



UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SSBCV

Centre d'Etudes des Pathologies Respiratoires (INSERM U1100, EA 6305)

THÈSE présentée par :

Noémie MICHEL

soutenue le : 26 mars 2013

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François – Rabelais de Tours**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la vie

Analyse de la contribution des kallicréines tissulaires 6 et 12 à la physiopathologie pulmonaire

THÈSE dirigée par :

Dr. COURTY Yves

Dr. HEUZE-VOURC'H Nathalie

Chargé de Recherche, HDR, CNRS, Tours

Co-directrice, Chargée de Recherche, HDR, INSERM, Tours

RAPPORTEURS :

Mme Dalila DARMOUL

Mme Françoise REDINI

Chargée de Recherche, HDR, INSERM, Paris

Directrice de Recherche, HDR, INSERM, Nantes

JURY :

Mr Yves COURTY

Mme Dalila DARMOUL

Mme Nathalie HEUZE-VOURC'H

Mr Etienne LEMARIE

Mme Françoise REDINI

Mme Marie WISLEZ

Chargé de Recherche, HDR, CNRS, Tours

Chargée de Recherche, HDR, INSERM, Paris

Chargée de Recherche, HDR, INSERM, Tours

Professeur des Universités, Université de Tours

Directrice de Recherche, HDR, INSERM, Nantes

Professeur des Universités, Université Paris VI

A Rémi

Remerciements

Cette thèse a été réalisée au sein du Centre d'Etudes des Pathologies Respiratoires (INSERM U1100, EA 6305), à la Faculté de Médecine de l'Université François-Rabelais de Tours, sous la direction du docteur Yves COURTY et du Docteur Nathalie HEUZÉ-VOURC'H.

J'adresse mes plus sincères remerciements aux membres de mon jury.

Je remercie le Dr. Darmoul et le Dr. Rédini pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail, ainsi que le Dr. Wislez et le Dr. Lemarié pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens particulièrement à remercier le Dr. Yves Courty pour m'avoir encadrée durant cette thèse. Merci pour tous les précieux conseils que tu m'as donnés ainsi que pour m'avoir fait partager ton expérience enrichissante.

Un grand merci également au Dr. Nathalie Heuzé-Vourc'h. Merci pour la richesse de nos échanges, ta gentillesse et ta patience.

Merci à vous deux pour m'avoir fait confiance, et ensemble, vous m'avez guidée dans ce projet. Merci également pour m'avoir soutenue dans des moments qui étaient indépendants de la thèse.

Je remercie également Francis Gauthier et Mustapha Si-Tahar pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire.

Tout au long de ces années j'ai pu travailler dans une ambiance particulièrement agréable grâce à tous les membres de l'équipe...

Je tiens à remercier les professeures Pascale Reverdiau, Sophie Iochmann et Agnès Petit-Courty pour avoir toujours répondu à mes questions.

Un grand merci à Christelle qui m'a beaucoup appris sur le plan technique. Tu as été ma voisine de bureau, ensemble nous avons partagé la paillasse et la salle de culture, merci de m'avoir supportée !

Je remercie également les ATER : Audrey Guillon-Munos et Virginie Hervé-Grépinet, pour nos discussions scientifiques et pour votre aide sur les différents problèmes techniques.

Un merci chaleureux à tous les autres thésards, stagiaires, techniciens, ingénieurs et post-doc passés et présents : Juliette, Mariana, Christophe, Gwenaëlle, Ahlame, Annabelle, Hélène, Alice, Déborah, Clémence, Anaïs, Emilie, Thomas, Laurent, Lyse, Delphine, Elodie et Sophie. Je n'oublierai pas tous les moments que nous avons passés ensemble, aussi bien les crises de rire que toutes nos conversations pour refaire le monde et surtout le labo !

Je remercie également les secrétaires Nathalie Riche et Estelle Nocchi, toujours disponibles et souriantes malgré tous les soucis administratifs !

Je remercie particulièrement Marion, qui a partagé avec moi de nombreuses galères de thèse, et Alix, ma partenaire de capoeira. Avec vous, j'ai passé de bons moments aussi bien au labo qu'à l'extérieur! Merci de m'avoir écoutée et remonté le morale dans les moments où ça allait moins bien.

Et bien évidemment je remercie Clément, j'ai déjà eu l'occasion de te le dire mais je tiens à l'écrire dans cette thèse car ton écoute m'a permis d'avancer durant la rédaction.

Je tiens également à remercier le Dr. Marie-lise Jourdan pour son aide précieuse lors des expériences de cytométrie en flux.

Je remercie l'Unité INSERM UMR 991 de Rennes, en particulier le Dr. Orlando Musso et le Dr. Elise Lavergne pour l'étude de la β -caténine.

Merci également au Centre d'Imagerie du Petit Animal (CNRS-TAAM UPS44) d'Orléans pour les expérimentations animales.

Je remercie également le Dr. Patrick Vourc'h pour son aide lors des expériences de qPCR.

Je remercie spécialement, Amandine et Emilie. Tous les jours je me rends compte de la chance que j'ai d'avoir des amies comme vous. Vous partagez mes joies, mes peines. Merci d'être toujours là, avec moi, depuis toutes ces années !

Merci Guillaume pour ton amitié sincère malgré tous ces kilomètres qui nous ont séparés lors de ta thèse.

Je terminerai par remercier ma famille. Mon père et ma mère, vous êtes toujours là quand j'ai besoin de vous, vous avez supporté tout le stress de cette thèse également ! Merci de m'avoir encouragée dans mes études. Ma sœur Magali, et Vincent, merci de toujours proposer votre aide lorsque vous le pouvez, et bien sûr mes deux petites nièces, Lalie et Léa pour vos sourires !

Résumé

Les kallicroïnes tissulaires humaines (KLK) ont récemment émergé comme une nouvelle famille de protéases à sérine pouvant jouer un rôle important dans la progression tumorale. Le but du travail a été de mieux comprendre comment KLK6 et 12 pourraient intervenir dans la physiopathologie pulmonaire.

Une étude préalable avait révélé qu'une expression élevée de KLK6 était un facteur de pronostic défavorable pour des patients atteints d'un cancer du poumon. Nous avons donc examiné l'impact d'une telle expression sur le comportement de cellules cancéreuses pulmonaires (A549) et sur leur réponse à des agents chimio-thérapeutiques courants. Une expression ectopique de KLK6 a induit la prolifération de cellules A549 d'une manière dépendante de son activité enzymatique ainsi qu'une résistance accrue à l'apoptose. La présence de KLK6 a provoqué une translocation nucléaire de la β -caténine et une augmentation de la phosphorylation de l'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) et de ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*). Ces phosphorylations, ainsi que la prolifération induite par KLK6 ont pu être inhibées par le cetuximab, un anticorps bloquant la liaison d'un ligand sur l'EGFR. Différents éléments recueillis suggèrent que les effets de KLK6 sur la voie de l'EGFR trouveraient naissance dans une activation du récepteur PAR2 (*Proteinase Activated Receptor*) qui est un substrat connu de cette protéase. En effet, l'activation de PAR2 par un agoniste a mimé la cascade d'évènements observée pour KLK6 (libération d'un ligand de l'EGFR, phosphorylations de l'EGFR et d'ERK, induction de la prolifération). De plus, l'inhibition de la voie PAR2 à l'aide de siRNA spécifiques a bloqué la phosphorylation d'ERK induite par KLK6. D'autre part, les études réalisées *in vitro* et *in vivo* n'ont pas révélé d'effet de KLK6 sur la réponse aux agents chimio-thérapeutiques étudiés.

Par ailleurs, nous avons identifié de nouveaux substrats pour KLK12 : les protéines CCN. Le clivage de CCN1 et CCN5 par KLK12 limite leur capacité à former des complexes avec le VEGF, BMP2 et le TGF- β 1. La fragmentation des CCN1 et 5 impacte également la migration et la survie de cellules pulmonaires et endothéliales.

En conclusion, nous avons montré que les KLK peuvent réguler les voies de signalisation soit par le clivage d'un récepteur membranaire (PAR2/KLK6) soit par l'hydrolyse de protéines régulatrices de signalisation (CCN/KLK12).

Résumé en anglais

Recently, human tissue kallikreins (KLK) emerged as a new family of serine proteases which might play a major role in the tumorigenesis. The project aims at determining the contribution of KLK6 and 12 in lung pathophysiology.

Previous study revealed that high KLK6 concentrations were associated with lower survival rates in patients with lung cancer. We therefore examined impact of KLK6 on the behavior of lung cancer cells (A549) and their response to cytotoxic drug treatment. We showed that ectopic expression of KLK6 promoted A549 cell proliferation in a protease activity-dependant manner and inhibited cell apoptosis. KLK6 induced β -catenin nuclear translocation and increased phosphorylation of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and Extracellular signal-Regulated Kinase (ERK). These phosphorylations and the cell proliferation induced by KLK6 were inhibited by cetuximab, an anti-EGFR antibody which block ligand fixation. Several results suggest that KLK6 may act on the EGFR signaling pathway by activating PAR2 (Proteinase Activated Receptor 2), which is a known substrate of KLK6. Indeed, PAR2 activation by an agonist mimicked the cascade of events observed with KLK6 (EGFR ligand shedding, EGFR and ERK phosphorylations). Furthermore, the inhibition of PAR2 signaling by anti-PAR2 siRNA blocked the phosphorylation of ERK triggered by KLK6. In other hand, *in vitro* and *in vivo* studies revealed that KLK6 has no effect on the response of tumors to cytotoxic drug treatments.

