majoritairement par le foie mais également par le poumon. L'AAT est une serpine de 52 kDa et est le membre le plus étudié de la famille des serpins. Elle a été intensément caractérisée dans le contexte de la mucoviscidose, où un déséquilibre AAT et élastase au niveau du poumon a été constaté chez les patients CF (McElvaney 2016). A ce niveau, les taux très élevés d'élastase submergent l'AAT qui est alors incapable d'inhiber totalement l'élastase. De manière intéressante, le gène de l'AAT (*SERPINA1*) a été décrit comme un gène modificateur de l'atteinte hépatique chez les patients CF (Bartlett *et al.* 2009). Cela suggère un rôle majeur de l'AAT à la fois dans la lutte contre l'inflammation pulmonaire mais également dans la gravité de l'atteinte hépatique. Il nous a ainsi paru intéressant de compléter nos données par l'étude de son expression dans le contexte de la mucoviscidose.

a. EXPRESSION DE L'AAT DANS LES FOIES DE PATIENTS CF

Aucune étude de la littérature ne s'est intéressée à l'expression de l'AAT au niveau hépatique chez les patients CF. Nous avons donc décidé de mesurer l'expression de cette serpine dans nos biopsies.

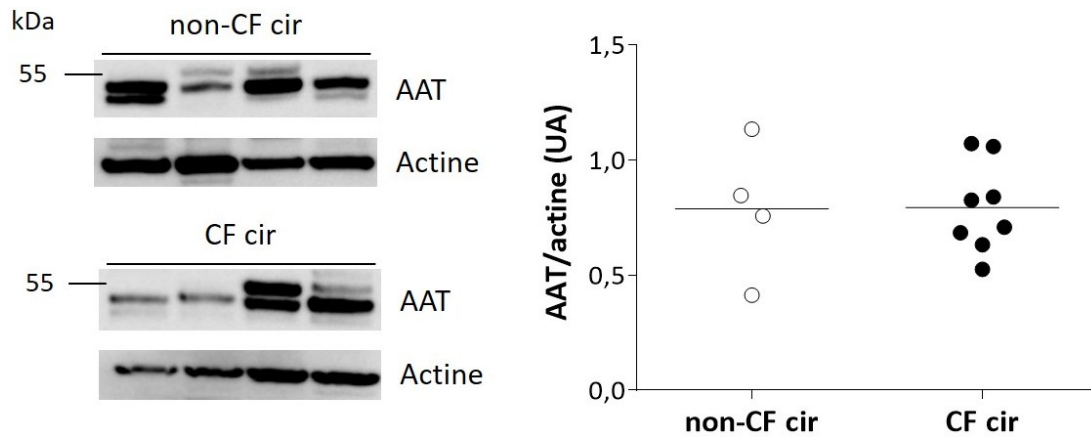


Figure 40 | Expression de l'AAT dans les foies de patients non-CF et CF. Expression de la protéine AAT mesurée par Western blot et normalisée à celle de la β -actine chez des patients non-CF cir (n = 4) et des patients CF cir (n = 8). Un point représente la quantité d'AAT normalisée à celle de la β -actine pour chaque patient.

La quantification de nos membranes montre des moyennes identiques de l'expression d'AAT entre les patients CF et non-CF (Figure 40). Il ne semble donc pas y avoir de variations de l'expression hépatique de l'AAT dans le contexte de la mucoviscidose.

b. PATRON D'EXPRESSION DE L'AAT PULMONAIRE

L'inflammation et le déséquilibre protéases/anti-protéases au niveau pulmonaire nous ont conduits à étudier également l'expression de l'AAT pulmonaire. Afin de déterminer, dans un premier temps, dans quelle partie du poumon s'exprimait l'AAT, nous avons étudié son expression dans nos trois niveaux de biopsies. Nous ne l'avons mesurée que par qPCR afin d'éviter une potentielle contamination par l'AAT hépatique qui circule et pourrait être retrouvée au niveau pulmonaire.

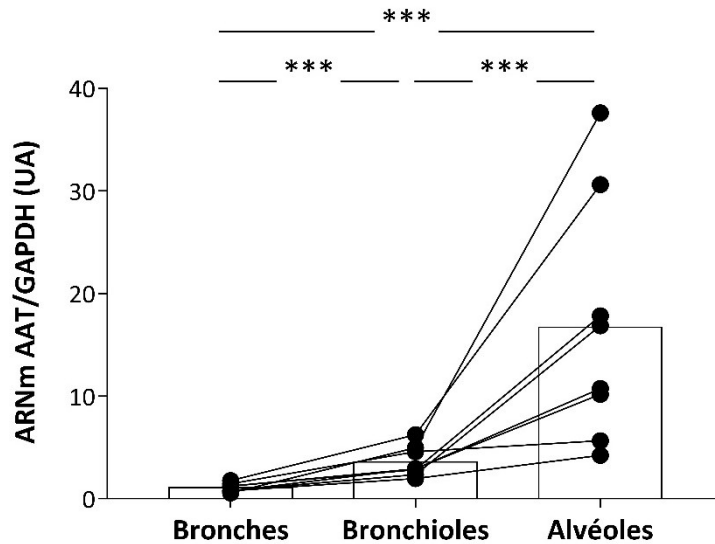


Figure 41 | Patron d'expression de l'AAT pulmonaire. Mesure des transcrits d'AAT normalisés à ceux de la GAPDH, dans des biopsies bronchiques, bronchiolaires et alvéolaires issues de 8 patients non-CF. Un point représente la quantité relative des transcrits de l'AAT normalisés à la moyenne bronchique. Les points reliés représentent les données collectées pour un même patient. *** p < 0,001

Nous avons mesuré une expression moyenne d'AAT au niveau bronchique de 1,07, au niveau bronchiolaire de 3,60 et au niveau alvéolaire de 16,71 en unité arbitraire. L'AAT pulmonaire semble donc être majoritairement exprimée au niveau alvéolaire (Figure 41).

C. EXPRESSION DE L'AAT DANS LES POUMONS DE PATIENTS CF

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'expression de l'AAT pulmonaire chez les patients CF. La littérature semble indiquer que son expression est augmentée afin de pallier l'augmentation d'élastase au niveau pulmonaire, mais aucune étude ne l'a démontrée.

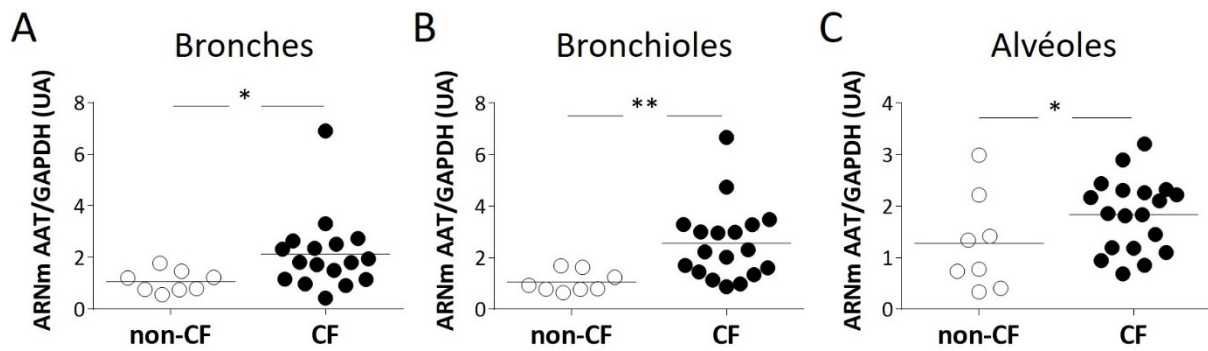


Figure 42 | Mesure de l'AAT pulmonaire dans les poumons de patients CF. **A)** Mesure des transcrits l'AAT normalisés à ceux de la GAPDH, au niveau bronchique, à partir de biopsies de patients non-CF (n = 8) et CF (n = 17). **B)** Mesure des transcrits de l'AAT normalisés à ceux de la GAPDH, au niveau bronchiolaire, à partir de biopsies de patients non-CF (n = 8) et CF (n = 18). **C)** Mesure des transcrits de l'AAT normalisés à ceux de la GAPDH, au niveau alvéolaire, à partir de biopsies de patients non-CF (n = 8) et CF (n = 19). * p < 0,05 et ** p < 0,01

Chez les patients CF, nous avons trouvé que les transcrits d'AAT étaient augmentés d'un facteur 2 au niveau bronchique, d'un facteur 2,4 au niveau bronchiolaire et d'un facteur 1,4 au niveau alvéolaire, par rapport aux patients non-CF (Figure 42).

d. ETUDE DE L'INFLUENCE DE L'EXPRESSION DE L'AAT SUR CELLE DE LA CBG

Les gènes *SERPINA1* et *SERPINA6* ont une homologie de séquence de 40 % et sont tous les deux compris dans un même locus de 90 kb (Namciu *et al.* 2004). Cette étroite relation a amené à poser l'hypothèse selon laquelle ces deux gènes auraient évolué à partir d'une duplication d'un gène ancestral commun (Seralini *et al.* 1990). L'expression d'un gène pourrait réguler celle de l'autre. Pour tester cette hypothèse, nous avons transfecté des cellules HepG2 avec un siRNA dirigé contre le gène de l'AAT (*SERPINA1*) et nous avons mesuré l'expression de la CBG par qPCR.

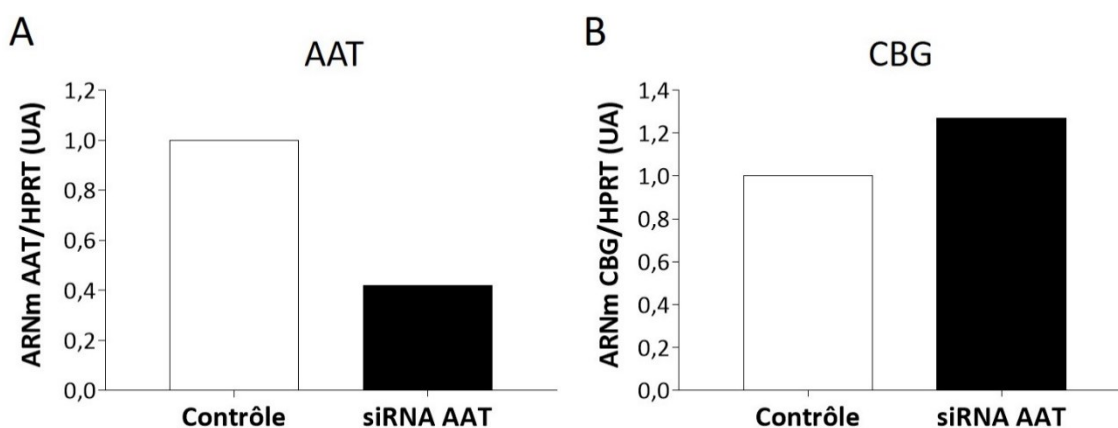


Figure 43 | Effet de l’inhibition d’expression de l’AAT par siRNA sur l’expression de la CBG. **A)** Mesure des transcrits de l’AAT normalisés à ceux de l’HPRT, après transfection des cellules hépatocytaires HepG2 avec un siRNA dirigé contre la *SERPINA1* ou un contrôle négatif à 10 nM pendant 48 h (n = 2). **B)** Mesure des transcrits de la CBG normalisés à ceux de l’HPRT, après transfection des cellules hépatocytaires HepG2 avec un siRNA dirigé contre la *SERPINA1* ou un contrôle négatif à 10 nM pendant 48 h (n = 2).

Les résultats de la Figure 43 montrent que la transfection du siRNA dirigé contre la *SERPINA1* (AAT) a été efficace et a fait diminuer de 58 % les niveaux de transcrits de l’AAT (Figure 43A). L’expression de la CBG ne semble cependant pas modifiée, avec seulement une très légère augmentation de 27 % (Figure 43B). Les variations d’expression d’AAT ne semblent donc pas faire varier l’expression de la CBG au niveau hépatique.

6. PROBLEMES RENCONTRES

Plusieurs problèmes techniques se sont présentés à nous et ont empêché des études plus poussées, notamment au niveau protéique et au niveau pulmonaire.

a. ANTICORPS ANTI-CBG NON SPECIFIQUES

Le principal problème rencontré durant le développement du projet a été l’absence d’anticorps spécifiques de la CBG sur le marché. Nous avons testé trois anticorps produits par Abnova (Paris, France) (H00000866-M04, H00000866-B01P, H00000866-M01), un par RayBiotech (Norcross, Etats-Unis) (119-13848) et un par Thermo Fisher Scientific (PA5-24229).

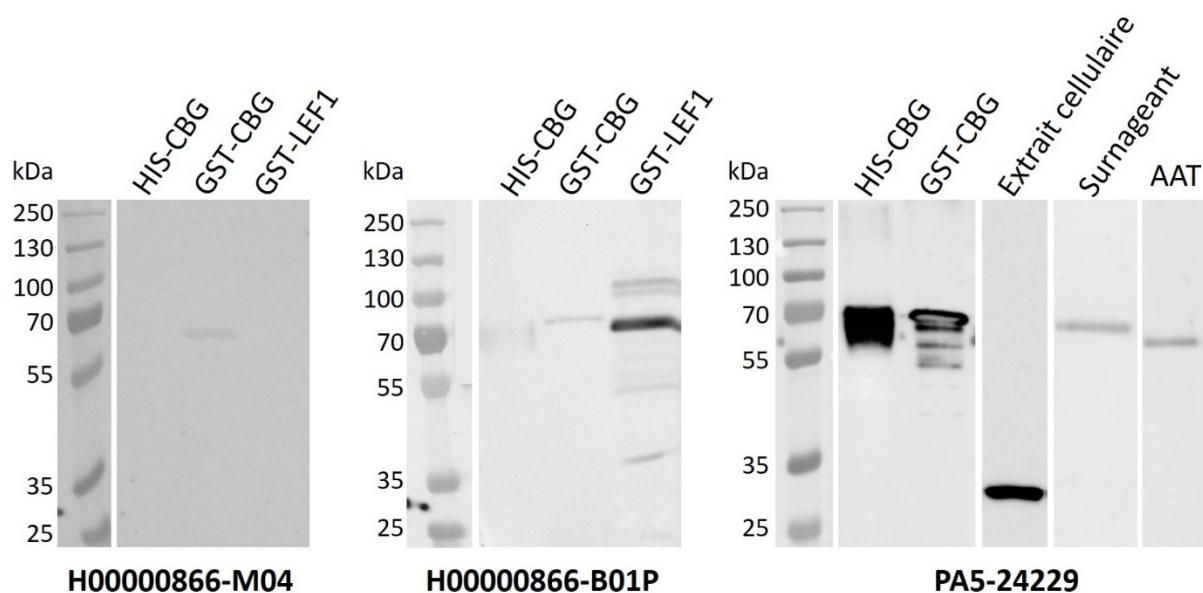


Figure 44 | Western blots représentatifs des anticorps anti-CBG disponibles sur le marché. Western blots révélés par les anticorps H00000866-M04, H00000866-B01P et PA5-24229, après dépôt de protéines recombinantes humaines AAT ou CBG (possédant un tag polyhistidine, HIS ou glutathione S-transferase, GST) ou LEF1 (*lymphoid enhancer-binding factor 1* possédant un tag GST) ou dépôt d'extrait cellulaire ou de surnageant de culture cellulaire HepG2.

Certains des anticorps vendus et commercialisés pour la détection de CBG humaine par Western blot n'ont pas reconnu les CBG recombinantes. C'est le cas de l'anticorps H00000866-M04 (Figure 44). D'autres les reconnaissent très faiblement, mais sont également capables de reconnaître fortement notre contrôle négatif, la protéine LEF1 (anticorps H00000866-B01P) (Figure 44). L'anticorps PA5-24229 a été capable de reconnaître nos protéines recombinantes, mais a révélé une bande d'environ 30 kDa dans les extraits cellulaires issus des HepG2 (Figure 44). Pourtant, selon ses glycosylations, la CBG a un poids moléculaire compris entre 42 et 70 kDa. Nos données montrent de plus que cet anticorps reconnaît également l'AAT recombinante humaine (Figure 44). Les anticorps testés et issus du marché ne semblaient donc pas être assez spécifiques afin d'étudier la CBG.

Il est intéressant de noter que l'anticorps H00000866-B01P a également été vendu par Tebu-bio (Le Perray-en-Yvelines, France) comme anticorps de détection pour un kit ELISA de dosage de la CBG (SERPINA6 Human Matched Antibody Pair). Des tests de dilutions de notre protéine CBG recombinante, réalisés avec ce kit, montraient déjà un défaut de spécificité (données non montrées). Ce kit ELISA a depuis été retiré de la vente sur nos recommandations.

Nous avons ensuite contacté le D^r John G. Lewis qui a mis au point en 2011 des anticorps non commercialisés anti-CBG humaine (Lewis et Elder 2011). Ces anticorps sont des outils largement exploités dans la littérature puisque de nombreuses publications les utilisent actuellement, et ce,

principalement pour des expériences d'ELISA. Le D^r Lewis nous a fait parvenir quatre anticorps dont les caractéristiques sont présentées dans le Tableau 6.

Nom	Type	Hôte	Epitope reconnu
9G12	Monoclonal IgG2a	Souris	RCL non clivé de la CBG
6B10	Monoclonal IgM	Souris	RCL non clivé de la CBG
12G2	Monoclonal IgG1	Souris	Epitope conformationnel de la CBG en dehors du RCL
	Polyclonal	Lapin	Epitope en dehors du RCL (reconnaît la CBG clivée et non clivée)

Tableau 6 | Caractéristiques des anticorps fournis par le D^r John G. Lewis.

Les anticorps nous ont été recommandés par le D^r John G. Lewis pour des expériences d'ELISA ou de Western blot, sauf pour l'anticorps conformationnel 12G2 inutilisable en Western blot.

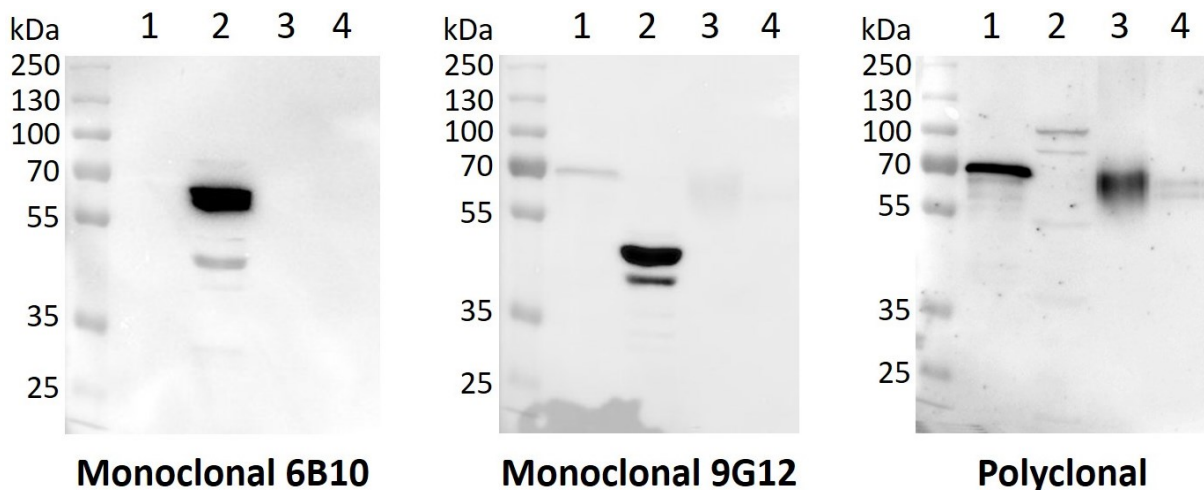


Figure 45 | Western blots réalisés avec les anticorps anti-CBG fournis par le D^r John G. Lewis. Western blots révélés par les anticorps monoclonaux 6B10 et 9G12 et l'anticorps polyclonal du D^r John G. Lewis. 1 : GST-CBG ; 2 : GST-LEF1 ; 3 : HIS-CBG ; 4 : AAT.