We have also identified novel substrates of KLK12, namely the members of the CCN protein family. We reported that KLK12-mediated proteolysis of CCN1 and CCN5 can reduce or abolish the binding of VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), BMP2 (Bone morphogenetic protein 2), and TGF- β 1 (Transforming Growth Factor- β 1). Furthermore, CCN 1 and 5 fragmentation impacted migration and survival of endothelial and lung cells.

In conclusion, we demonstrated that KLKs may modulate signaling pathways by the cleavage of membrane receptor (KLK6/PAR2) or by the fragmentation of signaling proteins (KLK12/CCN).

Table des matières

Remerciements	1
Résumé	4
Résumé en anglais	5
Table des matières	6
Liste des tableaux	8
Liste des figures	9
Liste des abréviations	13
Introduction	16
A. Structure du poumon et cancer broncho-pulmonaire	17
I. Structure et fonction du poumon adulte sain.....	17
II. Cancer du poumon	21
B. Les kallicroéines tissulaires.....	26
I. Historique et définition.....	26
II. Organisation chromosomique	29
III. Les gènes des kallicroéines tissulaires	29
IV. Structure et activité enzymatique des kallicroéines tissulaires	34
V. Rôles Physiopathologiques des kallicroéines tissulaires.....	44
C. Les kallicroéines dans le poumon	50
I. Expression des kallicroéines	50
II. Mécanismes possibles de dérégulation des kallicroéines dans le cancer du poumon	55
III. Les cibles potentielles des KLK dans le cancer du poumon	58
Matériels et Méthodes	62
I. La culture cellulaire : les cellules, leurs conditions et leurs milieux de culture.....	63
II. Obtention de lignées sur-exprimant la proKLK6.....	64
III. Production de proKLK6 recombinante à partir de la lignée HEK proKLK6.....	66
IV. Etudes fonctionnelles de KLK6	68
V. Autres méthodes d'analyses	79
Résultats	90
Chapitre I : Développement d'outils d'analyse.....	91
A. Obtention de clones stables sur-exprimant proKLK6.....	91

I.	Principe du système Flp-In.....	91
II.	Construction des vecteurs d'expression codant KLK6	92
III.	Obtention des clones cellulaires transformés.....	94
B.	Production de KLK6 active.....	96
I.	Production et purification de proKLK6	97
II.	Purification de la KLK6 active.....	100
III.	Rendement de la méthode	104
Chapitre II : Etude de l'impact de la kallistéine 6 sur des processus cellulaires		105
A.	Etude de l'impact de la surexpression de la kallistéine 6 sur les comportements cellulaires	106
I.	Impact de la kallistéine 6 sur la prolifération cellulaire.....	106
II.	Effet de KLK6 sur la survie cellulaire	109
B.	KLK6 et signalisation cellulaire.....	112
I.	Etude de la voie E-cadhérine/ β -caténine	113
II.	Etude de la voie du récepteur de l'EGF	120
III.	Etude de la voie PAR-2	126
Chapitre III : Effets de KLK6 sur la réponse aux agents chimio-thérapeutiques, études <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>		130
A.	Etude <i>in vitro</i>	130
I.	Le paclitaxel	130
II.	La gemcitabine	132
III.	Le cisplatine	134
B.	Etude <i>in vivo</i>	135
I.	Effet des agents chimio-thérapeutiques sur la croissance tumorale.....	135
II.	Effet de KLK6 sur l'apoptose induite par les agents chimio-thérapeutiques.....	138
Chapitre IV : Impact de la kallistéine 12 sur une famille de protéines matri-cellulaires : les CCN.....		143
Discussion		162
Références Bibliographiques.....		175

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Altérations génétiques et leurs fréquences dans les cancers bronchiques.</i>	24
<i>Tableau 2: Différents noms et abréviations des membres de la famille des kallibréines tissulaires</i>	28
<i>Tableau 3 : Site d'activation des kallibréines.</i>	39
<i>Tableau 4 : Profil d'expression des kallibréines tissulaires dans le poumon sain</i>	51
<i>Tableau 5 : Profil d'expression des kallibréines dans le cancer du poumon.</i>	52
<i>Tableau 6 : Composition des lots.</i>	78
<i>Tableau 7 : Condition d'imagerie de l'apoptose.</i>	79
<i>Tableau 8 : Séquence des amorces utilisées pour les différents gènes testés après une purification des ARN totaux.</i>	81
<i>Tableau 9 : Programme utilisé pour la réalisation des PCR avec le kit Takara</i>	81
<i>Tableau 10 : Séquence des amorces utilisées pour les différents gènes testés avec le kit « power SybrGreen Cell to Ct kit »</i>	83
<i>Tableau 11 : Programme utilisé pour la réalisation des PCR avec le kit « power SybrGreen Cell to Ct kit »</i>	83
<i>Tableau 12 : Séquence des amorces utilisées pour les gènes normalisateurs.</i>	84
<i>Tableau 13 : Conditions d'utilisation et origine des différents anticorps utilisés.</i>	87
<i>Tableau 14 : Numéro d'identification des clones.</i>	95
<i>Tableau 15 : Rendement de la purification de KLK6.</i>	104

Liste des figures

<i>Figure 1 : Structure générale de l'appareil respiratoire humain.</i>	17
<i>Figure 2 : Epithélium respiratoire des bronches.</i>	18
<i>Figure 3 : Epithélium respiratoire des bronchioles.</i>	19
<i>Figure 4 : Schéma d'une zone respiratoire.</i>	20
<i>Figure 5 : Epithélium respiratoire des alvéoles.</i>	21
<i>Figure 6 : Organisation chromosomique des kallibréines.</i>	29
<i>Figure 7 : Structure schématique des gènes et des protéines de la famille des kallibréines tissulaires humaines.</i>	30
<i>Figure 8 : Représentation en ruban de la structure tri-dimensionnelle de la proKLK6.</i>	35
<i>Figure 9 : Alignement de séquence des membres de la famille des kallibréines tissulaires.</i>	36
<i>Figure 10 : « KLK activome », schéma représentant l'activation en série des proformes des kallibréines par d'autres kallibréines matures.</i>	40
<i>Figure 11 : Substrats et implication des kallibréines dans des processus biologiques.</i>	45
<i>Figure 12 : Mécanisme d'action des siRNA</i>	76
<i>Figure 13 : Le système d'expression Flp-In.</i>	92
<i>Figure 14 : Vecteur d'expression de la préproKLK6 mutée</i>	93
<i>Figure 15 : Séquence nucléotidique et peptidique de préproKLK6 clonée.</i>	94
<i>Figure 16 : Production de KLK6 des clones HEK.</i>	95
<i>Figure 17 : Production de KLK6 des clones A549.</i>	96
<i>Figure 18: Profil d'élution des protéines du surnageant de culture de cellules HEK.</i>	98
<i>Figure 19 : Détection de la proKLK6 dans les fractions de purification.</i>	99
<i>Figure 20 : Mesure de l'activité enzymatique de la KLK6.</i>	99
<i>Figure 21 : Profil d'élution des protéines de l'échantillon A.</i>	100
<i>Figure 22 : Mesure de l'activité de KLK6 dans les fractions de purification de l'échantillon A.</i>	101
<i>Figure 23 : Profil d'électrophorèse des protéines contenues dans les fractions de purification de l'échantillon A colorées au bleu de coomassie.</i>	101
<i>Figure 24 : Profil d'élution des protéines de l'échantillon B.</i>	102
<i>Figure 25 : Mesure de l'activité de KLK6 dans les fractions de purification de l'échantillon B.</i>	103

<i>Figure 26 : Profil d'électrophorèse des protéines contenues dans les fractions de purification de l'échantillon A colorées au bleu de coomassie.</i>	103
<i>Figure 27 : Effet d'une expression ectopique de KLK6 sur la prolifération cellulaire des cellules A549 (A) et HEK (B).</i>	106
<i>Figure 28 : Prolifération des cellules HEK (gauche) et A549 (droite) sur-exprimant ou non la proKLK6 sauvage dans différents sérums.</i>	108
<i>Figure 29 : Effets comparés de la KLK6 sauvage ou mutée sur la prolifération cellulaire.</i>	109
<i>Figure 30 : Dose-Réponse des cellules A549 Flp-In et pro KLK6 à la staurosporine.</i>	111
<i>Figure 31 : Effet d'une surexpression de KLK6 sur l'apoptose induite par la staurosporine.</i>	112
<i>Figure 32 : Validation des méthodes : courbe d'efficacité (gauche) et courbe de fusion (droite) des gènes de l'E-cadhérine (haut) et de la β-caténine(bas).</i>	115
<i>Figure 33 : Expression des transcrits de l'E-cadhérine (gauche) et de la β-caténine (droite) par PCR en temps réel.</i>	115
<i>Figure 34 : Détection de l'E-Cadhérine membranaire et soluble.</i>	116
<i>Figure 35 : Immunodétection de la β-caténine.</i>	117
<i>Figure 36 : Plasmide codant la luciférase firefly sous la dépendance du promoteur TCF/LEF activable par la β-caténine (Addgene).</i>	118
<i>Figure 37 : Mesure de l'activité transcriptionnelle de la β-caténine dans les cellules A549 sur-exprimant proKLK6 en réponse à un inducteur de sa translocation nucléaire : Wnt 3a.</i>	119
<i>Figure 38 : Comparaison de l'activité transcriptionnelle de la β-caténine entre les cellules n'exprimant pas et exprimant KLK6.</i>	120
<i>Figure 39 : PCR en temps réel de l'EGFR dans les cellules A549 Flp-In et proKLK6.</i>	121
<i>Figure 40 : Effet du cetuximab sur les cellules A549 exprimant la proKLK6.</i>	122
<i>Figure 41 : Efficacité du cetuximab sur les cellules A549 exprimant ou non la proKLK6.</i>	123
<i>Figure 42 : Effet du cetuximab sur la prolifération induite par KLK6.</i>	124
<i>Figure 43 : Effet du rajout de KLK6 active sur l'activation de l'EGFR des cellules A549 parentales en présence ou non de cetuximab.</i>	125
<i>Figure 44 : Effet du rajout de KLK6 active sur la phosphorylation d'Erk.</i>	126

<i>Figure 45 : Effet d'un agoniste de PAR2 sur les cellules A549 : la prolifération cellulaire (A), l'activation de l'EGFR (B), l'activation de ERK sans cétuximab (C) et avec cétuximab (D).</i>	127
<i>Figure 46 : PCR en temps réel de PAR2 dans les cellules A549 parentales transfectées avec des siRNA PAR2 ou contrôle.</i>	128
<i>Figure 47 : Effet d'une inhibition de PAR2 sur la phosphorylation d'Erk.</i>	129
<i>Figure 48 : Mesure de l'IC50 du paclitaxel chez les cellules A549 Flp-In (A) et HEK Flp-In (B).</i>	131
<i>Figure 49 : Effet de KLK6 sur la réponse au paclitaxel dans les cellules A549 (A) et HEK (B).</i>	132
<i>Figure 50 : Mesure de l'IC50 de la gemcitabine chez les cellules A549 Flp-In (A) et HEK Flp-In (B).</i>	133
<i>Figure 51 : Effet de la proKLK6 dans la réponse cellulaire à la gemcitabine sur les cellules A549 (A) et les cellules HEK (B).</i>	133
<i>Figure 52 : Mesure de l'IC50 du cisplatine chez les cellules A549 Flp-In (A) et HEK Flp-In (B).</i>	134
<i>Figure 53 : Effet de la proKLK6 dans la réponse cellulaire au cisplatine sur les cellules A549 (A) et les cellules HEK (B).</i>	135
<i>Figure 54 : Cinétique de croissance tumorale chez les souris Nude.</i>	136
<i>Figure 55 : Mesure du volume tumoral en fin d'expérimentation in vivo (A) et ex vivo (B).</i>	137
<i>Figure 56 : Effets des agents chimio-thérapeutiques sur le volume tumoral ex vivo sur les tumeurs Flp-In (A) ou KLK6 (B).</i>	138
<i>Figure 57 : Imagerie de l'annexine V sur le corps entier de souris sous trois incidences.</i>	139
<i>Figure 58 : Imagerie de l'annexine V au niveau des tumeurs.</i>	140
<i>Figure 59 : Imagerie de fluorescence des tumeurs excisées (haut) et du muscle (bas).</i>	140
<i>Figure 60 : Analyse des tumeurs explantées de souris ayant reçu de l'annexine V.</i>	141
<i>Figure 61 : Représentation générale de la structure des CCNs</i>	144
<i>Figure 62 : Profil d'électrophorèse des fragments générés par le clivage des CCN par KLK12.</i>	145
<i>Figure 63 : Localisation des sites de clivage par KLK12.</i>	145

<i>Figure 64 : Représentation schématique des sites de liaisons des CCN avec d'autres molécules.</i>	146
<i>Figure 65 : Le complexe de la E-cadhérine/β-caténine dans l'adhésion cellulaire et la voie Wnt.</i>	167
<i>Figure 66 : Transduction du signal après activation de l'EGFR d'après Nyati et collaborateurs (Nyati et al. 2006).</i>	169
<i>Figure 67 : Mode d'activation des PAR par les kallibréines.</i>	170
<i>Figure 68 : Représentation schématique de la voie de signalisation activée par KLK1 induisant la migration des keratinocytes HaCat.</i>	172
<i>Figure 69 : Cascade de signalisation de KLK6 dans les cellules A549.</i>	174

Liste des abréviations

1-AT : alpha1-antitrypsine
7-AAD: *7-Aminoactinomycin D*
 α_2 M: α_2 -macroglobuline
AAT: α_1 -antitrypsine
ACT: α_1 -antichymotrypsine
ADAM 17: *A Disintegrin And Metalloprotease 17*
ADN : acide désoxynucléique
ATIII: Antithrombine III
AP: α_2 -Antiplasmine
AR: *Androgen Receptor*
ARE: *Androgen response element*
ARN : acide désoxyribonucléique
ARNm : ARN messenger
AT: antithrombine III
BMP: *Bone Morphogenetic proteins*
BPCO: Broncho-Pneumopathie Obstructive Chronique
BSA: *Bovin Serum albumin*
CBNPC : Cancer Bronchique Non à Petites Cellules
CBPC : Cancer Bronchique à Petites Cellules
CCSP: *Clara cell secretory protein*
Ct: *threshold cycle* (Cycle seuil)
dNTP: désoxyribonucléoside triphosphate
Dsh/Dvl: *Dishevelled*
EDTA: acide éthylène-diamine-tétraacétique
EGF: *epidermal growth factor*
EGFR: *Epidermal Growth Factor Receptor*
ELISA: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
ER α et ER β : récepteurs aux œstrogènes α et β
Erk: *Extracellular-Related kinase*
FGF: *Fibroblast Growth Factors*
FITC: *fluorescein isothiocyanate*

GSK3: *Glycogène Synthase Kinase-3*
HA: glycosaminoglycane hyaluronique
HB-EGF: *Heparin- Binding EGF-like growth factor*
HEK 293: *Human Embryonic Kidney 293*
HGFA: *Hepatocyte Growth Factor Activator*
HRP: *HorseRadish Peroxidase*
IGF: *Insulin Growth Factor*
IGFBP: *IGF-Binding-Protein*
IL-1 β : Interleukine-1 β
JAK2: *Janus Kinase2*
kDa: kilodalton
KLK : kalicrine tissulaire
KLKB1 : kalicrine plasmatique
LAP: *Latency-Associated Protein*
LEKT1: *LymphoEpithelial Kazal-Type inhibitor*
LRP5 ou 6: *LDL-receptor Related Protein 5/6*
LTBP: *Latent-TGF- β -Binding Protein*
MEC: Matrice ExtraCellulaires
MMP: *Matrix MetalloProteinase*
PAI1: *Plaminogen Activator Inhibitor*
PAR: *Proteinase activated Receptor*
PBS : tampon phosphate de sodium
PCI: *Peptidase C Inhibitor*
PCR: *polymerase chain reaction*
PI-3 kinase: Phosphatidyl-Inositol-3'kinase
PR: *Progestin Receptor*
PVDF : polyvinylidene fluoride
qRT-PCR : *quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*
RISC: *RNA-Induced Silencing Complex*
ROS : *Reactive oxygen species* (espèces réactives oxygénées)
RT: *reverse transcription*
SDS: sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

SERPIN: *SERine Peptidase INhibitors*

siRNA: *small interfering RNA*

SPINK5: *Serine Protease INhibitor Kazal-type 5*

STAT3: *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*

SVF: *Sérum de veau fœtal*

TEM : *Transition Epithélio-Mesenchymateuse*

TGF- β : *Transforming Growth Factor β*

TGF- β R 1 et 2 : *récepteurs au TGF- β de type I et de type II*

uPA: *Urokinase-type Plasminogen Activator*

VEGF: *vascular endothelial growth factor*

Zn : *Zinc*

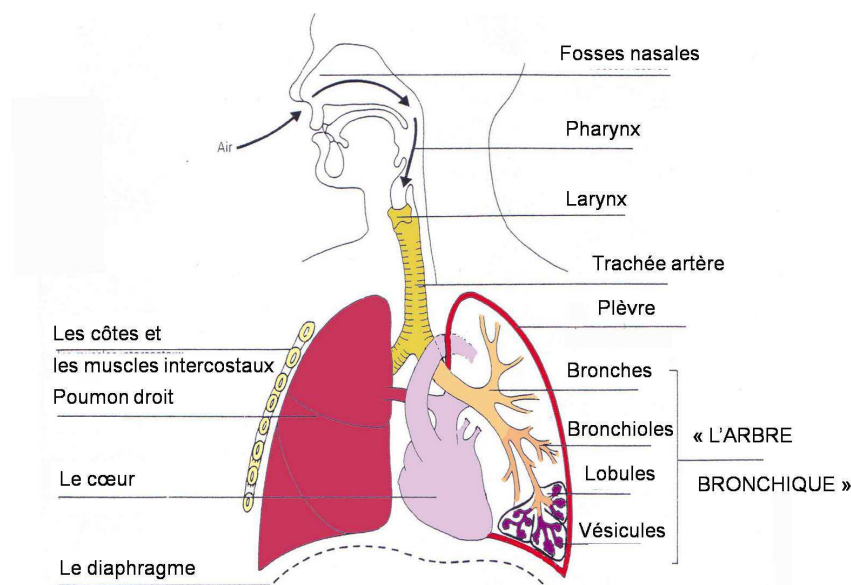
Introduction

Le poumon est un organe qui doit faire face aux changements de pression et de volume pour assurer la fonction respiratoire, mais il doit également faire face aux nombreux pathogènes et particules diverses provenant de l'environnement. Différents mécanismes interviennent donc dans le maintien de l'intégrité tissulaire. Les protéases jouent un rôle important dans l'homéostasie cellulaire et la régénération tissulaire. Les maladies chroniques inflammatoires du poumon ainsi que le cancer broncho-pulmonaire sont d'ailleurs souvent associés à des taux de protéases plus élevés que la normale. Parmi les protéases pulmonaires figurent les kallikréines tissulaires mais leurs mécanismes d'action et leurs fonctions pulmonaires demeurent très mal connus. Ce travail de thèse a eu pour objectif de mieux comprendre comment certaines kallikréines tissulaires pourraient être impliquées dans des processus cellulaires normaux ou pathologiques.