Les anticorps monoclonaux 6B10 et 9G12 reconnaissent tous les deux le contrôle négatif et à des tailles différentes (puits 2, Figure 45). Les protéines recombinantes humaines CBG sont reconnues par l'anticorps 9G12 (très faiblement) et par l'anticorps polyclonal (fortement) (puits 1 et 3, Figure 45). La suite de nos études par Western blot s'est poursuivie avec l'utilisation de cet anticorps polyclonal, étant le seul anticorps à reconnaître les CBG recombinantes sans reconnaître la protéine LEF1.

La Figure 45 montre également que cet anticorps polyclonal peut reconnaître, assez faiblement, l'AAT (puits 4, Figure 45). Afin de tester la reconnaissance de cette protéine, nous avons transfecté les cellules HepG2 avec un siRNA contrôle ou un siRNA dirigé contre la *SERPINA1* (AAT).

Les extraits cellulaires et les surnageants ont été déposés sur gel et le Western blot a été révélé par l'anticorps polyclonal.

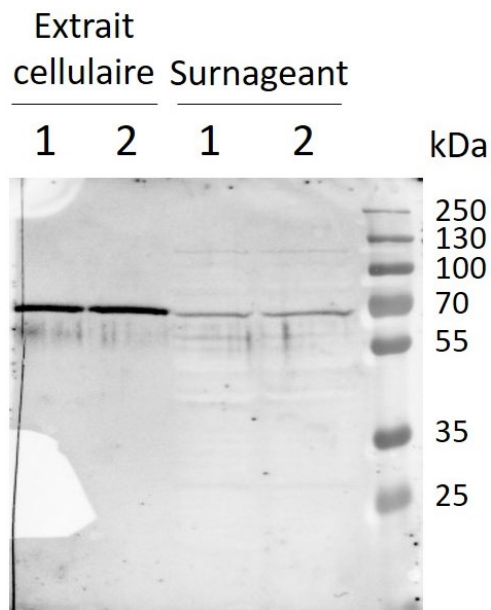


Figure 46 | Western blot réalisé avec l'anticorps polyclonal après transfection d'un siRNA dirigé contre la *SERPINA1*. Les cellules HepG2 ont été transfectées avec un siRNA contrôle (1) ou un siRNA dirigé contre la *SERPINA1* (AAT) (2). Les extraits cellulaires et les surnageants ont été révélés par l'anticorps polyclonal de lapin fourni par le D^r John G. Lewis.

La transfection du siRNA dirigé contre la *SERPINA1* ne fait pas varier la bande révélée par l'anticorps polyclonal, dans les extraits cellulaires et dans les surnageants de nos cellules (Figure 46). L'anticorps polyclonal ne reconnaît qu'avec une très faible affinité l'AAT et aurait donc une préférence pour la CBG.

Ces anticorps ont également été testés en ELISA. La littérature actuelle autour de la CBG propose, en effet, un ELISA utilisant l'anticorps polyclonal en tant qu'anticorps de capture et l'anticorps 12G2 ou 9G12 en tant qu'anticorps de détection (Lewis et Elder 2011). Dans nos conditions de laboratoire, l'anticorps 9G12 a été incapable de reconnaître notre protéine recombinante HIS-CBG par ELISA (données non montrées). Le dosage de la CBG dans nos plasmas de patients par ELISA, en utilisant l'anticorps 12G2 ou le 6B10, a nécessité une dilution de ces échantillons au 1/50 000^e et au 1/1 000^e respectivement, afin d'obtenir un signal dosable. La dilution de plasma recommandée était de 1/20^e. Les valeurs de CBG plasmatiques que nous avons mesurées étaient ainsi comprises entre 8 000 et 15 000 nM (données non montrées). Ces valeurs étant aberrantes, nous n'avons pas pu utiliser cette technique pour mesurer la CBG dans les plasmas de notre cohorte.

b. EXPRESSION FAIBLE DE LA CBG PULMONAIRE

La CBG est principalement synthétisée par le foie mais des sites secondaires ont également été trouvés, où l'expression de la CBG semble y être faible. Aucune étude ne s'était intéressée à la régulation de la CBG pulmonaire dans des modèles *in vitro*. Nos premiers résultats sur les modèles pulmonaires ont montré une expression très faible de la CBG pulmonaire avec des Ct, obtenus par qPCR, compris entre 33 et 36 cycles (données non montrées). Nous avons réalisé plusieurs mises au point dans le but d'améliorer ce signal.

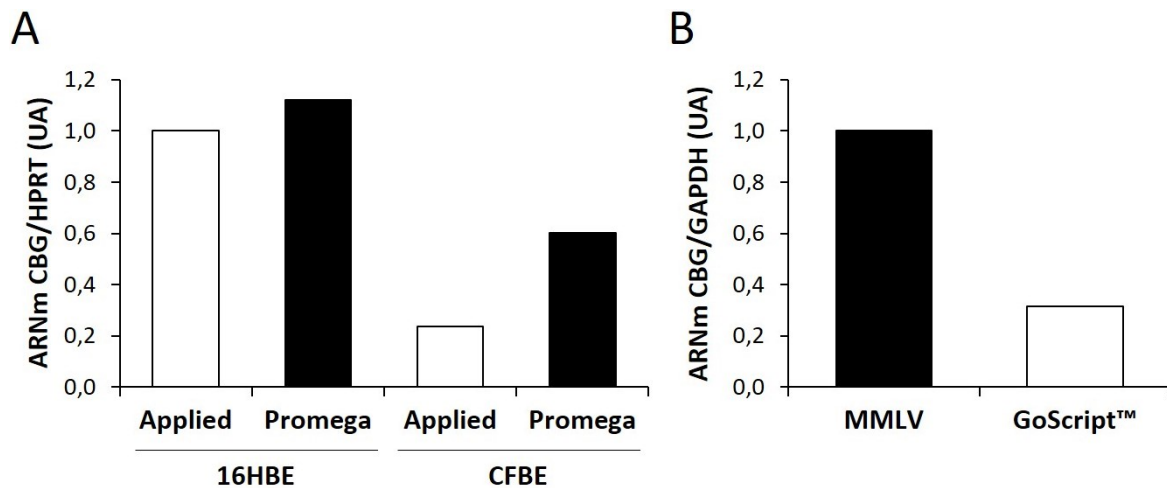


Figure 47 | Amélioration du protocole de RT sur les lignées pulmonaires. **A)** Mesure des transcrits de CBG normalisés à ceux de l'HPRT sur des cellules bronchiques non-CF (16HBE) et CF (CFBE), après une RT du kit Promega ou une RT du kit Applied Biosystems (ABI high-capacity cDNA kit) (n = 1). **B)** Mesure des transcrits de CBG normalisés à ceux de la GAPDH sur des cellules bronchiques non-CF (16HBE), après une RT Promega avec comme enzyme, la MMLV ou la GoScript™ (n =2).

Nos résultats montrent que sur les cellules 16HBE et CFBE, le kit de RT Promega amplifie mieux les transcrits de CBG que le kit de RT d'Applied Biosystems (Figure 47A). Promega proposait également une reverse transcriptase plus sensible que l'enzyme MMLV, l'enzyme GoScript™. L'enzyme GoScript™ est pourtant moins efficace dans nos cellules 16HBE pour amplifier les transcrits de CBG, avec 68 % de transcrits moins amplifiés (Figure 47B). Les mêmes résultats ont été obtenus pour les cellules CFBE (données non montrées). Nous avons de plus décidé de réaliser nos RT avec des sondes oligo(dT) plutôt que des sondes *random primer* afin de cibler plus spécifiquement les ARNm. Le meilleur protocole de RT pour étudier l'expression de la CBG est donc l'utilisation de produits de RT de Promega, avec une reverse transcriptase MMLV et des oligo(dT). Malgré ces améliorations, le signal détecté en qPCR dans nos études est resté faible avec des Ct toujours compris entre 33 et 36.

La faible expression de CBG au niveau pulmonaire a rendu également les études protéiques difficiles. Les Western blots réalisés avec l'anticorps polyclonal du D^r John G. Lewis n'ont en effet

révélé aucune bande sur les extraits cellulaires ou sur les surnageants de cellules 16HBE et CFBE (données non montrées).

C. LE MODELE SOURIS CF

Afin d'établir le patron d'expression de la CBG, nous avons prélevé différents organes chez des souris WT (*wild type*) et CF (F508del/F508del) et avons mesuré par qPCR l'expression de CBG.

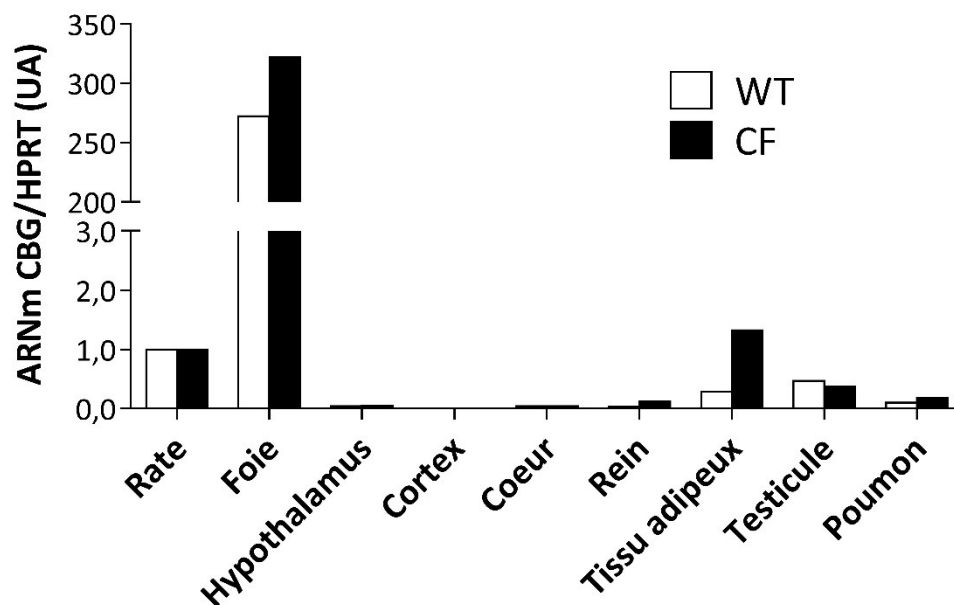


Figure 48 | Patron d'expression de la CBG dans 9 organes chez les souris WT et CF. Mesure des transcrits de CBG normalisés à ceux de l'HPRT dans la rate, le foie, l'hypothalamus, le cortex, le cœur, le rein, le tissu adipeux, les testicules et le poumon de souris WT (n = 3) et CF (n = 3).

La CBG est principalement exprimée dans le foie des souris (Figure 48). Elle est ensuite retrouvée environ 300 fois moins exprimée au niveau de la rate, et elle est également exprimée plus faiblement au niveau des testicules, du tissu adipeux et des poumons (Figure 48). Les transcrits de CBG ont été détectés au niveau de l'hypothalamus, du cœur et des reins (Figure 48). Le patron d'expression de l'AAT a également été établi et est identique à celui de la CBG (données non montrées).

Ayant montré une différence d'expression de CBG entre les patients CF et non-CF, au niveau hépatique et pulmonaire, nous étions intéressés par l'étude de son expression dans les foies et les poumons de souris CF.

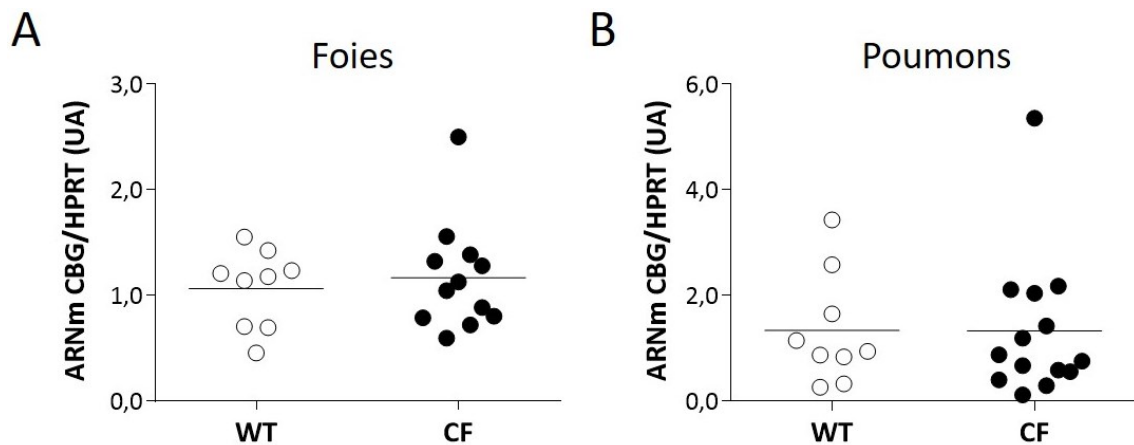


Figure 49 | Mesure de la CBG dans les foies et les poumons de souris WT et CF. **A)** Mesure des transcrits de CBG normalisés à ceux de l'HPRT dans les foies de souris WT (n = 9) et CF (n = 12). **B)** Mesure des transcrits de CBG normalisés à ceux de l'HPRT dans les poumons de souris WT (n = 9) et CF (n = 14).

Les transcrits de CBG ne varient pas entre les souris WT et CF, au niveau hépatique (Figure 49A) ainsi qu'au niveau pulmonaire (Figure 49B). Les mêmes résultats ont été obtenus pour des mesures de transcrits d'AAT dans ces deux organes (données non montrées). L'absence de différence d'expression de CBG entre les souris WT et CF montre que le modèle souris CF ne reproduit pas les résultats retrouvés chez les patients. Ces résultats soulignent ainsi la limite d'utilisation de ce modèle pour notre projet.

DISCUSSION

La déficience de CFTR au niveau pulmonaire, chez les patients atteints de mucoviscidose, entraîne une altération de l'équilibre hydro-sodé du liquide de surface des voies aériennes conduisant à une altération de la clairance mucociliaire. Des cycles d'infection et d'inflammation se mettent en place, induisant la destruction progressive de l'épithélium des voies aériennes qui aboutit à une insuffisance respiratoire. Des traitements anti-inflammatoires sont proposés aux patients afin de limiter cette dégradation. Les principales molécules utilisées chez les patients atteints de mucoviscidose sont les glucocorticoïdes. Pourtant, leur administration est accompagnée d'effets secondaires importants. Ces derniers pourraient être diminués par l'utilisation de la protéine de transport et d'adressage spécifique des glucocorticoïdes, la CBG.

L'objectif de ce travail était d'étudier la CBG chez les patients CF, afin de déterminer si la CBG pourrait être utilisée comme outil thérapeutique dans le traitement par GC.

I. EXPRESSION ET REGULATION DE LA CBG HEPATIQUE

Nous nous sommes intéressés, dans un premier temps, à l'expression de CBG chez les patients CF au niveau hépatique, la CBG étant principalement produite par le foie. Nous avons montré une augmentation de CBG chez les patients CF cirrhotiques, au niveau transcriptionnel et protéique (Tchoukaev *et al.* 2018). Les foies de patients non-CF, également cirrhotiques, ont été choisis afin de permettre la meilleure comparaison possible entre les deux groupes de patients : ces patients souffraient d'une cirrhose à la suite d'une atresie des voies biliaires, atresie présente chez les patients CF. L'augmentation de CBG chez les patients CF semble donc être spécifique du contexte CF.

Nous sommes les premiers à montrer une augmentation de CBG au niveau hépatique dans un contexte pathologique. Cette régulation surprenante nous a amenés à réaliser des expériences *in vitro* afin de déterminer pourquoi la CBG était augmentée chez les patients CF. L'ensemble des données de la littérature sur la régulation de la CBG *in vitro* a été obtenu avec le modèle de cellules hépatocytaires HepG2. Nos expériences ont donc été également réalisées sur ces cellules. Notre première hypothèse était que l'inflammation, importante et chronique chez les patients CF, pouvait être responsable de cette augmentation. Seuls deux articles de la littérature ont étudié, *in vitro*, la régulation de la CBG dans un contexte pro-inflammatoire. Le premier a montré que l'IL-6 faisait diminuer les transcrits de CBG ainsi que la sécrétion de la protéine, de façon temps et dose dépendants (Bartalena *et al.* 1993). Le second a confirmé ce résultat et a de plus indiqué que l'IL-1 β augmentait la sécrétion de CBG sans affecter ses niveaux de transcrits (Emptoz-Bonneton *et al.*

1997). Nos résultats indiquent que l'IL-1 β ferait également augmenter les niveaux de transcrits de CBG de près de 80 % (Figure 25A). Cette différence peut s'expliquer par une différence de sensibilité de détection des ARNm. Dans l'article d'Emptoz-Bonneton et de ses collaborateurs, les transcrits sont en effet mesurés par Northern blot, technique qui a été progressivement remplacée par la qPCR, jugée plus sensible (VanGuilder *et al.* 2008). L'augmentation de CBG en transcrits serait consistante avec l'augmentation de la sécrétion de CBG par l'IL-1 β , décrite par les auteurs. Nous avons également montré que l'IL-6 n'avait pas d'effet sur la transcription de CBG, pour des stimulations de 6 h (Figure 25B). Les deux articles ayant évalués l'impact de l'inflammation sur l'expression de CBG *in vitro* ont étudié la régulation de la CBG par l'IL-6 pour des stimulations qui duraient jusqu'à 24 h ou 48 h. L'inhibition semble cependant s'amorcer dès 4 h de stimulation avec déjà 20 % de transcrits en moins (Bartalena *et al.* 1993). Nous avons également mesuré l'effet de l'IL-6 sur les niveaux de transcrits de CBG pour des stimulations de 48 h. Aucun effet n'a été observé (données non montrées). Les études réalisées avec d'autres molécules pro-inflammatoires, le TNF- α et l'IL-8, n'ont également pas montré d'effet sur la transcription de la CBG (Figure 26). L'inflammation ne semble donc que peu réguler l'expression de CBG au niveau hépatique. L'inflammation, et en particulier ses marqueurs comme l'IL-6 et l'IL-8 dans le contexte de la mucoviscidose, ne peuvent donc pas expliquer l'augmentation de CBG observée chez les patients CF.