A. Structure du poumon et cancer broncho-pulmonaire

I. Structure et fonction du poumon adulte sain

L'air atmosphérique est inhalé à travers la bouche, le nez puis il traverse la trachée qui se divise en deux bronches principales, chacune marquant l'entrée dans un poumon. A l'intérieur, ces bronches se divisent de nombreuses fois jusqu'à former les bronchioles (figure n°1).



*Figure 1 : Structure générale de l'appareil respiratoire humain.
D'après la thèse de Delphine Gras (Gras 2006)*

1. Voies respiratoires intrapulmonaires

a) Les bronches

Les bronches contiennent du cartilage et deux types d'épithélium : l'épithélium bronchique glandulaire tapissant les glandes sous-muqueuses et l'épithélium bronchique de surface.

L'épithélium de surface est composé de plusieurs types cellulaires : les cellules caliciformes produisant du mucus, les cellules ciliées qui interviennent dans la clairance mucociliaire, les cellules intermédiaires qui n'atteignent pas la lumière des voies respiratoires et qui correspondraient à des cellules issues de la division des cellules caliciformes au cours d'un processus de stratification (Jeffery and Li 1997). Enfin l'épithélium de surface comprend des cellules basales qui constitueraient des cellules de réserve capables de régénérer l'épithélium en cas de dommage.

Les glandes sous-muqueuses sont quant à elles composées de cellules sécrétoires et de cellules basales. Les cellules séreuses produisent la majeure partie du liquide de sécrétion glandulaire tandis que les cellules à mucus produisent du mucus venant s'ajouter à celui synthétisé par les cellules caliciformes (Figure n°2).

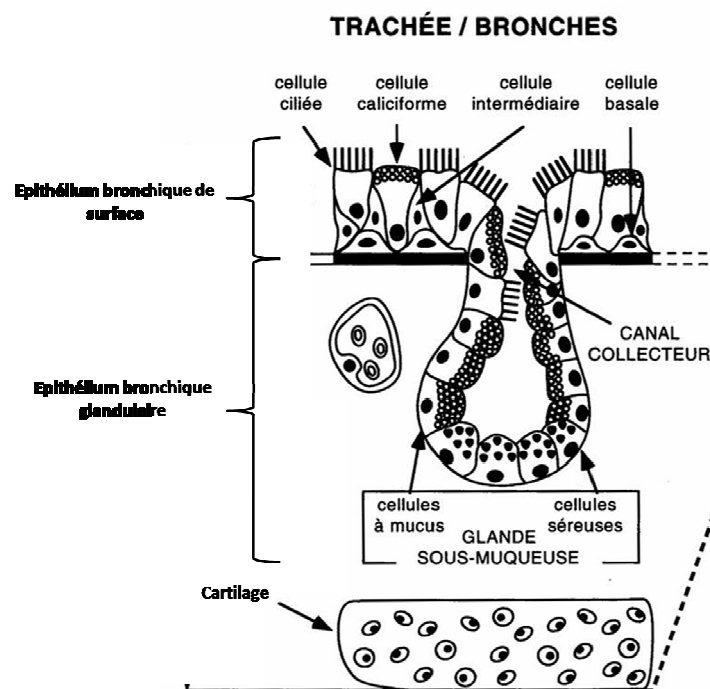


Figure 2 : Epithélium respiratoire des bronches.
D'après la thèse de Delphine Gras. (Gras 2006)

Chez l'Homme sain, les glandes sous muqueuses produisent plus de 95% du mucus des voies aériennes supérieures. Chaque glande sécrète des mucines (essentiellement MUC5AC et MUC5B), de l'eau, des électrolytes et une variété d'autres composants, particulièrement des substances antimicrobiennes et anti-inflammatoires (lysozyme, lactoferrine, lactoperoxydase, défensine...). La sécrétion de mucus forme un tapis sur les parois des voies aériennes qui permet l'humidification de l'air inspiré, de prévenir le dessèchement des parois et de capturer les particules et les microorganismes inhalés. L'épithélium des bronches possède un épithélium cilié dont l'épaisseur diminue progressivement avec les subdivisions. Ces cils permettent la reconduction de mucus contenant des particules et des microorganismes inhalés vers le pharynx permettant son élimination dans le tube digestif.

b) *Les bronchioles*

Les bronchioles ne possèdent pas de cartilage. L'épithélium est simplifié, il est composé de cellules ciliées, de cellules neuro-épithéliales et de cellules de Clara (figure n°3). Ces dernières produisent et sécrètent la protéine CCSP (*Clara cell secretory protein*), la protéine la plus abondante des fluides des voies respiratoires qui permet la protection de l'épithélium bronchiolaire (Wong et al. 2009). Une sous-population de cellules de Clara agit de façon identique à des cellules souches spécifiques du tissu bronchiolaire (Reynolds and Malkinson 2009). Les cellules neuro-épithéliales possèdent, quant à elles, des granules composées de différentes hormones peptidiques comme la sérotonine, la bombésine, la calcitonine et la leuko-enképhaline qui pourraient moduler le tonus musculaire des bronches et des parois vasculaires (Weather et al. 2004).

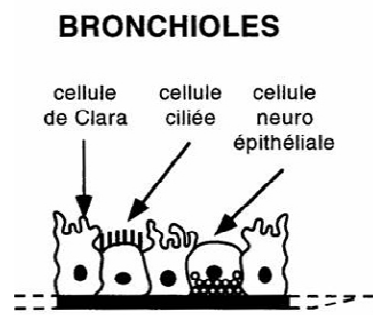


Figure 3 : Epithélium respiratoire des bronchioles.

D'après la thèse de Delphine Gras (Gras 2006)

2. Zones respiratoires

Les zones respiratoires sont les lieux des échanges gazeux. Elles émergent des bronchioles terminales et comprennent les bronchioles respiratoires, les canaux et sacs alvéolaires, et les alvéoles. Les alvéoles sont des structures microscopiques où l'oxygène et le dioxyde de carbone sont échangés avec le système sanguin (figure n°4).

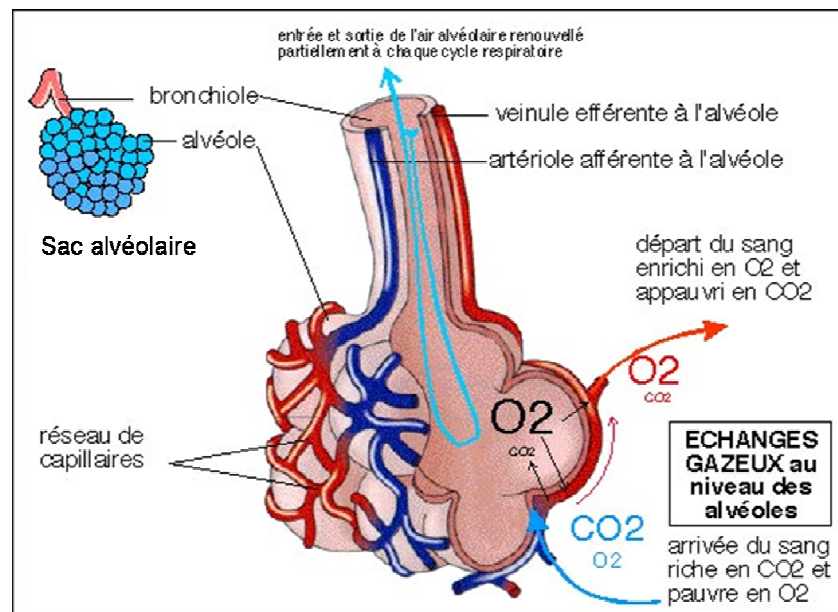
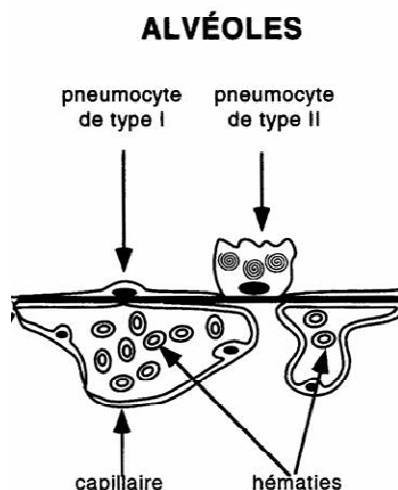


Figure 4 : Schéma d'une zone respiratoire.

D'après <http://www.himaia.com/vb/showthread.php?t=920>

L'épithélium alvéolaire est monostratifié et est composé de deux types cellulaires différents qui sont les pneumocytes de types I et les pneumocytes de type II (figure n°5). Les pneumocytes de type I représentent 95% des cellules et sont impliqués dans les échanges gazeux. Les pneumocytes de type II sont impliqués dans la production du surfactant en synthétisant, assemblant et libérant les composants lipidiques et protéiques du surfactant pulmonaire. Ce surfactant permet de diminuer la tension qui s'exerce sur la paroi des alvéoles lors des variations de la taille des alvéoles pendant les cycles de compression-extension de la respiration (Perez-Gil and Weaver 2010). Les pneumocytes de type II sont également des cellules qui prolifèrent afin de re-épithélialiser les surfaces alvéolaires dissociées. Il sont ensuite transformés en pneumocytes de type I (Fuchs et al. 2003).



*Figure 5 : Epithélium respiratoire des alvéoles.
D'après la thèse de Delphine Gras (Gras 2006)*

II. Cancer du poumon

1. Incidence des cancers bronchiques

Le cancer du poumon est la première cause de mortalité par cancer dans le monde, il y a eu 1,4 millions de décès (ce qui représente 18,4% de tous les cancers) en 2008. En France, avec environ 39 500 nouveaux cas estimés en 2011, le cancer du poumon se situe au quatrième rang des cancers, tous sexes confondus, juste après le cancer colorectal (40 500 nouveaux cas). Il représente 11% de l'ensemble des nouveaux cas de cancers tous sexes confondus. Chez l'homme, il se place au deuxième rang des cancers masculins avec 27 500 nouveaux cas, soit 13 % de l'ensemble des cancers masculins, derrière le cancer de la prostate (71 000 cas). Chez la femme, le cancer du poumon est le troisième cancer avec 12 000 nouveaux cas estimés en 2011, soit près de 8 % de l'ensemble des cancers féminins, après le cancer du sein (53 000 nouveaux cas) et le cancer colorectal (19 000) (INCa).

2. Les principaux types de cancer du poumon

Il existe deux catégories principales de tumeurs : les cancers Bronchiques Non à Petites Cellules (CBNPC) et les Cancers Bronchiques à Petites Cellules (CBPC). D'autres catégories

existent tel que les tumeurs carcinoïdes et les sarcomes, mais celles-ci ne représentent qu'un très faible pourcentage.

Quatre vingt pour cent des cancers du poumon sont de type non à petites cellules et cette catégorie est divisée en 3 sous-groupes principaux : les adénocarcinomes, les carcinomes épidermoïdes, et les carcinomes à grandes cellules (Brambilla et al. 2001; Travis et al.). L'adénocarcinome est le sous-type histologique prédominant du cancer du poumon et il est défini comme une tumeur maligne qui a pour origine les muqueuses glandulaires, alors que le carcinome épidermoïde est caractérisé par une prolifération cellulaire montrant une kératinisation et/ou des jonctions intercellulaires. Dans la pratique commune, les cas manquants de signe de différenciation épidermoïde ou glandulaire sont reportés dans les carcinomes à grandes cellules. En tant que classe, les CBNPC sont relativement insensibles aux chimiothérapies et aux radiothérapies.

Les carcinomes à petites cellules se caractérisent par la présence de granules neuroendocrines et sont associés à un pronostic défavorable. Ils sont généralement localisés centralement. Sans traitement les cancers à petites cellules sont les plus agressifs, avec une survie médiane de seulement 2 à 4 mois après le diagnostic. Comparés aux autres types de cancer du poumon, les CBPC répondent mieux aux chimiothérapies et aux radiothérapies. Cependant, la guérison est difficile car au moment du diagnostic ces cancers sont généralement à un stade avancé.

3. Les facteurs de risques

La fumée de cigarette est la première cause de cancer du poumon. En effet, approximativement 10 à 15% des fumeurs actifs développent un cancer du poumon. Trois facteurs sont importants : la durée du tabagisme, le nombre de cigarettes fumées par jour, et l'âge du début du tabagisme (Le Faou and Scemama 2005). Approximativement 10% des cancers bronchiques apparaissent chez des individus n'ayant jamais fumé. Pour comparer les caractéristiques épidémiologiques des non-fumeurs par rapport aux fumeurs avec des cancers bronchiques, Wakelee et collaborateurs ont regroupé les résultats de 6 études menées aux Etats-Unis et en Suède (Wakelee et al. 2007) et ils ont démontré que le cancer bronchique chez les non-fumeurs était plus présent chez les femmes que les chez les hommes. D'autres facteurs peuvent être responsables de cancer du poumon comme par exemple, l'exposition à des agents toxiques minéraux tels l'amiante, ou à des métaux comme l'arsenic, le chrome et le

nickel (Alberg and Samet 2003). L'exposition à un gaz souterrain appelé radon est également responsable d'une petite partie des carcinomes bronchiques, chez les mineurs notamment. D'autres études mentionnent d'autres facteurs de risques comme la pollution atmosphérique ou une exposition à des radiations ionisantes.

4. Altérations génétiques

Des altérations variées ont été découvertes dans la carcinogénèse des cancers du poumon. L'information génétique de l'ADN est transmise jusqu'aux protéines en passant par les ARN. Les protéines sont finalement modifiées pour acquérir une activité fonctionnelle dans les cellules. Il n'y a pas que l'ADN lui-même qui peut être soumis à des altérations génomiques, mais également des processus, incluant des mutations de l'ADN, de la méthylation de l'ADN, des altérations d'épissage et des modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles (tableau n°1).

Ces altérations confèrent aux cellules des particularités biologiques qui sont des caractéristiques du cancer : (1) autosuffisance dans les signaux de croissance cellulaire (2) insensibilité aux signaux inhibiteurs de la croissance (3) résistance à l'apoptose (4) prolifération illimitée (5) angiogénèse (6) invasion tissulaire et métastase.

Gène	Chromosome	Fonction	Mécanisme	Fréquence CBNPC (%)	Fréquence CBPC (%)
ONCOGENES					
<i>MYCL</i>	1p34.2	Facteur de transcription	exp, amp	<5	30
<i>MYCN</i>	2p24.1	Facteur de transcription	exp, amp	<5	10
<i>ALK</i>	2p23	Récepteur à tyrosine kinase	trans		
<i>PI3KCA</i>	3q26.3	Sous-unité de la PI3K	mut	<5	
<i>ANP63</i>	3q27-29	Homologue de p53	amp	<50 (épidermoïde)	
<i>c-kit</i>	4q11-12	Récepteur à tyrosine kinase	exp	<5	50
<i>FGFR4</i>	5q35.3	Récepteur à tyrosine kinase	mut	<5 (adénocarcinome)	
<i>EGFR/ERBB1</i>					
<i>l</i>	7p12	Récepteur à tyrosine kinase	mut, amp, exp	50 (adénocarcinome)	<5
<i>BRAF</i>	7q34	Ser/Thr kinase	mut		
<i>MYCC</i>	8q24	Facteur de transcription	exp, amp	30	30
<i>CCND1</i>	11q13	Régulateur du cycle cellulaire	exp	50	
<i>KRAS</i>	12p12	Protéine de fixation au GTP	mut, amp	20 (adénocarcinome)	<5
<i>HER2/ERBB2</i>	17q11	Récepteur à tyrosine kinase	exp, amp, mut	25-60 (adénocarcinome)	<5
<i>MET</i>	7q31	Récepteur à tyrosine kinase	exp, amp, mut	21	
<i>BCL-2</i>	18q21	Anti-apoptose	exp	20	60
<i>EML4-ALK</i>	2p	Tyrosine kinase	trans	5 (adénocarcinome)	
GENES SUPPRESSEUR DE TUMEUR					
<i>LRP-DIT</i>	2q21	Récepteur de lipoprotéine	del	40	<5
<i>FHIT</i>	3p14.2	Dinucléotide triphosphatase	del, me	40-70	50-80
<i>RASSF1A</i>	3p21.3	Transduction du signal?	del, me	30-40	70-100
<i>NPRL2, BLU</i>	3p21.3		del, mut	10	
<i>FUS1, HYAL1</i>	3p21.3		del, mut	10	
<i>FUS2, SEMA3B</i>	3p21.3		del, mut	10	
<i>P16 (INK4a)</i>	9p21	Inhibiteur de kinase cycline-dépendant	del, mut, me	60	<10
<i>P14 (ARF)</i>	9p21	Inhibiteur de kinase cycline-dépendant	me	8	
<i>PPP1R3</i>	7q31	Ser/Thr phosphatase	mut	15	
<i>PTEN</i>	10q23	Tyrosine phosphatase	del, mut	<10	10
<i>PPP2R1B</i>	11q23	Ser/Thr phosphatase	mut	15	
<i>TSLC1</i>	11q23	Molécule d'adhésion	me	85	
<i>p27Kip1</i>	13p13	Régulateur du cycle cellulaire	exp	70	
<i>RB</i>	13q14	Régulateur du cycle cellulaire	del, mut	20-30	80-100
<i>P53</i>	17q13	Régulateur du cycle cellulaire	del, mut	60	80-100
<i>LKB1/STK11</i>	19p13	Ser/Thr phosphatase	del, mut	10	

Tableau 1 : Altérations génétiques et leurs fréquences dans les cancers bronchiques.

D'après Toyooka et collaborateurs (Toyooka et al. 2011). Légende : CBNPC, cancer Bronchique Non à Petites Cellules ; CBPC, Cancer Bronchique à Petites Cellules ; del, délétion ; me, méthylation ; mut, mutation ; exp, altération de l'expression ; amp, amplification génique ; trans, translocation.

Dans des revues de compréhension du cancer du poumon chez les non-fumeurs, Subramanian et Govindan (Subramanian and Govindan 2007) ainsi que Sun et collaborateurs (Sun et al. 2007) ont examiné les caractéristiques moléculaires pouvant distinguer les tumeurs des non-fumeurs et des fumeurs. Parmi les altérations moléculaires fréquemment détectées, les mutations de l'EGFR sont courantes chez les non-fumeurs, alors que les mutations de K-ras et p53 ainsi que l'hyper-méthylation du promoteur de p16 sont fréquentes chez les tumeurs de fumeurs.

5. Thérapies

Trois types de traitements sont utilisés dans la prise en charge des cancers bronchiques: la chirurgie, la radiothérapie et des traitements médicaux.

a) *La chirurgie*

La chirurgie est le traitement le plus ancien mais également le plus efficace des cancers bronchiques. Il existe deux grands types de d'interventions chirurgicales :

-la lobectomie : il s'agit d'une opération où le chirurgien procède au retrait d'un lobe du poumon où se situe la tumeur.

-La pneumectomie : dans ce cas, le chirurgien procède au retrait d'un des deux poumons dans sa totalité.

La chirurgie est le traitement de référence des CBNPC aux stades précoces.

b) *La radiothérapie*

La radiothérapie est une technique médicale qui utilise les rayonnements ionisants pour détruire des cellules, principalement les cellules de tumeurs cancéreuses. Son objectif est de délivrer de la manière la plus précise possible la dose de rayonnement prescrite au volume de la tumeur, en épargnant au mieux les tissus sains avoisinants.