Les patients CF sont régulièrement traités par des molécules anti-inflammatoires, majoritairement des glucocorticoïdes, qui pourraient agir sur l'expression de CBG. Nous avons donc évalué, dans un second temps, l'impact de molécules anti-inflammatoires sur la régulation de la CBG. Nos données sur les cellules HepG2 indiquent que la dexaméthasone, l'hydrocortisone ou l'IL-4 n'ont pas d'effet sur l'expression en ARNm de la CBG (Figure 27). Ce résultat étonnant s'insère dans le sujet, encore très controversé, de l'impact des glucocorticoïdes sur la régulation de la CBG. Deux études *in vitro* ont montré des résultats contradictoires à ce sujet : Emptoz-Bonneton et ses collègues ont noté l'absence d'effet de la dexaméthasone sur l'expression de CBG (Emptoz-Bonneton *et al.* 1997), tandis que Verhoog et ses collaborateurs ont observé une diminution de l'expression de CBG, en ARNm et en protéine, par stimulation à la dexaméthasone (Verhoog *et al.* 2014). Ces derniers ont mesuré la quantité de CBG en ARNm par des sondes créées par leur soin et la quantité en protéine a été évaluée par un Western blot utilisant l'anticorps ab107368 d'Abcam. Il s'agit en réalité de l'anticorps PA5-24229 de Thermo Fisher Scientific, revendu par Abcam, et qui ne semble pas reconnaître la CBG (Figure 44). Nos études indiquent de plus que, quelle que soit la concentration de dexaméthasone testée, les transcrits de CBG restent stables sur les HepG2 (données non montrées). Les molécules anti-inflammatoires ne seraient donc pas à l'origine de l'augmentation de la synthèse hépatique de CBG. De manière intéressante, nos données montrent que la dexaméthasone, en

combinaison avec l'IL-1 β , abroge l'effet inducteur de l'IL-1 β seule sur l'expression de CBG (Figure 27A). Ainsi, les traitements anti-inflammatoires seuls n'auraient pas d'effet mais pourraient atténuer une augmentation partielle de CBG, provoquée par une réponse pro-inflammatoire.

L'atteinte pulmonaire chez les patients CF est caractérisée par des infections répétées par des pathogènes comme *P. aeruginosa*. Nous avons voulu déterminer si cette infection pouvait réguler l'expression de la CBG au niveau hépatique. Malgré la charge bactérienne importante dans les voies aériennes des patients CF, la présence de bactéries dans le sang (bactériémie) chez ces patients reste rare. Seulement 3,5 % des patients déjà fébriles développeraient une bactériémie (Fahy *et al.* 1991). Des études ont cependant montré que le LPS de *P. aeruginosa* était présent dans les plasmas des patients CF, et ce, en quantité plus importante que chez des sujets sains (del Campo *et al.* 2011). Le LPS pourrait ainsi circuler jusqu'au foie et réguler l'expression de la CBG. Afin de tester cette hypothèse, nous avons stimulé nos cellules HepG2 avec ce facteur de virulence ainsi qu'un deuxième, la flagelline. Nos résultats ne montrent pas d'effet de ces molécules sur la transcription de la CBG (Figure 28). L'augmentation de CBG hépatique chez les patients CF ne serait donc pas due aux facteurs de virulence circulants de *P. aeruginosa*. La littérature indique cependant que le niveau de CBG plasmatique est diminué au cours d'un choc septique (Pugeat *et al.* 1989). Cette diminution a été imputée à une diminution de la synthèse et/ou la présence de substances dans le plasma inhibant les sites de liaison de la CBG. Notre étude semble montrer que si la diminution plasmatique de CBG est due à une diminution de la synthèse au niveau hépatique, ce ne sont pas directement les constituants de la bactérie qui sont responsables de cette diminution.

L'augmentation de CBG observée chez les patients CF semble être liée à la mucoviscidose, et pourrait, en particulier, être liée au contexte hépatique unique à la mucoviscidose. L'atteinte hépatique chez les patients CF, ou CFLD, est provoquée par une accumulation anormale de bile et la mise en place d'une fibrose biliaire. Peu de données sont disponibles actuellement quant aux médiateurs impliqués dans ce processus. Une équipe a montré en 2002 le rôle de la molécule TGF- β 1 dans le développement de la fibrose associée à la CFLD (Lewindon *et al.* 2002). La mise en place de la CFLD, notamment par l'action de cette molécule, pourrait être responsable de l'augmentation de CBG hépatique chez les patients CF. Nous avons donc testé l'impact de cette molécule sur la régulation de l'expression de la CBG. Nos résultats montrent que le TGF- β 1 fait diminuer la synthèse de CBG dans nos cellules HepG2 (Figure 29). Cette molécule n'est donc pas à l'origine de l'augmentation de CBG hépatique. D'autres molécules pourraient participer à la régulation de la CBG, en particulier des molécules libérées par le cholangiocyte exprimant la protéine CFTR mutée. Une communication pourrait en effet s'établir entre le cholangiocyte, seule cellule exprimant CFTR, et l'hépatocyte synthétisant et sécrétant la CBG. La culture de nos cellules HepG2 avec un milieu

déposé auparavant sur des cholangiocytes Mz-ChA-1, contenant l'inhibiteur CFTR_{inh}-172, ne montre aucun effet sur l'expression de CBG en ARNm (Figure 30). Cet inhibiteur de CFTR n'inhibe que sa fonction de canal, mais n'altère ni sa structure, ni sa localisation membranaire. Des études avec un siRNA dirigé contre *CFTR* permettraient de compléter ce résultat. L'impact du TGF- β 1 et de l'inhibition de CFTR sur l'expression de CBG a été évalué sur des modèles *in vitro* de lignées cellulaires. Ces modèles peuvent ne pas refléter les phénotypes cellulaires présents au sein des foies CF atteints. L'environnement particulier et le remodelage architectural dans ces foies sont en effet uniques et ne ressemblent à aucune autre pathologie hépatique (Staufer *et al.* 2014). L'étude de la régulation de la CBG dans ce contexte nécessiterait l'utilisation d'un modèle hépatique relevant de la mucoviscidose, qui n'est pas disponible actuellement. La plupart des modèles souris CF disponibles ne présentent aucune pathologie hépatique (Wilke *et al.* 2011). Dans le cadre de notre projet, le modèle souris utilisé n'a pas reproduit nos résultats obtenus sur les biopsies humaines (Figure 49). Ainsi, il nous est apparu peu pertinent de mener des études sur un modèle souris CF. Un modèle de culture primaire de foie total pourrait être mis en place afin de représenter toutes les populations cellulaires et d'étudier leurs interactions. En effet, notre étude met en jeu au moins deux types cellulaires : les hépatocytes exprimant la CBG et les cholangiocytes CFTR. Un troisième type de cellules hépatiques pourrait également avoir un rôle dans la CFLD, les cellules étoilées du foie. Il a en effet été montré que ces cellules étaient responsables de la fibrogénèse, après leur recrutement et leur activation au niveau du foie (Lewindon *et al.* 2002, Pozniak *et al.* 2017). Il est d'autant plus intéressant de mettre au point un modèle de foie total que la fibrogénèse est médiée par des interactions cellules-cellules (Ruddell *et al.* 2009). La transfection de culture primaire de foie total avec un siRNA dirigé contre *CFTR* pourrait être un premier modèle de foie CF. Il serait intéressant dans un deuxième temps de faire exprimer par les cholangiocytes, le canal CFTR muté, afin de mimer au mieux les foies de patients CF.

Bien que nous n'ayons pas pu expliquer pourquoi la CBG était surexprimée dans les foies de patients CF, nous étions à l'inverse intéressés par les conséquences de cette surexpression, en particulier sur les niveaux d'inflammation. Les études menées n'ont pas permis de conclure quant à l'impact de l'augmentation de CBG dans les hépatocytes sur les niveaux d'IL-8, ayant observé un résultat différent en fonction du clone de surexpression considéré (Figure 31). L'utilisation d'un modèle hépatique CF plus pertinent pourrait reproduire l'augmentation de CBG et permettrait ainsi d'étudier son impact sur l'inflammation.

Une première étude, réalisée en 1987, a montré une légère diminution de la CBG au niveau plasmatique chez les patients CF (Nowaczynski *et al.* 1987). Les auteurs avaient alors émis l'hypothèse d'une potentielle diminution de synthèse au niveau hépatique. Nos résultats ont infirmé

cette hypothèse et ont même montré une augmentation de synthèse (Tchoukaev *et al.* 2018). Nous avons tenté de déterminer quel facteur pouvait être responsable de cette augmentation. Nous n'avons pas pu montrer dans nos modèles que l'inflammation, les molécules anti-inflammatoires, la fibrose ou l'inhibition fonctionnelle de CFTR étaient à l'origine de cette augmentation. Nous étions ensuite intéressés par l'étude de la CBG au niveau plasmatique, afin de déterminer si l'augmentation de CBG dans les foies de patients CF était retrouvée dans les plasmas des patients CF.

II. ETUDE AU NIVEAU PLASMATIQUE

Nos résultats montrent que la concentration plasmatique de CBG est la même entre les patients CF et non-CF (Tchoukaev *et al.* 2018). Des études ont montré une diminution de la concentration de CBG plasmatique dans un contexte pathologique, comme chez des patients brûlés (Bernier *et al.* 1998), durant un choc septique (Pugeat *et al.* 1989) ou chez des patients opérés à cœur ouvert (Tinnikov *et al.* 1993). Cette diminution de CBG a également été observée dans les plasmas de patients cirrhotiques (Coolens *et al.* 1987, McDonald *et al.* 1993, Wiest *et al.* 2008). Ces articles n'indiquent pas l'origine de la cirrhose ou mélangent diverses cirrhoses dont des cirrhoses provoquées par le virus de l'hépatite B ou C, une maladie auto-immune ou une atresie des voies biliaires. Cette hétérogénéité peut expliquer pourquoi nous n'avons pas observé de diminution chez les patients cirrhotiques (Figure 32). Notre étude suggère même que la moyenne plasmatique de CBG est la même entre les patients non-CF et CF, quelle que soit leur atteinte hépatique (Figure 32).

L'augmentation de CBG au niveau hépatique n'étant pas suivie d'une augmentation de CBG au niveau plasmatique, deux hypothèses se sont posées à nous : i) une possible rétention partielle de la CBG au niveau du foie ; ii) une dégradation accrue de CBG dans les plasmas de patients CF. La concentration d'autres protéines produites et sécrétées dans le foie ne semble pas être altérée chez les patients CF. C'est en particulier le cas d'une autre serpine, l'AAT, comme la littérature et nos résultats le suggèrent (Birrer *et al.* 1994, Figure 40). La rétention hépatique ne semble donc pas être le mécanisme impliqué dans le maintien d'un taux normal de CBG plasmatique. La CBG peut être partiellement clivée dans le plasma, pour être ensuite dégradée. Chez les patients CF, l'activité exacerbée des neutrophiles accompagnée d'une libération importante d'élastase pourrait être responsable de ce clivage. Cette protéase est en effet capable de couper la CBG afin de libérer le glucocorticoïde transporté et d'inactiver de manière irréversible la CBG (Pemberton *et al.* 1988). En conditions physiologiques, l'élastase est inhibée par des antiprotéases, principalement l'AAT. Cependant, dans le contexte de la mucoviscidose, ces inhibiteurs peuvent être submergés par les

quantités très élevées d'élastase libérées, et ce, malgré l'augmentation d'AAT mesurée dans les poumons de patients CF (Figure 42). Nos résultats montrent une augmentation du complexe élastase/AAT dans notre cohorte de plasmas de patients CF (Tchoukaev *et al.* 2018), confirmant des travaux antérieurs (Meyer *et al.* 1991). Ce résultat soutient l'hypothèse d'un clivage de la CBG au niveau plasmatique chez les patients CF. L'élastase (LasB) sécrétée par la bactérie *P. aeruginosa* pourrait également être impliquée, cette protéase étant capable de cliver la CBG (Simard *et al.* 2014). Une majorité des patients est en effet colonisée par cette bactérie (Vaincre la mucoviscidose et Ined 2017) qui libère des quantités importantes de LasB en période d'exacerbation (Jaffar-Bandjee *et al.* 1995). Il serait intéressant de doser également cette protéase dans nos plasmas afin de confirmer cette hypothèse. Le clivage de la CBG par l'élastase des neutrophiles ou celle de *P. aeruginosa* pourrait donc être responsable de l'absence d'augmentation de la CBG au niveau plasmatique chez les patients CF.

Le dosage de la CBG dans notre cohorte a permis de mettre en évidence un dimorphisme sexuel, la concentration plasmatique de CBG étant plus élevée chez les femmes que chez les hommes (Figure 33). Les mêmes dosages réalisés avec le même type de technique, une étude de liaison avec un ligand radiomarqué, n'ont pas montré de différences entre hommes et femmes (Moore *et al.* 1978, Tableau 3). D'autres mesures, réalisées par RIA ou ELISA, ont cependant révélé que le taux de CBG plasmatique était plus élevé chez les femmes que chez les hommes (Fernandez-Real *et al.* 2005, Tableau 3). Il est à noter que parmi les femmes incluses dans notre étude, certaines prenaient un contraceptif hormonal. N'ayant en effet pas accès à ce type de données pour les patientes CF, nous avons décidé d'inclure également les femmes sous contraception du groupe de sujets sains. La différence que nous observons dans notre cohorte pourrait donc être due à la présence de femmes prenant un contraceptif hormonal.

Nous avons poursuivi notre étude au niveau plasmatique par la mesure de la concentration en IL-6 et sa potentielle différence entre les patients CF et non-CF. Des études ont déjà montré une élévation du taux d'IL-6 plasmatique chez les patients CF, en particulier au cours de périodes d'exacerbations pulmonaires (Shoki *et al.* 2013). Or, une augmentation d'IL-6 a été corrélée avec une baisse de la concentration plasmatique de CBG dans différentes pathologies, comme la pancréatite nécrosante ou chez des patients souffrant d'un choc septique (Beishuizen *et al.* 2001, Muller *et al.* 2007). Nos données montrent que la concentration moyenne d'IL-6 est augmentée chez les patients CF, comparée aux patients non-CF, malgré la conservation du taux de CBG plasmatique (Figure 34A). Ainsi, le taux plasmatique de CBG n'est pas corrélé à celui de l'IL-6, dans le contexte de la mucoviscidose (Figure 35). La concentration d'IL-6 était la plus élevée dans le groupe de patients CF souffrant d'une cirrhose (Figure 34B), groupe pour lequel nous avons mesuré une augmentation de

CBG directement dans les foies de ces patients (Tchoukaev *et al.* 2018). L'absence de corrélation entre ces deux paramètres chez les patients CF était donc attendue. Une étude *in vivo* a pourtant suggéré que l'IL-6 faisait diminuer le taux plasmatique de CBG (Tsigos *et al.* 1998). Il est à noter que cette diminution a été observée après injection d'IL-6 sur des sujets sains. La régulation de la CBG par l'IL-6 semble donc être différente dans le contexte de la mucoviscidose.

Le cortisol est principalement transporté par la CBG. Le taux de CBG plasmatique étant maintenu à un taux normal chez les patients CF, nous avons voulu déterminer si le taux de cortisol était également conservé chez les patients CF. Nous avons observé une diminution de la concentration moyenne de cortisol chez les patients CF, comparée aux patients non-CF (Figure 36). Il est à noter que la moyenne d'âge du groupe non-CF est plus élevée que celle du groupe CF (non-CF : 21 ans \pm 8 ; CF : 13 ans \pm 4, Tableau 5). Cette différence pourrait expliquer la diminution du taux moyen de cortisol des patients CF. Pourtant, notre résultat rejoint une étude précédente ayant également montré une diminution du cortisol en condition d'exacerbations dans les plasmas de patients CF (Laguna *et al.* 2015). Cette diminution de cortisol suggère une insuffisance surrénalienne, définie par une diminution de la production hormonale du cortex des glandes surrénales. Quelques rares études se sont intéressées à ces glandes et à l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien chez les patients CF. L'étude histologique des glandes surrénales issues de patients CF a montré une augmentation de la proportion de zones hémorragiques et nécrosantes dans le cortex des glandes, lieu de synthèse du cortisol (Bech et Nielsen 1972). Une autre étude a par ailleurs observé une augmentation de la clairance des glucocorticoïdes chez les patients CF, comparée à des patients asthmatiques (Dove *et al.* 1992). L'inflammation chronique associée à la mucoviscidose pourrait être responsable d'une insuffisance surrénalienne. Mastorakos et ses collaborateurs ont en effet montré qu'une inflammation prolongée, induite par un taux élevé et constant d'IL-6, provoquait une diminution de la réponse de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (Mastorakos *et al.* 1993). Des études plus récentes ont de plus suggéré une désensibilisation de cet axe causée par les traitements aux glucocorticoïdes. L'administration de glucocorticoïdes synthétiques chez les patients CF est en effet à l'origine d'une inhibition du métabolisme des glucocorticoïdes associée à une synthèse faible de cortisol, en réponse à une stimulation à l'ACTH (adrénocorticotrophine) (Gilchrist *et al.* 2013). L'insuffisance surrénalienne peut entraîner de sévères complications si elle n'est pas détectée à temps. Pourtant, elle reste largement ignorée alors qu'elle pourrait toucher entre 8 % et 9 % des patients CF, chez qui la prise de glucocorticoïdes est plus élevée (Preville-Ratelle *et al.* 2018).

III. EXPRESSION ET REGULATION DE LA CBG PULMONAIRE

Le principal site de l'inflammation chez les patients CF est le poumon. C'est pourquoi nous avons décidé d'étudier également l'expression de la forme pulmonaire de la CBG. Décrite pour la première fois en 1987, les auteurs montraient que les formes hépatiques et pulmonaires partageaient le même ADNc (Hammond *et al.* 1987). Nous avons confirmé ce résultat à partir de nos biopsies et montré que les séquences codantes de la CBG hépatique et pulmonaire avaient une identité de 100 % (GenBank : MG652288). Aucune donnée n'existait sur son expression le long des voies aériennes. Nous avons montré pour la première fois que la CBG pulmonaire s'exprimait dans les bronches et les bronchioles mais pas au niveau des alvéoles (Tchoukaev *et al.* 2018). Cette expression est spécifique de la CBG, puisque l'AAT, une autre protéine de la famille des serpinés, a été retrouvée majoritairement exprimée dans les alvéoles (Figure 41).

Chez les patients CF, la CBG pulmonaire est diminuée au niveau bronchique et bronchiolaire (Tchoukaev *et al.* 2018). Nous avons mené des études *in vitro* afin de comprendre pourquoi cette CBG était diminuée. Ces études se sont révélées difficiles du fait de la faible expression de cette CBG dans les modèles à notre disposition. Notre première hypothèse était que l'inflammation pulmonaire, importante chez les patients CF, était responsable de cette diminution. Nos résultats suggèrent au contraire que l'inflammation ferait augmenter la synthèse de CBG pulmonaire (Figure 38). Cette dernière serait diminuée par la dexaméthasone dans les cellules CF, mais pas dans les cellules non-CF (Figure 38). La prise de glucocorticoïdes par les patients CF pourrait être à l'origine de la diminution des niveaux de CBG pulmonaires. Ces résultats restent cependant préliminaires et nécessiteraient confirmation après amélioration de l'amplification des ARNm. La diminution de CBG pulmonaire chez les patients CF pourrait être la conséquence directe des altérations du canal CFTR. La diminution d'expression de CFTR par un siRNA n'a pas semblé modifier l'expression de la CBG pulmonaire (Figure 39). Ce résultat serait à confirmer par l'utilisation de l'inhibiteur fonctionnel de CFTR, le CFTR_{inh}-172, dans les cellules non-CF 16HBE, ainsi que par le réadressage de CFTR à la membrane dans les cellules CF, les CFBE, en les cultivant à 27 °C.

Les conséquences de la diminution de la CBG pulmonaire sont à comprendre au regard du rôle des CBG extrahépatiques, sujet régulièrement évoqué dans la littérature (Sivukhina et Jirikowski 2014, Meyer *et al.* 2016). La CBG produite localement serait un inhibiteur de l'action intracellulaire des glucocorticoïdes. En effet, lorsque le glucocorticoïde rentrerait dans la cellule pulmonaire, la CBG pulmonaire le lierait et le bloquerait, l'empêchant ainsi d'agir et d'avoir ses effets anti-inflammatoires. La CBG hépatique transporte et adresse le glucocorticoïde afin de lui permettre d'agir, alors que la CBG pulmonaire bloquerait son action. L'hypothèse des rôles opposés des CBG

hépatiques et pulmonaires est soutenue par le fait que, chez les patients CF, elles sont régulées de manière opposée. En effet, les niveaux de CBG pulmonaire sont diminués, tandis que ceux de la CBG hépatique sont augmentés (Tchoukaev *et al.* 2018). Cette régulation opposée a également été observée dans un modèle souris de pancréatite aiguë (Gulfo *et al.* 2016). Selon l'hypothèse concernant le rôle de la CBG pulmonaire, la diminution de CBG observée chez les patients CF implique une diminution du blocage des glucocorticoïdes. Ainsi, au niveau des cellules des voies aériennes CF, l'action des glucocorticoïdes serait optimisée localement, sur le site même de l'inflammation.

IV. LA CBG, UN OUTIL THERAPEUTIQUE DANS LA MUCOVISCIDOSE ?

La CBG est la protéine qui transporte et adresse les glucocorticoïdes spécifiquement sur le lieu de l'inflammation. Le système d'adressage de la CBG a amené des chercheurs à proposer la protéine comme un transporteur d'agent thérapeutique, quel qu'il soit, vers une cible donnée. Chan et ses collaborateurs ont prouvé que la CBG pouvait être mutée pour qu'elle puisse lier de nouveaux composés et les adresser à un endroit défini (Chan *et al.* 2014). Leur étude montre également que certaines mutations introduites dans la CBG lui permettent de libérer plus efficacement ces molécules. Les auteurs suggèrent ainsi qu'en optimisant les caractéristiques physiques de la protéine, cette dernière pourrait être utilisée dans l'adressage de molécules anti-cancéreuses.

Nos résultats montrent que le taux plasmatique de la CBG endogène est conservé chez les patients CF (Tchoukaev *et al.* 2018). Sans avoir à modifier la CBG, cette protéine pourrait donc être utilisée pour transporter et adresser les glucocorticoïdes de synthèse, administrés dans le but de traiter l'inflammation dans le contexte de la mucoviscidose. Les glucocorticoïdes de synthèse actuellement prescrits aux patients CF n'ont pourtant que peu, voire aucune affinité pour la CBG. Les patients reçoivent majoritairement, sous forme orale, de la prednisone ou de la prednisolone qui ont 23 et 2 fois moins d'affinité, respectivement, pour la CBG, que le cortisol (Pugeat *et al.* 1981). Ce manque d'affinité conduit à la prescription de doses élevées afin d'obtenir une quantité suffisante de glucocorticoïdes au niveau du site de l'inflammation. Les glucocorticoïdes diffusent cependant dans tout le corps où ils sont capables d'agir sur de multiples tissus. Ils peuvent provoquer de l'ostéoporose par inhibition de l'activité ostéoblastique, l'apparition d'un diabète par augmentation de la gluconéogenèse et inhibition de l'absorption de glucose par les adipocytes, et peuvent entraîner une désensibilisation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (Oray *et al.* 2016). Ces effets secondaires ont été observés chez les patients CF prenant des glucocorticoïdes et ne

permettent pas de recommander leur prescription de manière soutenue (Cheng *et al.* 2015). L'utilisation d'un glucocorticoïde de forte affinité pour la CBG pourrait permettre de réduire ces effets secondaires, comme cela a déjà été suggéré dans la littérature (Henley *et al.* 2016). La liaison du glucocorticoïde de synthèse à la CBG permettrait de cibler plus spécifiquement ses actions anti-inflammatoires et d'en diminuer ses effets secondaires.

L'utilisation des glucocorticoïdes dans le contexte de la mucoviscidose reste un sujet controversé. Il a en effet été montré qu'*in vitro* la dexaméthasone ne permettait pas de faire diminuer la réponse inflammatoire de neutrophiles issus des voies aériennes des patients CF (Corvol *et al.* 2003). La dexaméthasone protégerait de plus les neutrophiles en inhibant leur apoptose (Liles *et al.* 1995). Dans le contexte de la mucoviscidose, cela impliquerait qu'un traitement par glucocorticoïdes maintienne le nombre déjà élevé de neutrophiles dans les voies aériennes et ne permette pas de faire diminuer la réponse inflammatoire des neutrophiles, également déjà élevée. Au niveau de l'épithélium des voies aériennes, des études *in vitro* précédentes du laboratoire ont cependant montré que les glucocorticoïdes faisaient bien diminuer l'inflammation dans des cellules épithéliales bronchiques CF (Rebeyrol *et al.* 2012). Il a en outre été montré que la dexaméthasone faisait diminuer l'expression de CFTR, mais augmentait son activité (Laube *et al.* 2015). L'action des glucocorticoïdes sur le canal CFTR a également été décrite dans un modèle pancréatique CF, où la prednisolone a permis de rétablir la bonne localisation de CFTR à la membrane apicale (Ko *et al.* 2010). Des études supplémentaires sur la dexaméthasone et la production de mucus ont montré que cette molécule était capable d'inhiber la sécrétion de glycoprotéines constituant le mucus (Shimura *et al.* 1990). Cela signifie que chez les patients CF, les glucocorticoïdes pourraient avoir un effet bénéfique sur l'épithélium des voies aériennes en améliorant plusieurs paramètres dérégulés dans la mucoviscidose : l'inflammation non contrôlée, le dysfonctionnement du canal CFTR et la surproduction de mucus. D'autre part, ces molécules anti-inflammatoires pourraient être un moyen de traiter la CFLD. L'acide ursodésoxycholique représente le seul traitement actuel donné aux patients mais son efficacité reste controversée (Cheng *et al.* 2017). Une étude a montré que la perte d'expression de CFTR au niveau hépatique entraînait une augmentation des lésions cellulaires en réponse à l'administration d'endotoxines, associée à une réponse immunitaire exagérée (Fiorotto *et al.* 2011). Cet article suggère que l'inflammation pourrait, de même, être une cible thérapeutique pour la CFLD. Par ailleurs, des études ont montré que les glucocorticoïdes étaient à l'origine d'une insuffisance de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien chez les patients CF (Preville-Ratelle *et al.* 2018). Pour continuer à prescrire ces molécules, il devient donc important de considérer des études pharmacocinétiques poussées afin de prévenir cet effet secondaire. Une emphase pourra être mise

sur le meilleur moment d'administration de ces molécules ainsi que l'étude de leur demi-vie afin de faire concorder le pic de glucocorticoïde synthétique avec le cycle naturel du cortisol.

Les glucocorticoïdes sont donc des molécules ambivalentes dont les effets bénéfiques peuvent être potentialisés par la CBG. Nous avons montré chez les patients CF une conservation du taux plasmatique de CBG, ainsi qu'une diminution de CBG pulmonaire (Tchoukaev *et al.* 2018). Ces résultats vont dans le sens de l'utilisation de la CBG comme outil thérapeutique d'optimisation du traitement par les glucocorticoïdes dans le contexte de la mucoviscidose. Cela pourra être possible par l'utilisation de nouveaux glucocorticoïdes ayant une bonne affinité pour la CBG et/ou par une co-administration de ces molécules avec une CBG recombinante chez les patients dont le taux de CBG endogène est inférieur à la moyenne. L'étude des effets de ces nouvelles molécules sur les différentes cellules mises en jeu dans la mucoviscidose sera également primordiale, afin d'éviter des effets secondaires inattendus.

D'autres pathologies à la composante inflammatoire chronique sont également traitées par glucocorticoïdes. C'est le cas, par exemple, de l'asthme, où l'utilisation de ces molécules est recommandée et courante. Après des dosages de la CBG endogène et l'étude des effets intracellulaires des glucocorticoïdes, l'utilisation de la CBG pour le traitement anti-inflammatoire de ces autres pathologies pourrait également être envisagée.

BIBLIOGRAPHIE

- Abou-Samra, A. B., Pugeat, M., Dechaud, H., Nachury, L., Bouchareb, B., Fevre-Montange, M., Tourniaire, J. (1984). "Increased plasma concentration of N-terminal beta-lipotrophin and unbound cortisol during pregnancy." *Clin Endocrinol (Oxf)*. **20**(2): 221-228.
- Adams, J. M., Otero-Corchon, V., Hammond, G. L., Veldhuis, J. D., Qi, N. Low, M. J. (2015). "Somatostatin is essential for the sexual dimorphism of GH secretion, corticosteroid-binding globulin production, and corticosterone levels in mice." *Endocrinology*. **156**(3): 1052-1065.
- Agbaht, K. Gullu, S. (2014). "Adrenocortical reserves in hyperthyroidism." *Endocrine*. **45**(1): 136-143.
- Alonso y de los Ruices de Fontecha, J. (1606). *J Diez Privilegios para Mgeres Prenadas*: 212.
- Alton, E., Armstrong, D. K., Ashby, D., Bayfield, K. J., Bilton, D., Bloomfield, E. V., Boyd, A. C., Brand, J., Buchan, R., Calcedo, R., Carvelli, P., Chan, M., Cheng, S. H., Collie, D. S., Cunningham, S., Davidson, H. E., Davies, G., Davies, J. C., Davies, L. A., Dewar, M. H., Doherty, A., Donovan, J., Dwyer, N. S., Elgmati, H. I., Featherstone, R. F., Gavino, J., Gea-Sorli, S., Geddes, D. M., Gibson, J. S. R., Gill, D. R., Greening, A. P., Griesenbach, U., Hansell, D. M., Harman, K., Higgins, T. E., Hodges, S. L., Hyde, S. C., Hyndman, L., Innes, J. A., Jacob, J., Jones, N., Keogh, B. F., Limberis, M. P., Lloyd-Evans, P., Maclean, A. W., Manvell, M. C., McCormick, D., McGovern, M., McLachlan, G., Meng, C., Montero, M. A., Milligan, H., Moyce, L. J., Murray, G. D., Nicholson, A. G., Osadolor, T., Parra-Leiton, J., Porteous, D. J., Pringle, I. A., Punch, E. K., Pytel, K. M., Quittner, A. L., Rivellini, G., Saunders, C. J., Scheule, R. K., Sheard, S., Simmonds, N. J., Smith, K., Smith, S. N., Soussi, N., Soussi, S., Spearing, E. J., Stevenson, B. J., Sumner-Jones, S. G., Turkkila, M., Ureta, R. P., Waller, M. D., Wasowicz, M. Y., Wilson, J. M. Wolstenholme-Hogg, P. (2016). *A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of repeated nebulisation of non-viral cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene therapy in patients with cystic fibrosis*. Southampton (UK).
- Andersen, D. H. (1938). "Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease." *Am J Dis Child*. **72**: 62-80.
- Andersen, D. H. Hodges, R. G. (1946). "Celiac syndrome. V. Genetics of cystic fibrosis of the pancreas with a consideration of the etiology." *Am J Dis Child*. **72**: 62-80.
- Anderson, L. N., Briollais, L., Atkinson, H. C., Marsh, J. A., Xu, J., Connor, K. L., Matthews, S. G., Pennell, C. E. Lye, S. J. (2014). "Investigation of genetic variants, birthweight and hypothalamic-pituitary-adrenal axis function suggests a genetic variant in the SERPINA6 gene is associated with corticosteroid binding globulin in the western Australia pregnancy cohort (Raine) study." *PLoS One*. **9**(4): e92957.
- Anderson, M. P., Gregory, R. J., Thompson, S., Souza, D. W., Paul, S., Mulligan, R. C., Smith, A. E. Welsh, M. J. (1991). "Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity." *Science*. **253**(5016): 202-205.
- Angeli, A., Frajria, R., De Paoli, R., Fonzo, D. Ceresa, F. (1978). "Diurnal variation of prednisolone binding to serum corticosteroid-binding globulin in man." *Clin Pharmacol Ther*. **23**(1): 47-53.

- Anguiano, A., Oates, R. D., Amos, J. A., Dean, M., Gerrard, B., Stewart, C., Maher, T. A., White, M. B. Milunsky, A. (1992). "Congenital bilateral absence of the vas deferens. A primarily genital form of cystic fibrosis." *JAMA*. **267**(13): 1794-1797.
- Antunes, M. A., Morales, M. M., Pelosi, P. Rocco, P. R. M. (2013). "Lung Resident Stem Cells." *Resident Stem Cells and Regenerative Therapy*: 105-122.
- Aslam, A. A., Higgins, C., Sinha, I. P. Southern, K. W. (2017). "Ataluren and similar compounds (specific therapies for premature termination codon class I mutations) for cystic fibrosis." *Cochrane Database Syst Rev*. **1**: CD012040.
- Auerbach, H. S., Williams, M., Kirkpatrick, J. A. Colten, H. R. (1985). "Alternate-day prednisone reduces morbidity and improves pulmonary function in cystic fibrosis." *Lancet*. **2**(8457): 686-688.
- Avvakumov, G. V. Hammond, G. L. (1994). "Glycosylation of human corticosteroid-binding globulin. Differential processing and significance of carbohydrate chains at individual sites." *Biochemistry*. **33**(19): 5759-5765.
- Avvakumov, G. V. Hammond, G. L. (1994). "Substitutions of tryptophan residues in human corticosteroid-binding globulin: impact on steroid binding and glycosylation." *J Steroid Biochem Mol Biol*. **49**(2-3): 191-194.
- Avvakumov, G. V., Krupenko, S. A. Strel'chyonok, O. A. (1989). "Study of the transcortin binding to human endometrium plasma membrane." *Biochim Biophys Acta*. **984**(2): 143-150.
- Avvakumov, G. V., Warmels-Rodenhiser, S. Hammond, G. L. (1993). "Glycosylation of human corticosteroid-binding globulin at asparagine 238 is necessary for steroid binding." *J Biol Chem*. **268**(2): 862-866.
- Balfour-Lynn, I. M., Klein, N. J. Dinwiddie, R. (1997). "Randomised controlled trial of inhaled corticosteroids (fluticasone propionate) in cystic fibrosis." *Arch Dis Child*. **77**(2): 124-130.
- Balfour-Lynn, I. M., Lees, B., Hall, P., Phillips, G., Khan, M., Flather, M., Elborn, J. S. Investigators, C. W. (2006). "Multicenter randomized controlled trial of withdrawal of inhaled corticosteroids in cystic fibrosis." *Am J Respir Crit Care Med*. **173**(12): 1356-1362.
- Balfour-Lynn, I. M. Welch, K. (2016). "Inhaled corticosteroids for cystic fibrosis." *Cochrane Database Syst Rev*(8): CD001915.
- Barat, P., Duclos, M., Gatta, B., Roger, P., Mormede, P. Moisan, M. P. (2005). "Corticosteroid binding globulin gene polymorphism influences cortisol driven fat distribution in obese women." *Obes Res*. **13**(9): 1485-1490.
- Barlow, J. W., Crowe, T. C., Cowen, N. L., Raggatt, L. E., Topliss, D. J., Blok, R. B. Stockigt, J. R. (1994). "Stimulation of sex hormone-binding globulin mRNA and attenuation of corticosteroid-binding globulin mRNA by triiodothyronine in human hepatoma cells." *Eur J Endocrinol*. **130**(2): 166-170.

- Bartalena, L., Hammond, G. L., Farsetti, A., Flink, I. L., Robbins, J. (1993). "Interleukin-6 inhibits corticosteroid-binding globulin synthesis by human hepatoblastoma-derived (Hep G2) cells." *Endocrinology*. **133**(1): 291-296.
- Bartlett, J. R., Friedman, K. J., Ling, S. C., Pace, R. G., Bell, S. C., Bourke, B., Castaldo, G., Castellani, C., Cipolli, M., Colombo, C., Colombo, J. L., Debray, D., Fernandez, A., Lacaille, F., Macek, M., Jr., Rowland, M., Salvatore, F., Taylor, C. J., Wainwright, C., Wilschanski, M., Zemkova, D., Hannah, W. B., Phillips, M. J., Corey, M., Zielenski, J., Dorfman, R., Wang, Y., Zou, F., Silverman, L. M., Drumm, M. L., Wright, F. A., Lange, E. M., Durie, P. R., Knowles, M. R. Gene Modifier Study, G. (2009). "Genetic modifiers of liver disease in cystic fibrosis." *JAMA*. **302**(10): 1076-1083.
- Basbaum, C. B., Jany, B., Finkbeiner, W. E. (1990). "The serous cell." *Annu Rev Physiol*. **52**: 97-113.
- Bech, K., Nielsen, E. L. (1972). "The adrenal glands in cystic fibrosis. Morphology correlated with clinical findings." *Acta Pathol Microbiol Scand A*. **80**(5): 615-620.
- Beishuizen, A., Thijs, L. G., Vermes, I. (2001). "Patterns of corticosteroid-binding globulin and the free cortisol index during septic shock and multitrauma." *Intensive Care Med*. **27**(10): 1584-1591.
- Benassayag, C., Souski, I., Mignot, T. M., Robert, B., Hassid, J., Duc-Goiran, P., Mondon, F., Rebourcet, R., Dehennin, L., Nunez, E. A., Ferre, F. (2001). "Corticosteroid-binding globulin status at the fetomaternal interface during human term pregnancy." *Biol Reprod*. **64**(3): 812-821.
- Berdusco, E. T., Hammond, G. L., Jacobs, R. A., Grolla, A., Akagi, K., Langlois, D., Challis, J. R. (1993). "Glucocorticoid-induced increase in plasma corticosteroid-binding globulin levels in fetal sheep is associated with increased biosynthesis and alterations in glycosylation." *Endocrinology*. **132**(5): 2001-2008.
- Bernier, J., Jobin, N., Emptoz-Bonneton, A., Pugeat, M. M., Garrel, D. R. (1998). "Decreased corticosteroid-binding globulin in burn patients: relationship with interleukin-6 and fat in nutritional support." *Crit Care Med*. **26**(3): 452-460.
- Bertrand, C. A., Zhang, R., Pilewski, J. M., Frizzell, R. A. (2009). "SLC26A9 is a constitutively active, CFTR-regulated anion conductance in human bronchial epithelia." *J Gen Physiol*. **133**(4): 421-438.
- Bird, A. D., McDougall, A. R., Seow, B., Hooper, S. B., Cole, T. J. (2015). "Glucocorticoid regulation of lung development: lessons learned from conditional GR knockout mice." *Mol Endocrinol*. **29**(2): 158-171.
- Birrer, P., McElvaney, N. G., Rudeberg, A., Sommer, C. W., Liechti-Gallati, S., Kraemer, R., Hubbard, R., Crystal, R. G. (1994). "Protease-antiprotease imbalance in the lungs of children with cystic fibrosis." *Am J Respir Crit Care Med*. **150**(1): 207-213.
- Bisgaard, H., Pedersen, S. S., Nielsen, K. G., Skov, M., Laursen, E. M., Kronborg, G., Reimert, C. M., Hoiby, N., Koch, C. (1997). "Controlled trial of inhaled budesonide in patients with cystic fibrosis and chronic bronchopulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection." *Am J Respir Crit Care Med*. **156**(4 Pt 1): 1190-1196.