Pour les CBNPC précoces, la radiothérapie peut être utilisée dans certains cas à la place de la chirurgie lorsque la tumeur n'est pas accessible. Elle peut également être proposée en complément de la chirurgie et de la chimiothérapie lorsque la paroi du poumon est atteinte ou lorsque l'exérèse a été incomplète. Pour les CBNPC aux stades avancés, la radiothérapie est associée à la chimiothérapie et à la chirurgie si celle-ci est praticable.

Pour les CBPC localisée, la chimiothérapie associée à la radiothérapie constitue le traitement de référence.

c) *Les traitements médicaux*

Plusieurs types de médicaments anticancéreux sont utilisés pour traiter les cancers du poumon : chimiothérapies et thérapies ciblées. On les regroupe sous le nom de traitements médicaux. Il s'agit de traitements généraux (appelés aussi traitements systémiques) qui

agissent dans l'ensemble du corps. Cela permet d'atteindre les cellules cancéreuses quelle que soit leur localisation, même si elles sont isolées et n'ont pas été détectées lors du diagnostic.

La chimiothérapie et les thérapies ciblées n'ont pas le même mode d'action :

-les médicaments de chimiothérapie agissent sur les mécanismes de la division cellulaire.

-les thérapies ciblées bloquent des mécanismes spécifiques des cellules cancéreuses. Ces traitements peuvent bloquer d'importantes voies qui favorisent la progression tumorale et avoir un contrôle sur la maladie à long terme. Des résultats ont été obtenus avec des inhibiteurs de l'EGFR, des anticorps monoclonaux anti-EGFR et des stratégies anti-angiogénique dans des populations avec un stade avancé de CBNPC. Cependant, seuls les patients avec une mutation sur le gène de l'EGFR sont susceptibles de répondre aux agents qui ciblent ce gène. Ainsi, de nouvelles thérapies ciblées qui interfèrent avec le récepteur de l'insuline ou la protéine de fusion EML4-ALK ont montré une activité prometteuse (Janku et al. 2010).

Pour les cancers bronchiques non à petites cellules de stade précoce, une chimiothérapie n'est pas systématique. Pour les cancers bronchiques localement avancés, une chimiothérapie est recommandée en complément du traitement local (chirurgie et/ou radiothérapie). Pour les cancers bronchiques métastatiques, une chimiothérapie associée ou non à une thérapie ciblée est le traitement de référence.

Pour les formes localisées des cancers bronchiques à petites cellules la chimiothérapie associée à la radiothérapie est le traitement de référence. Pour les formes disséminées et métastatiques, la chimiothérapie est le traitement de référence.

B. Les kallibréines tissulaires

I. Historique et définition

La première observation des kallibréines semble dater du début du 20^{ème} siècle par Abelous et Bardier (Abelous and Bardier 1909a, b). Leurs travaux portaient sur une fraction urinaire insoluble dans l'alcool qui permettait une vasodilatation périphérique et une hypotension chez le chien. Cette substance fut nommée « urohypotensine » et son effet fut confirmé par d'autres laboratoires (Frey 1926; Frey and Kraut 1928; Pribram and Hernheiser

1920). Dans les années 30, Frey, Kraut et Werle (Kraut et al. 1930) ont montré l'abondance de cette substance dans des extraits de pancréas. C'est à ce moment que le terme de « kallicréine » est apparu, en référence au nom grec du pancréas : « kallikreas » (Kraut et al. 1930; Werle et al. 1937). L'effet hypotenseur a été attribué à la libération de kinines vasoactives à partir du kininogène (Bhoola et al. 1992; Rocha et al. 1949; Werle et al. 1937). Le terme de kallicréine a donc été associé à cette activité kininogénasique (Bhoola et al. 1992; Werle and Fiedler 1969).

Cette définition des kallicréines englobait deux enzymes distinctes: la kallicréine plasmatique (KLKB1) et la kallicréine tissulaire ou glandulaire (KLK1). Ces deux kallicréines diffèrent par leur origine génétique, leur structure protéique et leur spécificité de substrat (Fiedler 1979; Movat 1979; Webster and Pierce 1960).

La kallicréine plasmatique (KLKB1) est codée par un gène localisé sur le chromosome 4 au locus q35. Il s'étend sur 30kb et possède 14 introns et 15 exons (Beaubien et al. 1991; Yu et al. 1998). La protéine produite mesure 85 à 88 kDa et est structurellement proche du facteur XI, une autre protéase plasmatique. Les cellules hépatiques secrètent l'enzyme dans le système sanguin où elle va agir dans les processus de coagulation, de fibrinolyse et d'inflammation (Bhoola et al. 1992; Sainz et al. 2007).

La kallikreine tissulaire (KLK1) est une glycoprotéine de 25 à 40 kDa. Elle est hautement exprimée dans une grande variété d'organes et elle est capable de cliver le kininogène, des facteurs de croissance et des molécules de la matrice extracellulaire (Bhoola et al. 1992; Fiedler 1979; Schachter 1979). L'évolution du terme de kallicréine s'est produite avec le séquençage nucléotidique et protéique de KLK1. Son homologie avec d'autres protéases à serine a suggéré qu'elle pouvait être un membre d'une famille multigénique (Swift et al. 1982; Tschesche et al. 1979). A cette époque, cette famille ne semblait composée que de 3 membres : KLK1 et des protéases prostatiques KLK2 (ou hK2) et KLK3 (ou PSA) (Digby et al. 1989; Lundwall 1989; Morris 1989; Riegman et al. 1988; Watt et al. 1986). A la fin des années 90, la famille des kallicréines tissulaires s'est agrandie quand plusieurs gènes codant des protéases à serine ont été identifiés au niveau du locus des kallicréines tissulaires. Avec le séquençage du génome humain, trois laboratoires ont montré que ce locus était finalement composé de 15 gènes actifs (*KLK1-15*) et d'un pseudogène (Gan et al. 2000; Harvey et al. 2000; Yousef et al. 2000b). Cependant seule KLK1 semblait posséder une activité kininogénasique (Borgoño et al. 2007a; Bothwell et al. 1979; Charlesworth et al. 1999; Deperthes et al. 1997; Michael et al. 2005). Afin d'éviter toute confusion fonctionnelle, les

KLK2-15 ont alors été nommées « kallikrein-related peptidases », tout en conservant l'abréviation KLK. Cependant par facilité linguistique, tous les membres de cette famille restent dénommés kalicréines tissulaires (voire kalicréine) dans le cadre de cette thèse. Selon la nomenclature actuelle, les gènes de la famille multigénique sont notés en italique *KLK1* à *KLK15* et les protéines en caractères normaux : KLK1 à KLK15 (Lundwall et al. 2006a). Le tableau n°2 donne la correspondance entre les anciennes appellations et la nomenclature actuelle.

Nomenclature actuelle		Nomenclature ancienne		Autre nom et abréviation des kalicréine tissulaires
Gène	Protéine	Gène	protéine	
<i>KLK1</i>	KLK1	KLK1	hK1	Tissue/renal/pancreatic kallikrein, hPRK
<i>KLK2</i>	KLK2	KLK2	hK2	Human glandular kallikrein 1, hGK-1
<i>KLK3</i>	KLK3	KLK3	hK3	Prostate-specific antigen (PSA), APS, KLK2A1
<i>KLK4</i>	KLK4	PRSS17, KLK-L1, KLK4	hK4	KLK-like 1 protein, enamel matrix serine protease 1, (EMSP1), androgen-regulated message 1 (ARM1), PSTS, prostase, pemaB, enamel serine proteinase (pEMS)
<i>KLK5</i>	KLK5	KLK-L2	hK5	KLK-like 2 protein, stratum corneum tryptic-like enzyme (SCTE)
<i>KLK6</i>	KLK6	PRSS9	hK6	PRSS18, brain and skin serine protease (BSSP), protease M, zyme, neurosin, myelencephalon specific protease (MSP)
<i>KLK7</i>	KLK7	PRSS6	hK7	stratum corneum chymotrypsin-like enzyme (SCCE)
<i>KLK8</i>	KLK8	PRSS19	hK8	neuropsin, HNP, ovasin, tumor-associated differentially expressed gene-14 (TADG-14), brain serine protease 1 (BSP1)
<i>KLK9</i>	KLK9	KLK-L3	hK9	KLK-like 3 protein
<i>KLK10</i>	KLK10	PRSSL1, NES1	hK10	normal epithelial-Specific 1 protein (NES 1 protein)
<i>KLK11</i>	KLK11	PRSS20	hK11	trypsin-like serine protease (TLSP), hippostasin,
<i>KLK12</i>	KLK12	KLK-L5	hK12	KLK-L5 protein
<i>KLK13</i>	KLK13	KLK-L4	hK13	KLK-L4 protein
<i>KLK14</i>	KLK14	KLK-L6	hK14	KLK-L6 protein
<i>KLK15</i>	KLK15		hK15	Prostinogen, ACO protease, HSRNASPH, hK15

Tableau 2: Différents noms et abréviations des membres de la famille des kalicréines tissulaires

II. Organisation chromosomique

La famille des kallicroïnes tissulaires représente le plus large cluster de gènes de protéases du génome humain. Il s'étend sur environ 265 kb au locus 19q13.3-13.4 et aucun autre gène étranger aux kallicroïnes n'est présent au sein du locus (Gan et al. 2000; Harvey et al. 2000). Les 3 gènes initialement identifiés *KLK1*, 2 et 3 ne sont pas contiguës : *KLK15* suit *KLK1*, puis suivent *KLK3*, *KLK2* ainsi que le pseudogène Ψ *KLK1*. Les autres gènes de la famille (*KLK4* à *KLK14*) se suivent dans l'ordre. La direction de la transcription de tous les gènes se fait du télomère au centromère à l'exception de *KLK3* et *KLK2* (Borgoño et al. 2004; Yousef and Diamandis 2000) (figure n°6).