- Bodnar, T. S., Hill, L. A., Taves, M. D., Yu, W., Soma, K. K., Hammond, G. L. Weinberg, J. (2015). "Colony-Specific Differences in Endocrine and Immune Responses to an Inflammatory Challenge in Female Sprague Dawley Rats." *Endocrinology*. **156**(12): 4604-4617.
- Bolton, J. L., Hayward, C., Direk, N., Lewis, J. G., Hammond, G. L., Hill, L. A., Anderson, A., Huffman, J., Wilson, J. F., Campbell, H., Rudan, I., Wright, A., Hastie, N., Wild, S. H., Velders, F. P., Hofman, A., Uitterlinden, A. G., Lahti, J., Raikkonen, K., Kajantie, E., Widen, E., Palotie, A., Eriksson, J. G., Kaakinen, M., Jarvelin, M. R., Timpson, N. J., Davey Smith, G., Ring, S. M., Evans, D. M., St Pourcain, B., Tanaka, T., Milaneschi, Y., Bandinelli, S., Ferrucci, L., van der Harst, P., Rosmalen, J. G., Bakker, S. J., Verweij, N., Dullaart, R. P., Mahajan, A., Lindgren, C. M., Morris, A., Lind, L., Ingelsson, E., Anderson, L. N., Pennell, C. E., Lye, S. J., Matthews, S. G., Eriksson, J., Mellstrom, D., Ohlsson, C., Price, J. F., Strachan, M. W., Reynolds, R. M., Tiemeier, H., Walker, B. R. Consortium, C. O. N. (2014). "Genome wide association identifies common variants at the SERPINA6/SERPINA1 locus influencing plasma cortisol and corticosteroid binding globulin." *PLoS Genet*. **10**(7): e1004474.
- Boyle, M. P. De Boeck, K. (2013). "A new era in the treatment of cystic fibrosis: correction of the underlying CFTR defect." *Lancet Respir Med*. **1**(2): 158-163.
- Briel, M., Greger, R. Kunzelmann, K. (1998). "Cl⁻ transport by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) contributes to the inhibition of epithelial Na⁺ channels (ENaCs) in Xenopus oocytes co-expressing CFTR and ENaC." *J Physiol*. **508 (Pt 3)**: 825-836.
- Bright, G. M. (1995). "Corticosteroid-binding globulin influences kinetic parameters of plasma cortisol transport and clearance." *J Clin Endocrinol Metab*. **80**(3): 770-775.
- Bronsveld, I., Mekus, F., Bijman, J., Ballmann, M., de Jonge, H. R., Laabs, U., Halley, D. J., Ellemunter, H., Mastella, G., Thomas, S., Veeze, H. J. Tummler, B. (2001). "Chloride conductance and genetic background modulate the cystic fibrosis phenotype of Delta F508 homozygous twins and siblings." *J Clin Invest*. **108**(11): 1705-1715.
- Brunner, E., Baima, J., Vieira, T. C., Vieira, J. G. Abucham, J. (2003). "Hereditary corticosteroid-binding globulin deficiency due to a missense mutation (Asp367Asn, CBG Lyon) in a Brazilian kindred." *Clin Endocrinol (Oxf)*. **58**(6): 756-762.
- Busch, R. (1990). "On the history of cystic fibrosis." *Acta Univ Carol Med (Praha)*. **36**(1-4): 13-15.
- Bush, I. E. (1957). "The Physiochemical State of Cortisol in Blood." *Hormones in Blood*. C. Foundation. **11**: 263-285.
- Caldwell, J. D. Jirikowski, G. F. (2014). "Sex hormone binding globulin and corticosteroid binding globulin as major effectors of steroid action." *Steroids*. **81**: 13-16.
- Cameron, A., Henley, D., Carrell, R., Zhou, A., Clarke, A. Lightman, S. (2010). "Temperature-responsive release of cortisol from its binding globulin: a protein thermocouple." *J Clin Endocrinol Metab*. **95**(10): 4689-4695.

- Cantin, A. M., Hartl, D., Konstan, M. W., Chmiel, J. F. (2015). "Inflammation in cystic fibrosis lung disease: Pathogenesis and therapy." *J Cyst Fibros*. **14**(4): 419-430.
- Caron, P., Bennet, A., Barousse, C., Nisula, B. C., Louvet, J. P. (1989). "Effects of hyperthyroidism on binding proteins for steroid hormones." *Clin Endocrinol (Oxf)*. **31**(2): 219-224.
- Castellani, C., Duff, A. J. A., Bell, S. C., Heijerman, H. G. M., Munck, A., Ratjen, F., Sermet-Gaudelus, I., Southern, K. W., Barben, J., Flume, P. A., Hodkova, P., Kashirskaya, N., Kirszenbaum, M. N., Madge, S., Oxley, H., Plant, B., Schwarzenberg, S. J., Smyth, A. R., Taccetti, G., Wagner, T. O. F., Wolfe, S. P., Drevinek, P. (2018). "ECFS best practice guidelines: the 2018 revision." *J Cyst Fibros*. **17**(2): 153-178.
- Chan, W. L., Zhou, A., Read, R. J. (2014). "Towards engineering hormone-binding globulins as drug delivery agents." *PLoS One*. **9**(11): e113402.
- Cheng, K., Ashby, D., Smyth, R. L. (2015). "Oral steroids for long-term use in cystic fibrosis." *Cochrane Database Syst Rev*(12): CD000407.
- Cheng, K., Ashby, D., Smyth, R. L. (2017). "Ursodeoxycholic acid for cystic fibrosis-related liver disease." *Cochrane Database Syst Rev*. **9**: CD000222.
- Cholon, D. M., O'Neal, W. K., Randell, S. H., Riordan, J. R., Gentsch, M. (2010). "Modulation of endocytic trafficking and apical stability of CFTR in primary human airway epithelial cultures." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. **298**(3): L304-314.
- Cohn, J. A., Strong, T. V., Picciotto, M. R., Nairn, A. C., Collins, F. S., Fitz, J. G. (1993). "Localization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in human bile duct epithelial cells." *Gastroenterology*. **105**(6): 1857-1864.
- Coolens, J. L., Van Baelen, H., Heyns, W. (1987). "Clinical use of unbound plasma cortisol as calculated from total cortisol and corticosteroid-binding globulin." *J Steroid Biochem*. **26**(2): 197-202.
- Cooley, J., Sontag, M. K., Accurso, F. J., Remold-O'Donnell, E. (2011). "SerpinB1 in cystic fibrosis airway fluids: quantity, molecular form and mechanism of elastase inhibition." *Eur Respir J*. **37**(5): 1083-1090.
- Corvol, H., Fitting, C., Chadelat, K., Jacquot, J., Tabary, O., Boule, M., Cavaillon, J. M., Clement, A. (2003). "Distinct cytokine production by lung and blood neutrophils from children with cystic fibrosis." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. **284**(6): L997-1003.
- Corvol, H., Rousselet, N., Thompson, K. E., Berdah, L., Cottin, G., Foussigniere, T., Longchamp, E., Fiette, L., Sage, E., Prunier, C., Drumm, M., Hodges, C. A., Boelle, P. Y., Guillot, L. (2017). "FAM13A is a modifier gene of cystic fibrosis lung phenotype regulating rhoa activity, actin cytoskeleton dynamics and epithelial-mesenchymal transition." *J Cyst Fibros*.
- Crave, J. C., Lejeune, H., Brebant, C., Baret, C., Pugeat, M. (1995). "Differential effects of insulin and insulin-like growth factor I on the production of plasma steroid-binding globulins by human hepatoblastoma-derived (Hep G2) cells." *J Clin Endocrinol Metab*. **80**(4): 1283-1289.

- Crawford, I., Maloney, P. C., Zeitlin, P. L., Guggino, W. B., Hyde, S. C., Turley, H., Gatter, K. C., Harris, A. Higgins, C. F. (1991). "Immunocytochemical localization of the cystic fibrosis gene product CFTR." *Proc Natl Acad Sci U S A*. **88**(20): 9262-9266.
- Cutz, E., Pan, J., Yeager, H., Domnik, N. J. Fisher, J. T. (2013). "Recent advances and controversies on the role of pulmonary neuroepithelial bodies as airway sensors." *Semin Cell Dev Biol*. **24**(1): 40-50.
- Cystic Fibrosis Canada (2017). "The Canadian Cystic Fibrosis Registry - 2016 Annual Data Report."
- Cystic Fibrosis Foundation (2017). "Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry - 2016 Annual Data Report."
- Daughaday, W. H. (1958). "Binding of corticosteroids by plasma proteins. III. The binding of corticosteroid and related hormones by human plasma and plasma protein fractions as measured by equilibrium dialysis." *J Clin Invest*. **37**(4): 511-518.
- Dauletbaev, N., Viel, K., Behr, J., Loitsch, S., Buhl, R., Wagner, T. O. Bargon, J. (1999). "Effects of short-term inhaled fluticasone on oxidative burst of sputum cells in cystic fibrosis patients." *Eur Respir J*. **14**(5): 1150-1155.
- De Boeck, K., De Baets, F., Malroot, A., Desager, K., Mouchet, F. Proesmans, M. (2007). "Do inhaled corticosteroids impair long-term growth in prepubertal cystic fibrosis patients?" *Eur J Pediatr*. **166**(1): 23-28.
- De Boeck, K., Vermeulen, F. Dupont, L. (2017). "The diagnosis of cystic fibrosis." *Presse Med*. **46**(6 Pt 2): e97-e108.
- De Moor, P., Heirwegh, K., Heremans, J. F. Declerck-Raskin, M. (1962). "Protein binding of corticoids studied by gel filtration." *J Clin Invest*. **41**: 816-827.
- De Moor, P., Steeno, O., Brosens, I. Hendrikx, A. (1966). "Data on transcortin activity in human plasma as studied by gel filtration." *J Clin Endocrinol Metab*. **26**(1): 71-78.
- Debray, D., Narkewicz, M. R., Bodewes, F., Colombo, C., Housset, C., de Jonge, H. R., Jonker, J. W., Kelly, D. A., Ling, S. C., Poynard, T., Sogni, P., Trauner, M., Witters, P., Baumann, U., Wilschanski, M. Verkade, H. J. (2017). "Cystic Fibrosis-related Liver Disease: Research Challenges and Future Perspectives." *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. **65**(4): 443-448.
- del Campo, R., Martinez, E., del Fresno, C., Alenda, R., Gomez-Pina, V., Fernandez-Ruiz, I., Siliceo, M., Jurado, T., Toledano, V., Arnalich, F., Garcia-Rio, F. Lopez-Collazo, E. (2011). "Translocated LPS might cause endotoxin tolerance in circulating monocytes of cystic fibrosis patients." *PLoS One*. **6**(12): e29577.
- del Mar Grasa, M., Cabot, C., Adan, C., de Matteis, R., Esteve, M., Cinti, S., Fernandez, J. A., Lopez, Remesar, X. Alemany, A. (2001). "Corticosteroid-binding globulin synthesis and distribution in rat white adipose tissue." *Mol Cell Biochem*. **228**(1-2): 25-31.

- Deuschle, M., Schweiger, U., Standhardt, H., Weber, B. Heuser, I. (1996). "Corticosteroid-binding globulin is not decreased in depressed patients." *Psychoneuroendocrinology*. **21**(8): 645-649.
- Di Sant'Agnese, P. A., Darling, R. C., Perera, G. A. Shea, E. (1953). "Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas; clinical significance and relationship to the disease." *Pediatrics*. **12**(5): 549-563.
- Dibbelt, L., Knuppen, R., Jutting, G., Heimann, S., Klipping, C. O. Parikka-Olexik, H. (1991). "Group comparison of serum ethinyl estradiol, SHBG and CBG levels in 83 women using two low-dose combination oral contraceptives for three months." *Contraception*. **43**(1): 1-21.
- Doe, R. P., Fernandez, R. Seal, U. S. (1964). "Measurement of Corticosteroid-Binding Globulin in Man." *J Clin Endocrinol Metab*. **24**: 1029-1039.
- Donati, M. A. H., K.; Gerson, W.; Klein, M.; McLaughlin, F.J.; Wohl, M.E.B. (1990). "Long-term alternate day prednisone therapy in cystic fibrosis." *Pediatric Pulmonology*. **Suppl 5**: 322.
- Dove, A. M., Szefer, S. J., Hill, M. R., Jusko, W. J., Larsen, G. L. Accurso, F. J. (1992). "Altered prednisolone pharmacokinetics in patients with cystic fibrosis." *J Pediatr*. **120**(5): 789-794.
- Duan, C. Xu, Q. (2005). "Roles of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins in regulating IGF actions." *Gen Comp Endocrinol*. **142**(1-2): 44-52.
- Dumoulin, S. C., Perret, B. P., Bennet, A. P. Caron, P. J. (1995). "Opposite effects of thyroid hormones on binding proteins for steroid hormones (sex hormone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin) in humans." *Eur J Endocrinol*. **132**(5): 594-598.
- Dunn, J. F., Nisula, B. C. Rodbard, D. (1981). "Transport of steroid hormones: binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma." *J Clin Endocrinol Metab*. **53**(1): 58-68.
- Edwards, P. D. Boonstra, R. (2018). "Glucocorticoids and CBG during pregnancy in mammals: diversity, pattern, and function." *Gen Comp Endocrinol*. **259**: 122-130.
- Eigen, H., Rosenstein, B. J., FitzSimmons, S. Schidlow, D. V. (1995). "A multicenter study of alternate-day prednisone therapy in patients with cystic fibrosis. Cystic Fibrosis Foundation Prednisone Trial Group." *J Pediatr*. **126**(4): 515-523.
- Elborn, J. S. (2016). "Cystic fibrosis." *Lancet*. **388**(10059): 2519-2531.
- Elfahime, E. L., Plante, M., Rene, F., Felix, J. M. Koch, B. (1992). "Biosynthesis of hepatic corticosteroid-binding globulin: ontogeny and effect of thyroid hormone." *J Steroid Biochem Mol Biol*. **41**(2): 135-140.
- Emerson, J., Rosenfeld, M., McNamara, S., Ramsey, B. Gibson, R. L. (2002). "Pseudomonas aeruginosa and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis." *Pediatr Pulmonol*. **34**(2): 91-100.

- Emptoz-Bonneton, A., Cousin, P., Seguchi, K., Avvakumov, G. V., Bully, C., Hammond, G. L. Pugeat, M. (2000). "Novel human corticosteroid-binding globulin variant with low cortisol-binding affinity." *J Clin Endocrinol Metab.* **85**(1): 361-367.
- Emptoz-Bonneton, A., Crave, J. C., LeJeune, H., Brebant, C. Pugeat, M. (1997). "Corticosteroid-binding globulin synthesis regulation by cytokines and glucocorticoids in human hepatoblastoma-derived (HepG2) cells." *J Clin Endocrinol Metab.* **82**(11): 3758-3762.
- European Cystic Fibrosis Society (2017). "ECFSR Annual Report 2015."
- Fahy, J. V., Keoghan, M. T., Crummy, E. J. Fitzgerald, M. X. (1991). "Bacteraemia and fungaemia in adults with cystic fibrosis." *J Infect.* **22**(3): 241-245.
- Fanconi, G., Uehlinger, E. Knauer, C. (1936). "Das coeliakiesyndrom bei angeborener zystischer pankreasfibromatose und bronchiectasien." *Wiener Klin. Wochen.* **86**: 753.
- Farber, S. (1945). "Some organic digestive disturbances in early life." *J Mich State Med Soc.* **44**: 587-594.
- Feldman, D., Mondon, C. E., Horner, J. A. Weiser, J. N. (1979). "Glucocorticoid and estrogen regulation of corticosteroid-binding globulin production by rat liver." *Am J Physiol.* **237**(6): E493-499.
- Ferguson, J. H. Chang, A. B. (2014). "Vitamin D supplementation for cystic fibrosis." *Cochrane Database Syst Rev*(5): CD007298.
- Fernandez-Real, J. M., Pugeat, M., Emptoz-Bonneton, A. Ricart, W. (2001). "Study of the effect of changing glucose, insulin, and insulin-like growth factor-I levels on serum corticosteroid binding globulin in lean, obese, and obese subjects with glucose intolerance." *Metabolism.* **50**(10): 1248-1252.
- Fernandez-Real, J. M., Pugeat, M., Grasa, M., Broch, M., Vendrell, J., Brun, J. Ricart, W. (2002). "Serum corticosteroid-binding globulin concentration and insulin resistance syndrome: a population study." *J Clin Endocrinol Metab.* **87**(10): 4686-4690.
- Fernandez-Real, J. M., Pugeat, M., Lopez-Bermejo, A., Bornet, H. Ricart, W. (2005). "Corticosteroid-binding globulin affects the relationship between circulating adiponectin and cortisol in men and women." *Metabolism.* **54**(5): 584-589.
- Fiorotto, R., Scirpo, R., Trauner, M., Fabris, L., Hoque, R., Spirli, C. Strazzabosco, M. (2011). "Loss of CFTR affects biliary epithelium innate immunity and causes TLR4-NF-kappaB-mediated inflammatory response in mice." *Gastroenterology.* **141**(4): 1498-1508, 1508 e1491-1495.
- Fleshner, M., Deak, T., Spencer, R. L., Laudenslager, M. L., Watkins, L. R. Maier, S. F. (1995). "A long-term increase in basal levels of corticosterone and a decrease in corticosteroid-binding globulin after acute stressor exposure." *Endocrinology.* **136**(12): 5336-5342.

- Frairia, R., Agrimonti, F., Fortunati, N., Fazzari, A., Gennari, P. Berta, L. (1988). "Influence of naturally occurring and synthetic glucocorticoids on corticosteroid-binding globulin-steroid interaction in human peripheral plasma." *Ann N Y Acad Sci.* **538**: 287-303.
- Gangadharan, B., Bapat, M., Rossa, J., Antrobus, R., Chittenden, D., Kampa, B., Barnes, E., Klenerman, P., Dwek, R. A. Zitzmann, N. (2012). "Discovery of novel biomarker candidates for liver fibrosis in hepatitis C patients: a preliminary study." *PLoS One.* **7**(6): e39603.
- Gilchrist, F. J., Cox, K. J., Rowe, R., Horsley, A., Webb, A. K., Jones, A. M. Bright-Thomas, R. J. (2013). "Itraconazole and inhaled fluticasone causing hypothalamic-pituitary-adrenal axis suppression in adults with cystic fibrosis." *J Cyst Fibros.* **12**(4): 399-402.
- Girodon-Boulandet, E. Costa, C. (2005). "Génétique de la mucoviscidose." *Médecine thérapeutique/Pédiatrie.* **8**(3): 126-134.
- Griese, M., Latzin, P., Kappler, M., Weckerle, K., Heinzlmaier, T., Bernhardt, T. Hartl, D. (2007). "alpha1-Antitrypsin inhalation reduces airway inflammation in cystic fibrosis patients." *Eur Respir J.* **29**(2): 240-250.
- Gulfo, J., Ledda, A., Gea-Sorli, S., Bonjoch, L., Closa, D., Grasa, M. Esteve, M. (2016). "New Roles for Corticosteroid Binding Globulin and Opposite Expression Profiles in Lung and Liver." *PLoS One.* **11**(1): e0146497.
- Haardt, M., Benharouga, M., Lechardeur, D., Kartner, N. Lukacs, G. L. (1999). "C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis. A novel class of mutation." *J Biol Chem.* **274**(31): 21873-21877.
- Hammond, G. L. (2016). "Plasma steroid-binding proteins: primary gatekeepers of steroid hormone action." *J Endocrinol.* **230**(1): R13-25.
- Hammond, G. L. Langley, M. S. (1986). "Identification and measurement of sex hormone binding globulin (SHBG) and corticosteroid binding globulin (CBG) in human saliva." *Acta Endocrinol (Copenh).* **112**(4): 603-608.
- Hammond, G. L., Smith, C. L., Goping, I. S., Underhill, D. A., Harley, M. J., Reventos, J., Musto, N. A., Gunsalus, G. L. Bardin, C. W. (1987). "Primary structure of human corticosteroid binding globulin, deduced from hepatic and pulmonary cDNAs, exhibits homology with serine protease inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A.* **84**(15): 5153-5157.
- Harness-Brumley, C. L., Elliott, A. C., Rosenbluth, D. B., Raghavan, D. Jain, R. (2014). "Gender differences in outcomes of patients with cystic fibrosis." *J Womens Health (Larchmt).* **23**(12): 1012-1020.
- Heit, C., Jackson, B. C., McAndrews, M., Wright, M. W., Thompson, D. C., Silverman, G. A., Nebert, D. W. Vasiliou, V. (2013). "Update of the human and mouse SERPIN gene superfamily." *Hum Genomics.* **7**: 22.