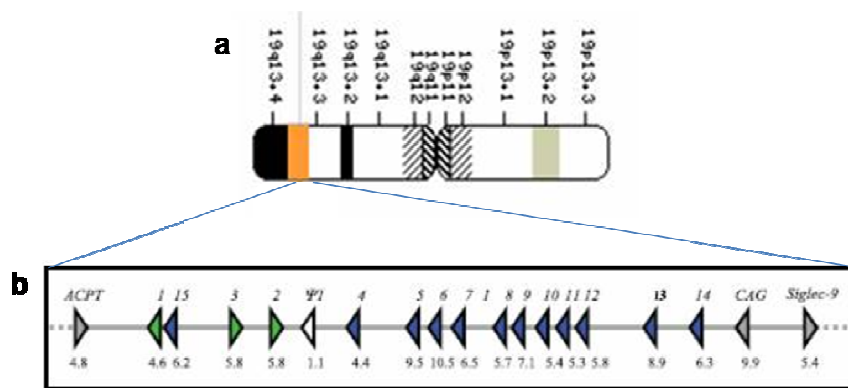


Figure 6 : Organisation chromosomique des kallicroïnes.

(a) Localisation du cluster des membres de la famille des kallicroïnes sur le chromosome 19 au locus q13.4 ; (b) Organisation des gènes au sein de ce locus, la direction de chaque flèche indique le sens de la transcription du gène correspondant. Le numéro du gène *KLK* est placé au-dessus du schéma tandis que les nombres situés en dessous indiquent la taille du gène.

III. Les gènes des kallicroïnes tissulaires

1. Structure des gènes des kallicroïnes tissulaires

Les gènes des kallicroïnes possèdent plusieurs caractéristiques communes : 5 exons codants de tailles similaires ou identiques, et la position des codons de la triade catalytique de ces protéases qui se situent respectivement dans les exons 2, 3 et 5 (Borgoño et al. 2004; Yousef and Diamandis 2001). Les quelques différences observées entre les gènes des *KLK* sont constatées dans les régions non codantes. Ainsi, la longueur des introns est variable, ce

qui conduit à des différences dans la longueur des gènes. Par contre, les séquences consensus d'épissage GT-AG sont conservées parmi la plupart des gènes, à l'exception de *KLK10*, qui possède un site supplémentaire au sein de l'intron 4 (Borgoño et al. 2004; Luo et al. 1998). La majorité des kallibréines récemment découvertes (*KLK4-15*) possède 1 à 3 exons supplémentaires non-codant dans la région 5' non traduite (ou 5'UTR : 5'*untranslated region*) (Yousef and Diamandis 2001). Les gènes *KLK1*, 2 et 3 n'ont pas d'exons supplémentaires en 5', cependant des sites de démarrage de transcription alternatifs existeraient en amont du 1^{er} exon. La région 3' non traduite (3' UTR) est en continuité avec le dernier exon à l'exception de *KLK14* qui possède un intron supplémentaire. La longueur de la 3'UTR est variable allant de 45 pb pour *KLK8* à 748 pb pour *KLK7* (Yousef and Diamandis 2001) (Figure n°7).

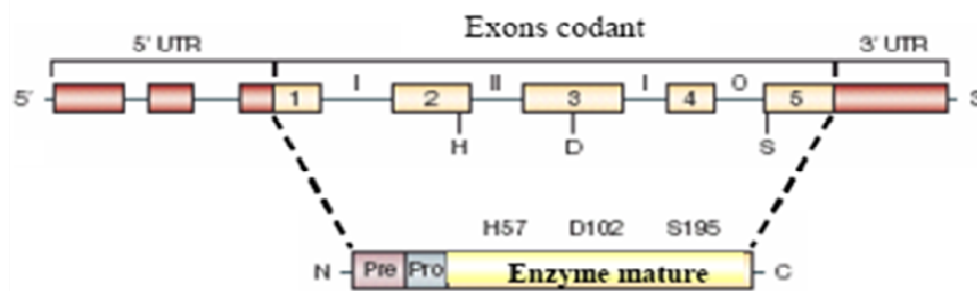


Figure 7 : Structure schématique des gènes et des protéines de la famille des kallibréines tissulaires humaines.

Les séquences exoniques codantes et non codantes sont représentées respectivement par des boîtes numérotées et non numérotées. Les structures introniques sont représentées par une barre. L'exon 1 comprend le site d'initiation de la transcription et code pour le peptide signal de sécrétion et le propeptide. Les résidus de la triade catalytique des kallibréines (His, Asp, Ser) sont localisés respectivement sur les exons 2, 3 et 5.

2. Régulation de l'expression des gènes des kallibréines

a) Régulation par l'augmentation du nombre de copies de gène

Très peu d'études ont été réalisées sur l'implication du nombre de copie des gènes des kallibréines dans leur niveau d'expression. Cependant dans des lignées cellulaires de carcinome de la vessie, il a été observé une amplification de gènes de kallibréines parallèlement à une augmentation des transcrits de *KLK5*, 6, 8 et 9 (Shinoda et al. 2007). D'autres études concernent le cancer de l'ovaire où il a été révélé une augmentation du nombre de copie du locus des kallibréines dans des lignées cellulaires et des tissus de cancer

primaire sur-exprimant les membres de la famille des kalllicréines (Bayani et al. 2008). Suite à une analyse par Southern Blot, Ni et ses collaborateurs ont suggéré que la surexpression de *KLK6* dans des tumeurs de l'ovaire pourrait être liée à une amplification de son gène (Ni et al. 2004). Une étude plus approfondie a également montré que les tumeurs ayant une augmentation du nombre de locus des kalllicréines étaient plus susceptibles de sur-exprimer *KLK6*, cependant il n'y aurait pas de corrélation entre le nombre de copie et l'expression protéique (Bayani et al. 2011).

b) Régulation par les stéroïdes

Il s'agit du mode de régulation des kalllicréines le plus étudié du fait de l'intérêt de plusieurs équipes pour l'expression des kalllicréines dans des tissus hormono-dépendants.

La régulation par les androgènes a principalement été étudiée pour *KLK2* et *KLK3* dans la prostate où ces gènes sont sur-exprimés en réponse à cette classe d'hormone. Plusieurs éléments de réponse aux androgènes (ARE : *Androgen response element*) ont été identifiés à proximité du site de démarrage de la transcription du gène *KLK3* (Cleutjens et al. 1996; Riegman et al. 1991; Schuur et al. 1996). Etant donné que les promoteurs de *KLK2* et *KLK3* ont 80% de similarité de séquence, sans surprise, des motifs similaires aux ARE de *KLK3* ont été identifiés dans les régions promotrices et amplificatrices de *KLK2* (Young et al. 1992). La technique ChIP (*Chromatin Immunoprecipitation*) a permis de démontrer la fixation du récepteur aux androgènes sur les gènes *KLK2* et *KLK3* dans les cellules LNCaP, une lignée cellulaire de cancer de la prostate (Kang et al. 2004; Kang et al. 2002; Shang et al. 2002). Des éléments potentiels de réponse aux androgènes ont été identifiés *in silico*, en amont du gène *KLK4* (Stephenson et al. 1999), cependant l'effet des androgènes sur l'expression prostatique de ce gène varie selon le type cellulaire (Dong et al. 2005; Korkmaz et al. 2001; Lai et al. 2009; Nelson et al. 1999; Xi et al. 2004). Les androgènes stimulent également l'expression des gènes *KLK2*, *3*, *8*, *10*, *11*, *13*, *14* et *15* dans les lignées cellulaires cancéreuses du sein (Hsieh et al. 1997; Luo et al. 2003; Luo et al. 2000; Magklara et al. 2000; Paliouras and Diamandis 2007; Yousef et al. 2003). L'expression des gènes *KLK4*, *5*, *6*, *9* et *12* serait également induite par les androgènes dans des lignées cellulaires mammaires cancéreuses cependant ces observations réalisées par RT-PCR non quantitative restent à être validées par d'autres méthodes (Paliouras and Diamandis 2007; Yousef and Diamandis 2000; Yousef et al. 2000c; Yousef et al. 1999b; Yousef et al. 2004c).

Des progestatifs sont capables de stimuler l'expression des gènes *KLK2* et *KLK3* dans des lignées cellulaires de cancer du sein (Hsieh et al. 1997; Magklara et al. 2000; Yu et al. 1994). Des plasmides rapporteurs de *KLK2* et *KLK3* ont été activés par la progestérone dans la lignée prostatique cancéreuse PC-3 co-transfectés avec le récepteur aux progestatifs (PR : *Progesterin Receptor*) (Shan et al. 1997). La progestérone stimule également l'expression de *KLK4* dans la lignée cellulaire KLE du cancer de l'endomètre et la lignée T47D du cancer du sein, probablement par l'intermédiaire d'un élément de réponse à la progestérone localisé à 2419 pb en amont du site de démarrage de la transcription (Lai et al. 2009; Myers and Clements 2001). En plus de *KLK2*, *3* et *4*, des données préliminaires suggèrent que l'expression *KLK6* et des gènes *8* à *15* serait également induite par les progestatifs dans les cellules du cancer du sein (Luo et al. 2000; Shaw and Diamandis 2008; Yousef et al. 2000a; Yousef and Diamandis 2000; Yousef et al. 2003; Yousef et al. 1999a; Yousef et al. 2000c; Yousef et al. 2000d; Yousef et al. 2002c).