- Henley, D., Lightman, S. Carrell, R. (2016). "Cortisol and CBG - Getting cortisol to the right place at the right time." *Pharmacol Ther.* **166**: 128-135.
- Hihnala, S., Kujala, M., Toppari, J., Kere, J., Holmberg, C. Hoglund, P. (2006). "Expression of SLC26A3, CFTR and NHE3 in the human male reproductive tract: role in male subfertility caused by congenital chloride diarrhoea." *Mol Hum Reprod.* **12**(2): 107-111.
- Hill, L. A., Bodnar, T. S., Weinberg, J. Hammond, G. L. (2016). "Corticosteroid-binding globulin is a biomarker of inflammation onset and severity in female rats." *J Endocrinol.* **230**(2): 215-225.
- Hill, L. A., Vassiliadi, D. A., Simard, M., Pavlaki, A., Perogamvros, I., Hadjidakis, D. Hammond, G. L. (2012). "Two different corticosteroid-binding globulin variants that lack cortisol-binding activity in a greek woman." *J Clin Endocrinol Metab.* **97**(11): 4260-4267.
- Holt, H. B., Wild, S. H., Postle, A. D., Zhang, J., Koster, G., Umpleby, M., Shojaee-Moradie, F., Dewbury, K., Wood, P. J., Phillips, D. I. Byrne, C. D. (2007). "Cortisol clearance and associations with insulin sensitivity, body fat and fatty liver in middle-aged men." *Diabetologia.* **50**(5): 1024-1032.
- Hovenberg, H. W., Davies, J. R. Carlstedt, I. (1996). "Different mucins are produced by the surface epithelium and the submucosa in human trachea: identification of MUC5AC as a major mucin from the goblet cells." *Biochem J.* **318** (Pt 1): 319-324.
- Hryb, D. J., Khan, M. S., Romas, N. A. Rosner, W. (1986). "Specific binding of human corticosteroid-binding globulin to cell membranes." *Proc Natl Acad Sci U S A.* **83**(10): 3253-3256.
- Hsu, B. R. Kuhn, R. W. (1988). "The role of the adrenal in generating the diurnal variation in circulating levels of corticosteroid-binding globulin in the rat." *Endocrinology.* **122**(2): 421-426.
- Hsu, D., Taylor, P., Fletcher, D., van Heeckeren, R., Eastman, J., van Heeckeren, A., Davis, P., Chmiel, J. F., Pearlman, E. Bonfield, T. L. (2016). "Interleukin-17 Pathophysiology and Therapeutic Intervention in Cystic Fibrosis Lung Infection and Inflammation." *Infect Immun.* **84**(9): 2410-2421.
- Hyde, S. C., Emsley, P., Hartshorn, M. J., Mimmack, M. M., Gileadi, U., Pearce, S. R., Gallagher, M. P., Gill, D. R., Hubbard, R. E. Higgins, C. F. (1990). "Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport." *Nature.* **346**(6282): 362-365.
- Irving, J. A., Pike, R. N., Lesk, A. M. Whisstock, J. C. (2000). "Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function." *Genome Res.* **10**(12): 1845-1864.
- Jacquot, J., Delion, M., Gangloff, S., Braux, J. Velard, F. (2016). "Bone disease in cystic fibrosis: new pathogenic insights opening novel therapies." *Osteoporos Int.* **27**(4): 1401-1412.
- Jaffar-Bandjee, M. C., Lazdunski, A., Bally, M., Carrere, J., Chazalotte, J. P. Galabert, C. (1995). "Production of elastase, exotoxin A, and alkaline protease in sputa during pulmonary

- exacerbation of cystic fibrosis in patients chronically infected by *Pseudomonas aeruginosa*." *J Clin Microbiol.* **33**(4): 924-929.
- Jansson, J. O., Oscarsson, J., Mode, A. Ritzen, E. M. (1989). "Plasma growth hormone pattern and androgens influence the levels of corticosteroid-binding globulin in rat serum." *J Endocrinol.* **122**(3): 725-732.
- Jung, C., Greco, S., Nguyen, H. H., Ho, J. T., Lewis, J. G., Torpy, D. J. Inder, W. J. (2014). "Plasma, salivary and urinary cortisol levels following physiological and stress doses of hydrocortisone in normal volunteers." *BMC Endocr Disord.* **14**: 91.
- Jung, C., Ho, J. T., Torpy, D. J., Rogers, A., Doogue, M., Lewis, J. G., Czajko, R. J. Inder, W. J. (2011). "A longitudinal study of plasma and urinary cortisol in pregnancy and postpartum." *J Clin Endocrinol Metab.* **96**(5): 1533-1540.
- Kari, M. A., Raivio, K. O., Stenman, U. H. Voutilainen, R. (1996). "Serum cortisol, dehydroepiandrosterone sulfate, and steroid-binding globulins in preterm neonates: effect of gestational age and dexamethasone therapy." *Pediatr Res.* **40**(2): 319-324.
- Kartner, N., Hanrahan, J. W., Jensen, T. J., Naismith, A. L., Sun, S. Z., Ackerley, C. A., Reyes, E. F., Tsui, L. C., Rommens, J. M., Bear, C. E. et al. (1991). "Expression of the cystic fibrosis gene in non-epithelial invertebrate cells produces a regulated anion conductance." *Cell.* **64**(4): 681-691.
- Kelly, A. Moran, A. (2013). "Update on cystic fibrosis-related diabetes." *J Cyst Fibros.* **12**(4): 318-331.
- Kerem, B., Rommens, J. M., Buchanan, J. A., Markiewicz, D., Cox, T. K., Chakravarti, A., Buchwald, M. Tsui, L. C. (1989). "Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis." *Science.* **245**(4922): 1073-1080.
- Kerem, E., Viviani, L., Zolin, A., MacNeill, S., Hatziagorou, E., Ellemunter, H., Drevinek, P., Gulmans, V., Krivec, U., Olesen, H. Group, E. P. R. S. (2014). "Factors associated with FEV1 decline in cystic fibrosis: analysis of the ECFS patient registry." *Eur Respir J.* **43**(1): 125-133.
- Khan, M. S., Aden, D. Rosner, W. (1984). "Human corticosteroid binding globulin is secreted by a hepatoma-derived cell line." *J Steroid Biochem.* **20**(2): 677-678.
- Kim, S. J. Skach, W. R. (2012). "Mechanisms of CFTR Folding at the Endoplasmic Reticulum." *Front Pharmacol.* **3**: 201.
- Ko, S. B., Mizuno, N., Yatabe, Y., Yoshikawa, T., Ishiguro, H., Yamamoto, A., Azuma, S., Naruse, S., Yamao, K., Muallem, S. Goto, H. (2010). "Corticosteroids correct aberrant CFTR localization in the duct and regenerate acinar cells in autoimmune pancreatitis." *Gastroenterology.* **138**(5): 1988-1996.
- Konstan, M. W., Byard, P. J., Hoppel, C. L. Davis, P. B. (1995). "Effect of high-dose ibuprofen in patients with cystic fibrosis." *N Engl J Med.* **332**(13): 848-854.

- Konstan, M. W., Krenicky, J. E., Finney, M. R., Kirchner, H. L., Hilliard, K. A., Hilliard, J. B., Davis, P. B., Hoppel, C. L. (2003). "Effect of ibuprofen on neutrophil migration in vivo in cystic fibrosis and healthy subjects." *J Pharmacol Exp Ther.* **306**(3): 1086-1091.
- Konstan, M. W., Ratjen, F. (2012). "Effect of dornase alfa on inflammation and lung function: potential role in the early treatment of cystic fibrosis." *J Cyst Fibros.* **11**(2): 78-83.
- Kopito, L. E., Kosasky, H. J., Shwachman, H. (1973). "Water and electrolytes in cervical mucus from patients with cystic fibrosis." *Fertil Steril.* **24**(7): 512-516.
- Kreda, S. M., Mall, M., Mengos, A., Rochelle, L., Yankaskas, J., Riordan, J. R., Boucher, R. C. (2005). "Characterization of wild-type and deltaF508 cystic fibrosis transmembrane regulator in human respiratory epithelia." *Mol Biol Cell.* **16**(5): 2154-2167.
- Laguna, T. A., Reilly, C. S., Williams, C. B., Welchlin, C., Wendt, C. H. (2015). "Metabolomics analysis identifies novel plasma biomarkers of cystic fibrosis pulmonary exacerbation." *Pediatr Pulmonol.* **50**(9): 869-877.
- Lands, L. C., Milner, R., Cantin, A. M., Manson, D., Corey, M. (2007). "High-dose ibuprofen in cystic fibrosis: Canadian safety and effectiveness trial." *J Pediatr.* **151**(3): 249-254.
- Lands, L. C., Stanojevic, S. (2016). "Oral non-steroidal anti-inflammatory drug therapy for lung disease in cystic fibrosis." *Cochrane Database Syst Rev.* **4**: CD001505.
- Landsteiner, K. (1905). "Darmverschluss durch eingedicktes Meconium. Pankreatitis." *Centr Allg Pathol*(16): 903-907.
- Laube, M., Bossmann, M., Thome, U. H. (2015). "Glucocorticoids Distinctively Modulate the CFTR Channel with Possible Implications in Lung Development and Transition into Extrauterine Life." *PLoS One.* **10**(4): e0124833.
- Law, R. H., Zhang, Q., McGowan, S., Buckle, A. M., Silverman, G. A., Wong, W., Rosado, C. J., Langendorf, C. G., Pike, R. N., Bird, P. I., Whisstock, J. C. (2006). "An overview of the serpin superfamily." *Genome Biol.* **7**(5): 216.
- Le Heron, L., Guillaume, C., Velard, F., Braux, J., Touqui, L., Moriceau, S., Sermet-Gaudelus, I., Laurent-Maquin, D., Jacquot, J. (2010). "Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) regulates the production of osteoprotegerin (OPG) and prostaglandin (PG) E2 in human bone." *J Cyst Fibros.* **9**(1): 69-72.
- Ledder, O., Haller, W., Couper, R. T., Lewindon, P., Oliver, M. (2014). "Cystic fibrosis: an update for clinicians. Part 2: hepatobiliary and pancreatic manifestations." *J Gastroenterol Hepatol.* **29**(12): 1954-1962.
- Lee, T. W., Southern, K. W., Perry, L. A., Penny-Dimri, J. C., Aslam, A. A. (2016). "Topical cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene replacement for cystic fibrosis-related lung disease." *Cochrane Database Syst Rev*(6): CD005599.

- Lewindon, P. J., Pereira, T. N., Hoskins, A. C., Bridle, K. R., Williamson, R. M., Shepherd, R. W. Ramm, G. A. (2002). "The role of hepatic stellate cells and transforming growth factor-beta(1) in cystic fibrosis liver disease." *Am J Pathol.* **160**(5): 1705-1715.
- Lewis, J. G., Bagley, C. J., Elder, P. A., Bachmann, A. W. Torpy, D. J. (2005). "Plasma free cortisol fraction reflects levels of functioning corticosteroid-binding globulin." *Clin Chim Acta.* **359**(1-2): 189-194.
- Lewis, J. G. Elder, P. A. (2011). "Corticosteroid-binding globulin reactive centre loop antibodies recognise only the intact natured protein: elastase cleaved and uncleaved CBG may coexist in circulation." *J Steroid Biochem Mol Biol.* **127**(3-5): 289-294.
- Lewis, J. G. Elder, P. A. (2014). "The reactive centre loop of corticosteroid-binding globulin (CBG) is a protease target for cortisol release." *Mol Cell Endocrinol.* **384**(1-2): 96-101.
- Lewis, J. G., Shand, B. I., Elder, P. A. Scott, R. S. (2004). "Plasma sex hormone-binding globulin rather than corticosteroid-binding globulin is a marker of insulin resistance in obese adult males." *Diabetes Obes Metab.* **6**(4): 259-263.
- Libert, C., Wielockx, B., Hammond, G. L., Brouckaert, P., Fiers, W. Elliott, R. W. (1999). "Identification of a locus on distal mouse chromosome 12 that controls resistance to tumor necrosis factor-induced lethal shock." *Genomics.* **55**(3): 284-289.
- Liles, W. C., Dale, D. C. Klebanoff, S. J. (1995). "Glucocorticoids inhibit apoptosis of human neutrophils." *Blood.* **86**(8): 3181-3188.
- Lin, G. X., Selcer, K. W., Beale, E. G., Gray, G. O. Leavitt, W. W. (1990). "Characterization of the corticosteroid-binding globulin messenger ribonucleic acid response in the pregnant hamster." *Endocrinology.* **127**(4): 1934-1940.
- Lin, H. Y., Underhill, C., Lei, J. H., Helander-Claesson, A., Lee, H. Y., Gardill, B. R., Muller, Y. A., Wang, H. Hammond, G. L. (2012). "High frequency of SERPINA6 polymorphisms that reduce plasma corticosteroid-binding globulin activity in Chinese subjects." *J Clin Endocrinol Metab.* **97**(4): E678-686.
- Linquette, M., Lefebvre, J., Racadot, A., Cappoen, J. P. Fontaine-Delort, S. (1976). "[Production rate and mean plasma concentration of cortisol in hyperthyroidism (author's transl)]." *Ann Endocrinol (Paris).* **37**(5): 331-345.
- Linsdell, P. Hanrahan, J. W. (1998). "Glutathione permeability of CFTR." *Am J Physiol.* **275**(1 Pt 1): C323-326.
- Linsdell, P., Tabcharani, J. A., Rommens, J. M., Hou, Y. X., Chang, X. B., Tsui, L. C., Riordan, J. R. Hanrahan, J. W. (1997). "Permeability of wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels to polyatomic anions." *J Gen Physiol.* **110**(4): 355-364.
- Liu, F., Zhang, Z., Csanady, L., Gadsby, D. C. Chen, J. (2017). "Molecular Structure of the Human CFTR Ion Channel." *Cell.* **169**(1): 85-95 e88.

- Lopes-Pacheco, M. (2016). "CFTR Modulators: Shedding Light on Precision Medicine for Cystic Fibrosis." *Front Pharmacol.* **7**: 275.
- Loric, S., Egloff, M., Domingo, M., Lacronique, J. Degrelle, H. (1989). "Immunochemical characterization of corticosteroid-binding globulin in human bronchoalveolar fluid." *Clin Chim Acta.* **186**(1): 19-23.
- MacKenzie, T., Gifford, A. H., Sabadosa, K. A., Quinton, H. B., Knapp, E. A., Goss, C. H. Marshall, B. C. (2014). "Longevity of patients with cystic fibrosis in 2000 to 2010 and beyond: survival analysis of the Cystic Fibrosis Foundation patient registry." *Ann Intern Med.* **161**(4): 233-241.
- Mackerness, K. J., Jenkins, G. R., Bush, A. Jose, P. J. (2008). "Characterisation of the range of neutrophil stimulating mediators in cystic fibrosis sputum." *Thorax.* **63**(7): 614-620.
- Maitra, U. S., Khan, M. S. Rosner, W. (1993). "Corticosteroid-binding globulin receptor of the rat hepatic membrane: solubilization, partial characterization, and the effect of steroids on binding." *Endocrinology.* **133**(4): 1817-1822.
- Mall, M., Bleich, M., Greger, R., Schreiber, R. Kunzelmann, K. (1998). "The amiloride-inhibitable Na⁺ conductance is reduced by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in normal but not in cystic fibrosis airways." *J Clin Invest.* **102**(1): 15-21.
- Maqbool, A. Pauwels, A. (2017). "Cystic Fibrosis and gastroesophageal reflux disease." *J Cyst Fibros.* **16 Suppl 2**: S2-S13.
- Marti, O., Martin, M., Gavaldà, A., Giralt, M., Hidalgo, J., Hsu, B. R., Kuhn, R. W. Armario, A. (1997). "Inhibition of corticosteroid-binding globulin caused by a severe stressor is apparently mediated by the adrenal but not by glucocorticoid receptors." *Endocrine.* **6**(2): 159-164.
- Mastorakos, G., Chrousos, G. P. Weber, J. S. (1993). "Recombinant interleukin-6 activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in humans." *J Clin Endocrinol Metab.* **77**(6): 1690-1694.
- McDonald, J. A., Handelsman, D. J., Dilworth, P., Conway, A. J. McCaughan, G. W. (1993). "Hypothalamic-pituitary adrenal function in end-stage non-alcoholic liver disease." *J Gastroenterol Hepatol.* **8**(3): 247-253.
- McElvaney, N. G. (2016). "Alpha-1 Antitrypsin Therapy in Cystic Fibrosis and the Lung Disease Associated with Alpha-1 Antitrypsin Deficiency." *Ann Am Thorac Soc.* **13 Suppl 2**: S191-196.
- Melis, N., Tauc, M., Cougnon, M., Bendahhou, S., Giuliano, S., Rubera, I. Duranton, C. (2014). "Revisiting CFTR inhibition: a comparative study of CFTRinh -172 and GlyH-101 inhibitors." *Br J Pharmacol.* **171**(15): 3716-3727.
- Mendel, C. M. (1989). "The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model." *Endocr Rev.* **10**(3): 232-274.

- Meyer, E. J., Nenke, M. A., Rankin, W., Lewis, J. G. Torpy, D. J. (2016). "Corticosteroid-Binding Globulin: A Review of Basic and Clinical Advances." *Horm Metab Res.* **48**(6): 359-371.
- Meyer, K. C., Lewandoski, J. R., Zimmerman, J. J., Nunley, D., Calhoun, W. J. Dopico, G. A. (1991). "Human neutrophil elastase and elastase/alpha 1-antiprotease complex in cystic fibrosis. Comparison with interstitial lung disease and evaluation of the effect of intravenously administered antibiotic therapy." *Am Rev Respir Dis.* **144**(3 Pt 1): 580-585.
- Mihrshahi, R., Lewis, J. G. Ali, S. O. (2006). "Hormonal effects on the secretion and glycoform profile of corticosteroid-binding globulin." *J Steroid Biochem Mol Biol.* **101**(4-5): 275-285.
- Milla, C. E., Chmiel, J. F., Accurso, F. J., VanDevanter, D. R., Konstan, M. W., Yarranton, G., Geller, D. E. Group, K. B. S. (2014). "Anti-PcrV antibody in cystic fibrosis: a novel approach targeting *Pseudomonas aeruginosa* airway infection." *Pediatr Pulmonol.* **49**(7): 650-658.
- Minni, A. M., de Medeiros, G. F., Helbling, J. C., Duittoz, A., Marissal-Arvy, N., Foury, A., De Smedt-Peyrusse, V., Pallet, V. Moisan, M. P. (2014). "Role of corticosteroid binding globulin in emotional reactivity sex differences in mice." *Psychoneuroendocrinology.* **50**: 252-263.
- Minni, A. M., Dorey, R., Pierard, C., Dominguez, G., Helbling, J. C., Foury, A., Beracochea, D. Moisan, M. P. (2012). "Critical role of plasma corticosteroid-binding-globulin during stress to promote glucocorticoid delivery to the brain: impact on memory retrieval." *Endocrinology.* **153**(10): 4766-4774.
- Misao, R., Hori, M., Ichigo, S., Fujimoto, J. Tamaya, T. (1994). "Corticosteroid-binding globulin mRNA levels in human uterine endometrium." *Steroids.* **59**(10): 603-607.
- Misao, R., Iwagaki, S., Sun, W. S., Fujimoto, J., Saio, M., Takami, T. Tamaya, T. (1999). "Evidence for the synthesis of corticosteroid-binding globulin in human placenta." *Horm Res.* **51**(4): 162-167.
- Mitchell, E., Torpy, D. J. Bagley, C. J. (2004). "Pregnancy-associated corticosteroid-binding globulin: high resolution separation of glycan isoforms." *Horm Metab Res.* **36**(6): 357-359.
- Moore, D. E., Kawagoe, S., Davajan, V., Mishell, D. R. Nakamura, R. M. (1978). "An in vivo system in man for quantitation of estrogenicity. I. Physiologic changes in binding capacity of serum corticosteroid-binding globulin." *Am J Obstet Gynecol.* **130**(4): 475-481.
- Moore, D. E., Kawagoe, S., Davajan, V., Nakamura, R. M. Mishell, D. R. (1978). "An in vivo system in man for quantitation of estrogenicity. II. Pharmacologic changes in binding capacity of serum corticosteroid-binding globulin induced by conjugated estrogens, mestranol, and ethinyl estradiol." *Am J Obstet Gynecol.* **130**(4): 482-486.
- Moss, R. B., Mayer-Hamblett, N., Wagener, J., Daines, C., Hale, K., Ahrens, R., Gibson, R. L., Anderson, P., Retsch-Bogart, G., Nasr, S. Z., Noth, I., Waltz, D., Zeitlin, P., Ramsey, B. Starko, K. (2005). "Randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating study of aerosolized interferon gamma-1b in patients with mild to moderate cystic fibrosis lung disease." *Pediatr Pulmonol.* **39**(3): 209-218.

- Mueller, C., Braag, S. A., Martino, A. T., Tang, Q., Campbell-Thompson, M. Flotte, T. R. (2009). "The pros and cons of immunomodulatory IL-10 gene therapy with recombinant AAV in a Cftr^{-/-} -dependent allergy mouse model." *Gene Ther.* **16**(2): 172-183.
- Muller, C. A., Belyaev, O., Vogeser, M., Weyhe, D., Gloor, B., Strobel, O., Werner, J., Borgstrom, A., Buchler, M. W. Uhl, W. (2007). "Corticosteroid-binding globulin: a possible early predictor of infection in acute necrotizing pancreatitis." *Scand J Gastroenterol.* **42**(11): 1354-1361.
- Munck, A., Sahler, C., Briard, M., Vidailhet, M. Farriaux, J. P. (2005). "[Cystic fibrosis: the French neonatal screening organization, preliminary results]." *Arch Pediatr.* **12**(6): 646-649.
- Murphy, B. E. (1967). "Some studies of the protein-binding of steroids and their application to the routine micro and ultramicro measurement of various steroids in body fluids by competitive protein-binding radioassay." *J Clin Endocrinol Metab.* **27**(7): 973-990.
- Nader, N., Raverot, G., Emptoz-Bonneton, A., Dechaud, H., Bonnay, M., Baudin, E. Pugeat, M. (2006). "Mitotane has an estrogenic effect on sex hormone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in humans." *J Clin Endocrinol Metab.* **91**(6): 2165-2170.
- Nährlich, L., Burkhart, M. Wiese, B. (2016). "German CF-registry Annual Report 2015."
- Nakhla, A. M., Khan, M. S. Rosner, W. (1988). "Induction of adenylate cyclase in a mammary carcinoma cell line by human corticosteroid-binding globulin." *Biochem Biophys Res Commun.* **153**(3): 1012-1018.
- Namciu, S. J., Friedman, R. D., Marsden, M. D., Sarausad, L. M., Jasoni, C. L. Fournier, R. E. (2004). "Sequence organization and matrix attachment regions of the human serine protease inhibitor gene cluster at 14q32.1." *Mamm Genome.* **15**(3): 162-178.
- Nenke, M. A., Rankin, W., Chapman, M. J., Stevens, N. E., Diener, K. R., Hayball, J. D., Lewis, J. G. Torpy, D. J. (2015). "Depletion of high-affinity corticosteroid-binding globulin corresponds to illness severity in sepsis and septic shock; clinical implications." *Clin Endocrinol (Oxf).* **82**(6): 801-807.
- Noah, T. L., Ivins, S. S., Abode, K. A., Stewart, P. W., Michelson, P. H., Harris, W. T., Henry, M. M. Leigh, M. W. (2010). "Inhaled versus systemic antibiotics and airway inflammation in children with cystic fibrosis and Pseudomonas." *Pediatr Pulmonol.* **45**(3): 281-290.
- Nowaczynski, W., Nakielana, E. M., Murakami, T. Shurmans, J. (1987). "The relationship of plasma aldosterone-binding globulin to blood pressure regulation in young adults with cystic fibrosis." *Clin Physiol Biochem.* **5**(5): 276-286.
- O'Sullivan, B. P. Freedman, S. D. (2009). "Cystic fibrosis." *Lancet.* **373**(9678): 1891-1904.
- Oray, M., Abu Samra, K., Ebrahimiadib, N., Meese, H. Foster, C. S. (2016). "Long-term side effects of glucocorticoids." *Expert Opin Drug Saf.* **15**(4): 457-465.

- Patel, S., Sinha, I. P., Dwan, K., Echevarria, C., Schechter, M. Southern, K. W. (2015). "Potentiators (specific therapies for class III and IV mutations) for cystic fibrosis." *Cochrane Database Syst Rev*(3): CD009841.
- Pauwels, A., Blondeau, K., Dupont, L. J. Sifrim, D. (2012). "Mechanisms of increased gastroesophageal reflux in patients with cystic fibrosis." *Am J Gastroenterol.* **107**(9): 1346-1353.
- Pemberton, P. A., Stein, P. E., Pepys, M. B., Potter, J. M. Carrell, R. W. (1988). "Hormone binding globulins undergo serpin conformational change in inflammation." *Nature.* **336**(6196): 257-258.
- Perogamvros, I., Aarons, L., Miller, A. G., Trainer, P. J. Ray, D. W. (2011). "Corticosteroid-binding globulin regulates cortisol pharmacokinetics." *Clin Endocrinol (Oxf).* **74**(1): 30-36.
- Perogamvros, I., Underhill, C., Henley, D. E., Hadfield, K. D., Newman, W. G., Ray, D. W., Lightman, S. L., Hammond, G. L. Trainer, P. J. (2010). "Novel corticosteroid-binding globulin variant that lacks steroid binding activity." *J Clin Endocrinol Metab.* **95**(10): E142-150.
- Petersen, H. H., Andreassen, T. K., Breiderhoff, T., Brasen, J. H., Schulz, H., Gross, V., Grone, H. J., Nykjaer, A. Willnow, T. E. (2006). "Hyporesponsiveness to glucocorticoids in mice genetically deficient for the corticosteroid binding globulin." *Mol Cell Biol.* **26**(19): 7236-7245.
- Pozniak, K. N., Pearen, M. A., Pereira, T. N., Kramer, C. S. M., Kalita-De Croft, P., Nawaratna, S. K., Fernandez-Rojo, M. A., Gobert, G. N., Tirnitz-Parker, J. E. E., Olynyk, J. K., Shepherd, R. W., Lewindon, P. J. Ramm, G. A. (2017). "Taurocholate Induces Biliary Differentiation of Liver Progenitor Cells Causing Hepatic Stellate Cell Chemotaxis in the Ductular Reaction: Role in Pediatric Cystic Fibrosis Liver Disease." *Am J Pathol.* **187**(12): 2744-2757.
- Preville-Ratelle, S., Coriati, A., Menard, A., Bourdeau, I., Tremblay, F. Berthiaume, Y. (2018). "Adrenal Insufficiency in Cystic Fibrosis: A Rare Phenomenon?" *Can Respir J.* **2018**: 3629031.
- Pugeat, M., Bonneton, A., Perrot, D., Rocle-Nicolas, B., Lejeune, H., Grenot, C., Dechaud, H., Brebant, C., Motin, J. Cuilleron, C. Y. (1989). "Decreased immunoreactivity and binding activity of corticosteroid-binding globulin in serum in septic shock." *Clin Chem.* **35**(8): 1675-1679.
- Pugeat, M. M., Dunn, J. F. Nisula, B. C. (1981). "Transport of steroid hormones: interaction of 70 drugs with testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma." *J Clin Endocrinol Metab.* **53**(1): 69-75.
- Pusch, L., Wegmann, S., Caldwell, J. D. Jirikowski, G. F. (2009). "Expression of corticosteroid-binding globulin in human astrocytoma cell line." *Cell Mol Neurobiol.* **29**(4): 583-588.
- Qian, X., Droste, S. K., Gutierrez-Mecinas, M., Collins, A., Kersante, F., Reul, J. M. Linthorst, A. C. (2011). "A rapid release of corticosteroid-binding globulin from the liver restrains the glucocorticoid hormone response to acute stress." *Endocrinology.* **152**(10): 3738-3748.

- Qureshi, A. C., Bahri, A., Breen, L. A., Barnes, S. C., Powrie, J. K., Thomas, S. M. Carroll, P. V. (2007). "The influence of the route of oestrogen administration on serum levels of cortisol-binding globulin and total cortisol." *Clin Endocrinol (Oxf)*. **66**(5): 632-635.
- Racadot, A., Racadot-Leroy, N., Le Gaillard, F. Dautrevaux, M. (1976). "[Determination of serum transcortin levels by electroimmunodiffusion (author's transl)]." *Clin Chim Acta*. **66**(2): 171-180.
- Ramsey, B. W., Dorkin, H. L., Eisenberg, J. D., Gibson, R. L., Harwood, I. R., Kravitz, R. M., Schidlow, D. V., Wilmott, R. W., Astley, S. J., McBurnie, M. A. et al. (1993). "Efficacy of aerosolized tobramycin in patients with cystic fibrosis." *N Engl J Med*. **328**(24): 1740-1746.
- Ratjen, F., Saiman, L., Mayer-Hamblett, N., Lands, L. C., Kloster, M., Thompson, V., Emmett, P., Marshall, B., Accurso, F., Sagel, S. Anstead, M. (2012). "Effect of azithromycin on systemic markers of inflammation in patients with cystic fibrosis uninfected with *Pseudomonas aeruginosa*." *Chest*. **142**(5): 1259-1266.
- Rebeyrol, C., Saint-Criq, V., Guillot, L., Riffault, L., Corvol, H., Chadelat, K., Ray, D. W., Clement, A., Tabary, O. Le Rouzic, P. (2012). "Glucocorticoids reduce inflammation in cystic fibrosis bronchial epithelial cells." *Cell Signal*. **24**(5): 1093-1099.
- Regnier, A., Dannhoffer, L., Blouquit-Laye, S., Bakari, M., Naline, E. Chinet, T. (2008). "Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the human distal lung." *Hum Pathol*. **39**(3): 368-376.
- Rhodin, J. A. (1966). "The ciliated cell. Ultrastructure and function of the human tracheal mucosa." *Am Rev Respir Dis*. **93**(3): Suppl:1-15.
- Rich, D. P., Anderson, M. P., Gregory, R. J., Cheng, S. H., Paul, S., Jefferson, D. M., McCann, J. D., Klinger, K. W., Smith, A. E. Welsh, M. J. (1990). "Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells." *Nature*. **347**(6291): 358-363.
- Richard, E., Fernandez-Real, J.-M., Lopez-Bermejo, A., Ricart, W., Déchaud, H., Pugeat, M. Moisan, M.-P. (2009). "Corticosteroid binding globulin and glucocorticoid receptor genotypes influence body composition in a male population." *International Journal of Genetics and Molecular Biology*. **1**(4): 59-63.
- Richard, E. M., Helbling, J. C., Tridon, C., Desmedt, A., Minni, A. M., Cador, M., Pourtau, L., Konsman, J. P., Mormede, P. Moisan, M. P. (2010). "Plasma transcortin influences endocrine and behavioral stress responses in mice." *Endocrinology*. **151**(2): 649-659.
- Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J. L. et al. (1989). "Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA." *Science*. **245**(4922): 1066-1073.

- Rommens, J. M., Iannuzzi, M. C., Kerem, B., Drumm, M. L., Melmer, G., Dean, M., Rozmahel, R., Cole, J. L., Kennedy, D., Hidaka, N. et al. (1989). "Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping." *Science*. **245**(4922): 1059-1065.
- Rosenstein, B. J. Cutting, G. R. (1998). "The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel." *J Pediatr*. **132**(4): 589-595.
- Rosenthal, H. E., Slaunwhite, W. R., Jr. Sandberg, A. A. (1969). "Transcortin: a corticosteroid-binding protein of plasma. X. Cortisol and progesterone interplay and unbound levels of these steroids in pregnancy." *J Clin Endocrinol Metab*. **29**(3): 352-367.
- Rosner, W., Beers, P. C., Awan, T. Khan, M. S. (1976). "Identification of corticosteroid-binding globulin in human milk: measurement with a filter disk assay." *J Clin Endocrinol Metab*. **42**(6): 1064-1073.
- Rosner, W., Darmstadt, R. A. Toppel, S. (1973). "A simple precipitin test for corticosteroid-binding globulin: use in a search for the absence of corticosteroid-binding globulin in 10,000 subjects." *J Clin Endocrinol Metab*. **37**(6): 983-985.
- Roth-Isigkeit, A. K., Dibbelt, L. Schmucker, P. (2000). "Blood levels of corticosteroid-binding globulin, total cortisol and unbound cortisol in patients undergoing coronary artery bypass grafting surgery with cardiopulmonary bypass." *Steroids*. **65**(9): 513-520.
- Ruddell, R. G., Knight, B., Tirnitz-Parker, J. E., Akhurst, B., Summerville, L., Subramaniam, V. N., Olynyk, J. K. Ramm, G. A. (2009). "Lymphotoxin-beta receptor signaling regulates hepatic stellate cell function and wound healing in a murine model of chronic liver injury." *Hepatology*. **49**(1): 227-239.
- Ruffin, M., Volland, M., Marie, S., Bonora, M., Blanchard, E., Blouquit-Laye, S., Naline, E., Puyo, P., Le Rouzic, P., Guillot, L., Corvol, H., Clement, A. Tabary, O. (2013). "Anoctamin 1 dysregulation alters bronchial epithelial repair in cystic fibrosis." *Biochim Biophys Acta*. **1832**(12): 2340-2351.
- Saint-Criq, V. Gray, M. A. (2017). "Role of CFTR in epithelial physiology." *Cell Mol Life Sci*. **74**(1): 93-115.
- Saint-Criq, V., Rebeyrol, C., Ruffin, M., Roque, T., Guillot, L., Jacquot, J., Clement, A. Tabary, O. (2011). "Restoration of chloride efflux by azithromycin in airway epithelial cells of cystic fibrosis patients." *Antimicrob Agents Chemother*. **55**(4): 1792-1793.
- Saint-Criq, V., Ruffin, M., Rebeyrol, C., Guillot, L., Jacquot, J., Clement, A. Tabary, O. (2012). "Azithromycin fails to reduce inflammation in cystic fibrosis airway epithelial cells." *Eur J Pharmacol*. **674**(1): 1-6.
- Sandberg, A. A., Woodruff, M., Rosenthal, H., Nienhouse, S. Slaunwhite, W. R., Jr. (1964). "Transcortin: A Corticosteroid-Binding Protein of Plasma. Vii. Half-Life in Normal and Estrogen-Treated Subjects." *J Clin Invest*. **43**: 461-466.

- Savu, L., Lombart, C. Nunez, E. A. (1980). "Corticosterone binding globulin: an acute phase "negative" protein in the rat." *FEBS Lett.* **113**(1): 102-106.
- Savu, L., Zouaghi, H., Carli, A. Nunez, E. A. (1981). "Serum depletion of corticosteroid binding activities, an early marker of human septic shock." *Biochem Biophys Res Commun.* **102**(1): 411-419.
- Schafer, H. H., Gebhart, V. M., Hertel, K. Jirikowski, G. F. (2015). "Expression of corticosteroid-binding globulin CBG in the human heart." *Horm Metab Res.* **47**(8): 596-599.
- Schindler, T., Michel, S. Wilson, A. W. (2015). "Nutrition Management of Cystic Fibrosis in the 21st Century." *Nutr Clin Pract.* **30**(4): 488-500.
- Schlechte, J. A. Hamilton, D. (1987). "The effect of glucocorticoids on corticosteroid binding globulin." *Clin Endocrinol (Oxf).* **27**(2): 197-203.
- Scott, E. M., McGarrigle, H. H. Lachelin, G. C. (1990). "The increase in plasma and saliva cortisol levels in pregnancy is not due to the increase in corticosteroid-binding globulin levels." *J Clin Endocrinol Metab.* **71**(3): 639-644.
- Scott, S. M. Wells, L. (1995). "Corticosteroid-binding globulin in preterm infants in an intensive care unit." *Horm Res.* **44**(5): 218-221.
- Scrocchi, L. A., Orava, M., Smith, C. L., Han, V. K. Hammond, G. L. (1993). "Spatial and temporal distribution of corticosteroid-binding globulin and its messenger ribonucleic acid in embryonic and fetal mice." *Endocrinology.* **132**(2): 903-909.
- Serafini, S. M. Michaelson, E. D. (1977). "Length and distribution of cilia in human and canine airways." *Bull Eur Physiopathol Respir.* **13**(4): 551-559.
- Seralini, G. E., Berube, D., Gagne, R. Hammond, G. L. (1990). "The human corticosteroid binding globulin gene is located on chromosome 14q31-q32.1 near two other serine protease inhibitor genes." *Hum Genet.* **86**(1): 73-75.
- Shed, E. F., Haworth, C. S., Barker, H., Bilton, D. Compston, J. E. (2010). "Osteoclast function, bone turnover and inflammatory cytokines during infective exacerbations of cystic fibrosis." *J Cyst Fibros.* **9**(2): 93-98.
- Shed, E. F., Haworth, C. S., Condliffe, A. M., McKeon, D. J., Scott, M. A. Compston, J. E. (2007). "Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) is expressed in human bone." *Thorax.* **62**(7): 650-651.
- Shimura, S., Sasaki, T., Ikeda, K., Yamauchi, K., Sasaki, H. Takishima, T. (1990). "Direct inhibitory action of glucocorticoid on glycoconjugate secretion from airway submucosal glands." *Am Rev Respir Dis.* **141**(4 Pt 1): 1044-1049.

- Shoki, A. H., Mayer-Hamblett, N., Wilcox, P. G., Sin, D. D. Quon, B. S. (2013). "Systematic review of blood biomarkers in cystic fibrosis pulmonary exacerbations." *Chest*. **144**(5): 1659-1670.
- Silverman, G. A., Bird, P. I., Carrell, R. W., Church, F. C., Coughlin, P. B., Gettins, P. G., Irving, J. A., Lomas, D. A., Luke, C. J., Moyer, R. W., Pemberton, P. A., Remold-O'Donnell, E., Salvesen, G. S., Travis, J. Whisstock, J. C. (2001). "The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature." *J Biol Chem*. **276**(36): 33293-33296.
- Simard, M., Hill, L. A., Lewis, J. G. Hammond, G. L. (2015). "Naturally occurring mutations of human corticosteroid-binding globulin." *J Clin Endocrinol Metab*. **100**(1): E129-139.
- Simard, M., Hill, L. A., Underhill, C. M., Keller, B. O., Villanueva, I., Hancock, R. E. Hammond, G. L. (2014). "Pseudomonas aeruginosa elastase disrupts the cortisol-binding activity of corticosteroid-binding globulin." *Endocrinology*. **155**(8): 2900-2908.
- Simard, M., Underhill, C. Hammond, G. L. (2018). "Functional implications of corticosteroid-binding globulin N-glycosylation." *J Mol Endocrinol*. **60**(2): 71-84.
- Sivukhina, E. V. Jirikowski, G. F. (2014). "Adrenal steroids in the brain: role of the intrinsic expression of corticosteroid-binding globulin (CBG) in the stress response." *Steroids*. **81**: 70-73.
- Slaunwhite, W. R., Jr. Sandberg, A. A. (1959). "Transcortin: a corticosteroid-binding protein of plasma." *J Clin Invest*. **38**(2): 384-391.
- Smith, C. L. Hammond, G. L. (1991). "An amino acid substitution in biobreeding rat corticosteroid binding globulin results in reduced steroid binding affinity." *J Biol Chem*. **266**(28): 18555-18559.
- Smith, C. L. Hammond, G. L. (1991). "Ontogeny of corticosteroid-binding globulin biosynthesis in the rat." *Endocrinology*. **128**(2): 983-988.
- Smith, C. L. Hammond, G. L. (1992). "Hormonal regulation of corticosteroid-binding globulin biosynthesis in the male rat." *Endocrinology*. **130**(4): 2245-2251.
- Sonneville, F., Ruffin, M., Guillot, L., Rousselet, N., Le Rouzic, P., Corvol, H. Tabary, O. (2015). "New insights about miRNAs in cystic fibrosis." *Am J Pathol*. **185**(4): 897-908.
- Southern, K. W., Barker, P. M., Solis-Moya, A. Patel, L. (2012). "Macrolide antibiotics for cystic fibrosis." *Cochrane Database Syst Rev*. **11**: CD002203.
- Staufer, K., Halilbasic, E., Trauner, M. Kazemi-Shirazi, L. (2014). "Cystic fibrosis related liver disease--another black box in hepatology." *Int J Mol Sci*. **15**(8): 13529-13549.
- Strel'chyonok, O. A. Avvakumov, G. V. (1983). "Evidence for the presence of specific binding sites for transcortin in human liver plasma membranes." *Biochim Biophys Acta*. **755**(3): 514-517.

- Strel'chyonok, O. A., Avvakumov, G. V. (1991). "Interaction of human CBG with cell membranes." *J Steroid Biochem Mol Biol.* **40**(4-6): 795-803.
- Strel'chyonok, O. A., Avvakumov, G. V., Akhrem, A. A. (1984). "Pregnancy-associated molecular variants of human serum transcortin and thyroxine-binding globulin." *Carbohydr Res.* **134**(1): 133-140.
- Sumer-Bayraktar, Z., Kolarich, D., Campbell, M. P., Ali, S., Packer, N. H., Thaysen-Andersen, M. (2011). "N-glycans modulate the function of human corticosteroid-binding globulin." *Mol Cell Proteomics.* **10**(8): M111 009100.
- Tabary, O., Zahm, J. M., Hinrasky, J., Couetil, J. P., Cornillet, P., Guenounou, M., Gaillard, D., Puchelle, E., Jacquot, J. (1998). "Selective up-regulation of chemokine IL-8 expression in cystic fibrosis bronchial gland cells in vivo and in vitro." *Am J Pathol.* **153**(3): 921-930.
- Tabcharani, J. A., Rommens, J. M., Hou, Y. X., Chang, X. B., Tsui, L. C., Riordan, J. R., Hanrahan, J. W. (1993). "Multi-ion pore behaviour in the CFTR chloride channel." *Nature.* **366**(6450): 79-82.
- Tam, J., Nash, E. F., Ratjen, F., Tullis, E., Stephenson, A. (2013). "Nebulized and oral thiol derivatives for pulmonary disease in cystic fibrosis." *Cochrane Database Syst Rev*(7): CD007168.
- Tannenbaum, B., Rowe, W., Sharma, S., Diorio, J., Steverman, A., Walker, M., Meaney, M. J. (1997). "Dynamic variations in plasma corticosteroid-binding globulin and basal HPA activity following acute stress in adult rats." *J Neuroendocrinol.* **9**(3): 163-168.
- Tchoukaev, A., Taytard, J., Rousselet, N., Rebeyrol, C., Debray, D., Blouquit-Laye, S., Moisan, M. P., Foury, A., Guillot, L., Corvol, H., Tabary, O., Le Rouzic, P. (2018). "Opposite Expression of Hepatic and Pulmonary Corticosteroid-Binding Globulin in Cystic Fibrosis Patients." *Front Pharmacol.* **9**: 545.
- Tinnikov, A. A. (1999). "Responses of serum corticosterone and corticosteroid-binding globulin to acute and prolonged stress in the rat." *Endocrine.* **11**(2): 145-150.
- Tinnikov, A. A., Legan, M. V., Pavlova, I. P., Litasova, E. E., Ivanova, L. N. (1993). "Serum corticosteroid-binding globulin levels in children undergoing heart surgery." *Steroids.* **58**(11): 536-539.
- Torpy, D. J., Bachmann, A. W., Gartside, M., Grice, J. E., Harris, J. M., Clifton, P., Easteal, S., Jackson, R. V., Whitworth, J. A. (2004). "Association between chronic fatigue syndrome and the corticosteroid-binding globulin gene ALA SER224 polymorphism." *Endocr Res.* **30**(3): 417-429.
- Torpy, D. J., Bachmann, A. W., Grice, J. E., Fitzgerald, S. P., Phillips, P. J., Whitworth, J. A., Jackson, R. V. (2001). "Familial corticosteroid-binding globulin deficiency due to a novel null mutation: association with fatigue and relative hypotension." *J Clin Endocrinol Metab.* **86**(8): 3692-3700.
- Torpy, D. J., Lundgren, B. A., Ho, J. T., Lewis, J. G., Scott, H. S., Mericq, V. (2012). "CBG Santiago: a novel CBG mutation." *J Clin Endocrinol Metab.* **97**(1): E151-155.

- Tridello, G., Menin, L., Pintani, E., Bergamini, G., Assael, B. M. Melotti, P. (2016). "Nasal potential difference outcomes support diagnostic decisions in cystic fibrosis." *J Cyst Fibros.* **15**(5): 579-582.
- Tsigos, C., Kyrou, I., Chrousos, G. P. Papanicolaou, D. A. (1998). "Prolonged suppression of corticosteroid-binding globulin by recombinant human interleukin-6 in man." *J Clin Endocrinol Metab.* **83**(9): 3379.
- Turnbull, A. V. Rivier, C. L. (1999). "Sprague-Dawley rats obtained from different vendors exhibit distinct adrenocorticotropin responses to inflammatory stimuli." *Neuroendocrinology.* **70**(3): 186-195.
- Underhill, D. A. Hammond, G. L. (1989). "Organization of the human corticosteroid binding globulin gene and analysis of its 5'-flanking region." *Mol Endocrinol.* **3**(9): 1448-1454.
- Vaincre la mucoviscidose Ined (2016). "Registre français de la mucoviscidose - Bilan des données 2015."
- Vaincre la mucoviscidose Ined (2017). "Registre français de la mucoviscidose – Bilan des données 2016."
- Van Baelen, H., Brepoels, R. De Moor, P. (1982). "Transcortin Leuven: a variant of human corticosteroid-binding globulin with decreased cortisol-binding affinity." *J Biol Chem.* **257**(7): 3397-3400.
- Van Baelen, H., Power, S. G. Hammond, G. L. (1993). "Decreased cortisol-binding affinity of transcortin Leuven is associated with an amino acid substitution at residue-93." *Steroids.* **58**(6): 275-277.
- van Haren, E. H., Lammers, J. W., Festen, J., Heijerman, H. G., Groot, C. A. van Herwaarden, C. L. (1995). "The effects of the inhaled corticosteroid budesonide on lung function and bronchial hyperresponsiveness in adult patients with cystic fibrosis." *Respir Med.* **89**(3): 209-214.
- VanGuilder, H. D., Vrana, K. E. Freeman, W. M. (2008). "Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis." *Biotechniques.* **44**(5): 619-626.
- Verhoog, N., Allie-Reid, F., Vanden Berghe, W., Smith, C., Haegeman, G., Hapgood, J. Louw, A. (2014). "Inhibition of corticosteroid-binding globulin gene expression by glucocorticoids involves C/EBPbeta." *PLoS One.* **9**(10): e110702.
- Vogeser, M., Felbinger, T. W., Kilger, E., Roll, W., Fraunberger, P. Jacob, K. (1999). "Corticosteroid-binding globulin and free cortisol in the early postoperative period after cardiac surgery." *Clin Biochem.* **32**(3): 213-216.
- Wainwright, C. E., Elborn, J. S., Ramsey, B. W., Marigowda, G., Huang, X., Cipolli, M., Colombo, C., Davies, J. C., De Boeck, K., Flume, P. A., Konstan, M. W., McColley, S. A., McCoy, K., McKone, E. F., Munck, A., Ratjen, F., Rowe, S. M., Waltz, D., Boyle, M. P., Group, T. S. Group, T. S. (2015).

- "Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR." *N Engl J Med.* **373**(3): 220-231.
- Wald, E. L., Preze, E., Eickhoff, J. C. Backer, C. L. (2011). "The effect of cardiopulmonary bypass on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in children." *Pediatr Crit Care Med.* **12**(2): 190-196.
- Wansleeben, C., Barkauskas, C. E., Rock, J. R. Hogan, B. L. (2013). "Stem cells of the adult lung: their development and role in homeostasis, regeneration, and disease." *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* **2**(1): 131-148.
- Weiser, J. N., Do, Y. S. Feldman, D. (1979). "Synthesis and secretion of corticosteroid-binding globulin by rat liver. A source of heterogeneity of hepatic corticosteroid-binders." *J Clin Invest.* **63**(3): 461-467.
- Welch, E. M., Barton, E. R., Zhuo, J., Tomizawa, Y., Friesen, W. J., Trifillis, P., Paushkin, S., Patel, M., Trotta, C. R., Hwang, S., Wilde, R. G., Karp, G., Takasugi, J., Chen, G., Jones, S., Ren, H., Moon, Y. C., Corson, D., Turpoff, A. A., Campbell, J. A., Conn, M. M., Khan, A., Almstead, N. G., Hedrick, J., Mollin, A., Risher, N., Weetall, M., Yeh, S., Branstrom, A. A., Colacino, J. M., Babiak, J., Ju, W. D., Hirawat, S., Northcutt, V. J., Miller, L. L., Spatrick, P., He, F., Kawana, M., Feng, H., Jacobson, A., Peltz, S. W. Sweeney, H. L. (2007). "PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations." *Nature.* **447**(7140): 87-91.
- Welsh, M. J. Smith, A. E. (1993). "Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis." *Cell.* **73**(7): 1251-1254.
- Welsh, M. J. Smith, A. E. (1995). "Cystic fibrosis." *Sci Am.* **273**(6): 52-59.
- Westhoff, C. L., Petrie, K. A. Cremers, S. (2013). "Using changes in binding globulins to assess oral contraceptive compliance." *Contraception.* **87**(2): 176-181.
- Wiegatz, I., Kutschera, E., Lee, J. H., Moore, C., Mellinger, U., Winkler, U. H. Kuhl, H. (2003). "Effect of four different oral contraceptives on various sex hormones and serum-binding globulins." *Contraception.* **67**(1): 25-32.
- Wiest, R., Moleda, L., Zietz, B., Hellerbrand, C., Scholmerich, J. Straub, R. (2008). "Uncoupling of sympathetic nervous system and hypothalamic-pituitary-adrenal axis in cirrhosis." *J Gastroenterol Hepatol.* **23**(12): 1901-1908.
- Wilke, M., Buijs-Offerman, R. M., Aarbiou, J., Colledge, W. H., Sheppard, D. N., Touqui, L., Bot, A., Jorna, H., de Jonge, H. R. Scholte, B. J. (2011). "Mouse models of cystic fibrosis: phenotypic analysis and research applications." *J Cyst Fibros.* **10 Suppl 2**: S152-171.
- Wilkinson, C. W., Petrie, E. C., Murray, S. R., Colasurdo, E. A., Raskind, M. A. Peskind, E. R. (2001). "Human glucocorticoid feedback inhibition is reduced in older individuals: evening study." *J Clin Endocrinol Metab.* **86**(2): 545-550.
- Wolf, G., Armstrong, E. G. Rosner, W. (1981). "Synthesis in vitro of corticosteroid-binding globulin from rat liver messenger ribonucleic acid." *Endocrinology.* **108**(3): 805-811.

- Wong, A. P., Keating, A. Waddell, T. K. (2009). "Airway regeneration: the role of the Clara cell secretory protein and the cells that express it." *Cytherapy*. **11**(6): 676-687.
- Zielenski, J., Rozmahel, R., Bozon, D., Kerem, B., Grzelczak, Z., Riordan, J. R., Rommens, J. Tsui, L. C. (1991). "Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene." *Genomics*. **10**(1): 214-228.
- Zielenski, J. Tsui, L. C. (1995). "Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations." *Annu Rev Genet*. **29**: 777-807.

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

PUBLICATION

Opposite Expression of Hepatic and Pulmonary Corticosteroid-Binding Globulin in Cystic Fibrosis Patients

Tchoukaev A., Taytard J., Rousselet N., Rebeyrol C., Debray D., Blouquit-Laye S., Moisan M. P., Foury A., Guillot L., Corvol H., Tabary O., Le Rouzic P. (2018). Front Pharmacol. 9: 545.

COMMUNICATIONS ORALES DANS LE CADRE DE CONGRES

PRESENTATIONS ORALES

- 12th European Cystic Fibrosis Young Investigator Meeting, 21 – 23 février 2018, Paris (FR)
- 18^{ème} Colloque des jeunes chercheurs en mucoviscidose, 14 février 2017, Paris (FR)

POSTERS TEASINGS

- 14th ECFS Basic Science Conference, 29 mars – 1^{er} avril 2017, Albufeira (PT)
- Ma recherche pour vaincre : 3 minutes pour convaincre, 13 février 2017, Paris (FR)
- 17^{èmes} Journées de l'école doctorale 394, 25 – 26 mai 2016, Paris (FR)
- Ma recherche pour vaincre : 3 minutes pour convaincre, 8 février 2016, Paris (FR)

COMMUNICATIONS AFFICHEES DANS LE CADRE DE CONGRES

- 19^{èmes} Journées de l'école doctorale 394, 22 et 23 mai 2018, Paris (FR)
- 12th European Cystic Fibrosis Young Investigator Meeting, 21 – 23 février 2018, Paris (FR)
- 19^{ème} Colloque des jeunes chercheurs en mucoviscidose, 20 février 2018, Paris (FR)
- 13^{ème} Séminaire du centre de recherche Saint-Antoine, 16 – 17 novembre 2017, Montvillargenne (FR)
- 14th ECFS Basic Science Conference, 29 mars – 1^{er} avril 2017, Albufeira (PT)
- 12^{ème} Séminaire du centre de recherche Saint-Antoine, 17 – 18 novembre 2016, Montvillargenne (FR)
- 12^{èmes} Journées de recherche respiratoire, 14 – 15 octobre 2016, Nice (FR)
- 17^{èmes} Journées de l'école doctorale 394, 25 – 26 mai 2016, Paris (FR)
- 17^{ème} Colloque des jeunes chercheurs en mucoviscidose, 9 février 2016, Paris (FR)
- 11^{ème} Séminaire du centre de recherche Saint-Antoine, 5 – 6 novembre 2015, Fontainebleau (FR)

PRIX

- Prix de la meilleure communication orale au 18^{ème} Colloque des jeunes chercheurs en mucoviscidose, 14 février 2017, Paris (FR)
- Bourse de voyage de l'ECFS pour les 14th ECFS Basic Science Conference, 29 mars – 1^{er} avril 2017, Albufeira (PT)
- Prix du meilleur poster teasing aux 17^{èmes} Journées de l'école doctorale 394, 25 – 26 mai 2016, Paris (FR)

ÉTUDE DE LA CORTICOSTEROID-BINDING GLOBULIN HEPATIQUE ET PULMONAIRE DANS LE CONTEXTE DE LA MUCOVISCIDOSE

La mucoviscidose (ou *cystic fibrosis*, CF) est une maladie caractérisée par une inflammation pulmonaire chronique. Elle contribue à la dégradation progressive de l'épithélium des voies aériennes des patients et aboutit à une insuffisance respiratoire. Un des traitements anti-inflammatoires proposés afin de limiter ces dommages est la prise de glucocorticoïdes. Leur utilisation est cependant controversée dans le contexte de la mucoviscidose où des effets secondaires importants peuvent apparaître chez les patients. D'autres molécules ont été proposées, mais leurs effets secondaires limitent leur prescription. Les glucocorticoïdes, pris par inhalation ou par voie orale, restent ainsi le principal outil du médecin.

Des études précédentes du laboratoire ont montré que les glucocorticoïdes étaient capables de faire diminuer l'inflammation dans des cellules bronchiques issues de patients CF. Les effets secondaires provoqués par l'administration de ces molécules semblent être liés à leurs actions pléiotropes puisque ces molécules peuvent agir sur de nombreux tissus, et notamment sur le métabolisme et la croissance. Ces effets secondaires pourraient être diminués en ciblant spécifiquement leurs actions anti-inflammatoires par l'utilisation de leur protéine d'adressage, la *corticosteroid-binding globulin* (CBG).

Aucune étude ne s'étant intéressée à cette protéine dans le contexte de la mucoviscidose, l'objectif de ce travail était d'étudier l'expression de la CBG chez les patients CF, afin d'optimiser leur traitement anti-inflammatoire par glucocorticoïdes.

Nous avons, dans un premier temps, étudié son expression au niveau hépatique ainsi que sa libération au niveau plasmatique chez les patients CF. Nous avons montré que sa synthèse hépatique était augmentée, tandis que le taux plasmatique de CBG était conservé chez les patients CF, comparé aux patients non-CF. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'expression de la CBG au niveau pulmonaire. L'inflammation chez les patients CF est en effet principalement pulmonaire et l'expression locale de CBG à ce niveau pourrait moduler l'efficacité du GC, en le recaptant. Nos données montrent que l'expression de cette CBG pulmonaire est diminuée chez les patients CF.

Le maintien de la concentration plasmatique de CBG et la diminution de la CBG pulmonaire chez les patients CF suggèrent ainsi que la CBG pourrait être utilisée comme outil thérapeutique dans le contexte de la mucoviscidose, afin d'optimiser le traitement par glucocorticoïdes.