Contrairement aux progestatifs et aux androgènes, les glucocorticoïdes peuvent soit activer soit inhiber soit stimuler l'expression des kalicréines. Par exemple, l'expression de *KLK10* augmente avec un traitement à la dexaméthasone des cellules du cancer du sein MCF7, T47D et MDA-MB-468, mais diminue dans les cellules MCF-10A (Kulasingam and Diamandis 2007; Shaw and Diamandis 2008). Des éléments de réponse aux glucocorticoïdes ont été identifiés *in silico* sur les promoteurs de *KLK5*, *6*, *7*, *8*, *10* et *13* mais leur fonctionnalité n'a pas été vérifiée expérimentalement (Shaw and Diamandis 2008).

La régulation par les œstrogènes est plus complexe et a principalement été étudiée dans les lignées cellulaires de cancer du sein. L'expression de *KLK5*, *6*, *8*, *10*, *11*, *13* et *14* est stimulée par les œstrogènes (Borgoño et al. 2003; Kishi et al. 2003; Luo et al. 2000; Paliouras and Diamandis 2007; Paliouras and Diamandis 2008b; Yousef et al. 2000a; Yousef et al. 1999a) et des expériences de RT-PCR qualitative suggèrent que les œstrogènes augmenteraient également l'expression de *KLK7*, *9*, *12* et *15* (Yousef et al. 2004a; Yousef and Diamandis 2000; Yousef et al. 2000c; Yousef et al. 2000e). Cependant la réactivité de chaque kalicréine diffère selon la lignée cellulaire de cancer du sein, il a été suggéré que ces différences pourraient être dues à des changements génétiques ou épigénétiques du locus des kalicréines ou de croisement entre différentes voies de signalisation régulées par les œstrogènes. De plus, le mécanisme d'action est incertain car aucun élément de réponse aux œstrogènes n'a été identifié dans la région proximale des promoteurs (Paliouras and Diamandis 2007).

c) *Régulation par la méthylation de l'ADN*

La méthylation de l'ADN est un processus épigénétique, il s'agit de la fixation de groupements méthyles sur l'ADN toujours attaché au carbone 5' d'une cytosine. Chez les mammifères, pratiquement tous les résidus méthylcytosine font partie d'un dinucléotide 5'-CpG-3'. Ces séquences ne sont pas réparties aléatoirement dans l'ADN, mais ont tendance à se concentrer dans des « îlots » riches en GC, souvent localisés dans des régions du promoteur contrôlant l'expression du gène. Ce mode de régulation de l'expression des gènes pourrait se produire pour les kallitréines, en effet il a été montré qu'un traitement de certaines lignées cellulaires cancéreuses par un agent déméthylant, le 5-aza-dC, pouvait induire ou réprimer la transcription des gènes. C'est le cas de la lignée cancéreuse prostatique PC3 de cancer où l'expression des gènes *KLK10*, *KLK11* et *KLK12* a été modifiée suite au traitement. Ceci a également été observé dans des lignées de cancer du sein avec les gènes *KLK4*, *KLK5*, *KLK6*, *KLK10* et *KLK11*, et dans des lignées cellulaires de cancer de l'ovaire pour *KLK4* et *KLK5* (Pampalakis et al. 2006). Des études de la méthylation des gènes des kallitréines avec des techniques de PCR spécifique de la méthylation et de séquençage de l'ADN avec du bisulfite de sodium ont également montré que le profil de méthylation de l'ADN changeait lors de la progression tumorale. Ceci est le cas pour le gène de *KLK10* avec une hyperméthylation de l'exon 3 qui serait à l'origine de sa sous-expression lors de la progression tumorale dans les cancers du sein, de l'estomac, de l'ovaire, du carcinome hépatocellulaire (Huang et al. 2007; Li et al. 2001; Lu et al. 2009; Sidiropoulos et al. 2005) ainsi que dans les leucémies lymphoblastiques aiguës (Roman-Gomez et al. 2003). Très peu d'îlots CpG ont été détectés dans la région proximale du promoteur de *KLK6*, cependant le statut de méthylation du gène corrèle avec son niveau d'expression dans des lignées cellulaires ainsi que dans des échantillons de cancer du sein (Pampalakis et al. 2009; Pampalakis and Sotiropoulou 2006). Enfin des études sur des lignées tumorales mammaires, prostatiques et ovariennes montrent que la méthylation de l'ADN interviendrait dans le contrôle de l'expression des gènes de *KLK5*, *6*, *11* et *12* (Pampalakis et al. 2006; Pampalakis and Sotiropoulou 2006).

d) *Contrôle de l'expression par les microRNA*

Les microARN (miRNA) ont récemment été mis en avant comme nouveaux régulateurs des *KLK*. Chow et ses collaborateurs ont identifié 96 interactions fortes *KLK*/miRNA en utilisant des outils de bioinformatique. *KLK10* est la kallitréine la plus souvent ciblée, suivi

par KLK5 et KLK13 (Chow et al. 2008). La transfection de cellules de cancer du sein et des ovaires avec des miRNA particuliers diminue significativement la concentration de *KLK6* et *KLK10* dans ces cellules (Chow et al. 2008; White et al. 2010).

IV. Structure et activité enzymatique des kallicréines tissulaires

1. Structure protéique des kallicréines

Comme toutes les protéases, les kallicréines sont identifiées et répertoriées dans la base de données Merops (Merops, the peptidase database : www.sanger.ac.uk ; (Rawlings et al. 2006). Dans cette base de données, les protéases sont assignées à des familles sur la base d'identités de séquences, et à un clan qui regroupe les familles possédant une origine commune dans l'évolution. Selon cette base de données, les kallicréines appartiennent à la famille S1 et au clan SA des protéases à sérine. La plupart des membres de ce clan, comme les kallicréines, sont produites sous forme de préproenzymes. Elles doivent être correctement maturées pour exprimer une activité protéolytique. Nouvellement synthétisées, elles sont dans un premier temps dirigées vers le réticulum endoplasmique puis vers la voie de sécrétion grâce au clivage du peptide signal ou « prédomaine », composé de 16 à 33 acides aminés. Les kallicréines sont sécrétées sous la forme de proenzymes ou « zymogènes » et restent inactives jusqu'au clivage du « prodomaine », qui induit un changement de conformation de la poche de fixation du substrat et l'apparition de l'activité enzymatique (Hedstrom 2002).

La séquence des formes matures contient les acides aminés Histidine, Aspartate et Sérine de la triade catalytique des protéases à sérine. La résolution des structures cristallographiques de KLK1 et KLK3, 4, 5, 6 et 7 montre que la triade catalytique est positionnée entre deux domaines de 6 feuillets β (Bernett et al. 2002; Debela et al. 2007a; Debela et al. 2007b; Fernandez et al. 2007; Gomis-Rüth et al. 2002; Katz et al. 1998; Ménez et al. 2008). La structure observée est caractéristique des membres de la famille S1 (figure n°8).

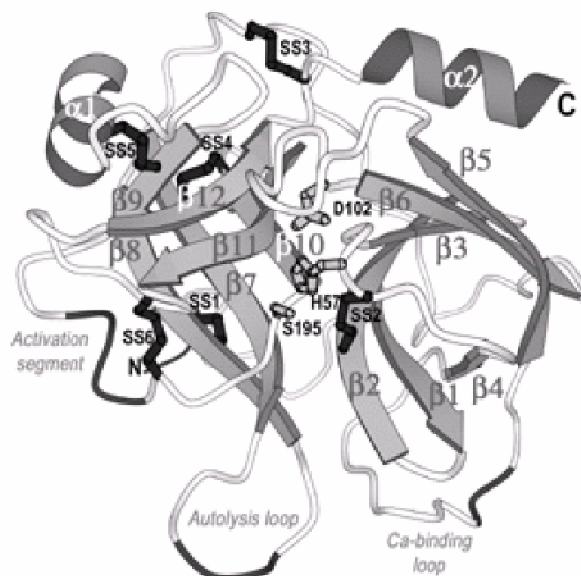


Figure 8 : Représentation en ruban de la structure tri-dimensionnelle de la proKLK6.

Les structures secondaires en feuillet β et en hélice α sont représentées respectivement par des flèches et des rubans. L'emplacement des résidus de la triade catalytique et des ponts disulfures sont représentés par des bâtonnets. Les régions des boucles dont la structure est peu définie sont indiquées en gris foncé. Les extrémités amino et carboxy terminales sont également représentées (N et C). D'après Gomis-Rüth et coll, 2002 (Gomis-Rüth et al. 2002).

Basé sur l'alignement de séquence (figure n°9), près de la moitié des acides aminés (122 résidus) sont conservés dans la moitié des kallicroïnes (Clements et al. 2004). Les acides aminés impliqués dans l'activité protéolytique et la conformation protéique sont hautement conservés entre les kallicroïnes, cependant les résidus associés à la spécificité du substrat sont plus divergents (voir paragraphe suivant). La triade catalytique et plusieurs résidus adjacents sont identiques, comme les 10 résidus cystéines qui forment les ponts disulfures. Cependant, KLK 4-12 et 15 ont une paire de cystéines additionnels (137 et 232), ce qui n'est pas caractéristique des protéases du clan S1A (Yousef et al. 2004b). La Glycine₁₉₃ est présente dans toutes les KLK à l'exception de KLK10 qui possède un glutamate, ce résidu est normalement hautement conservé car il est essentiel lors de la protéolyse d'un substrat (Hedstrom 2002). La séquence polypeptidique des kallicroïnes est plus divergente dans les 8 boucles environnant la triade catalytique et exposées vers la surface. La boucle 99 est l'exemple le plus extrême, les KLK1 à 3 ont une insertion de 11 acides aminés, elle est connue pour être la « boucle des kallicroïnes ». KLK8-11 et 13 ont aussi une petite insertion

dans cette région. La boucle 148 varie aussi entre les KLK, particulièrement pour KLK15 qui a une insertion de 10 acides aminés.

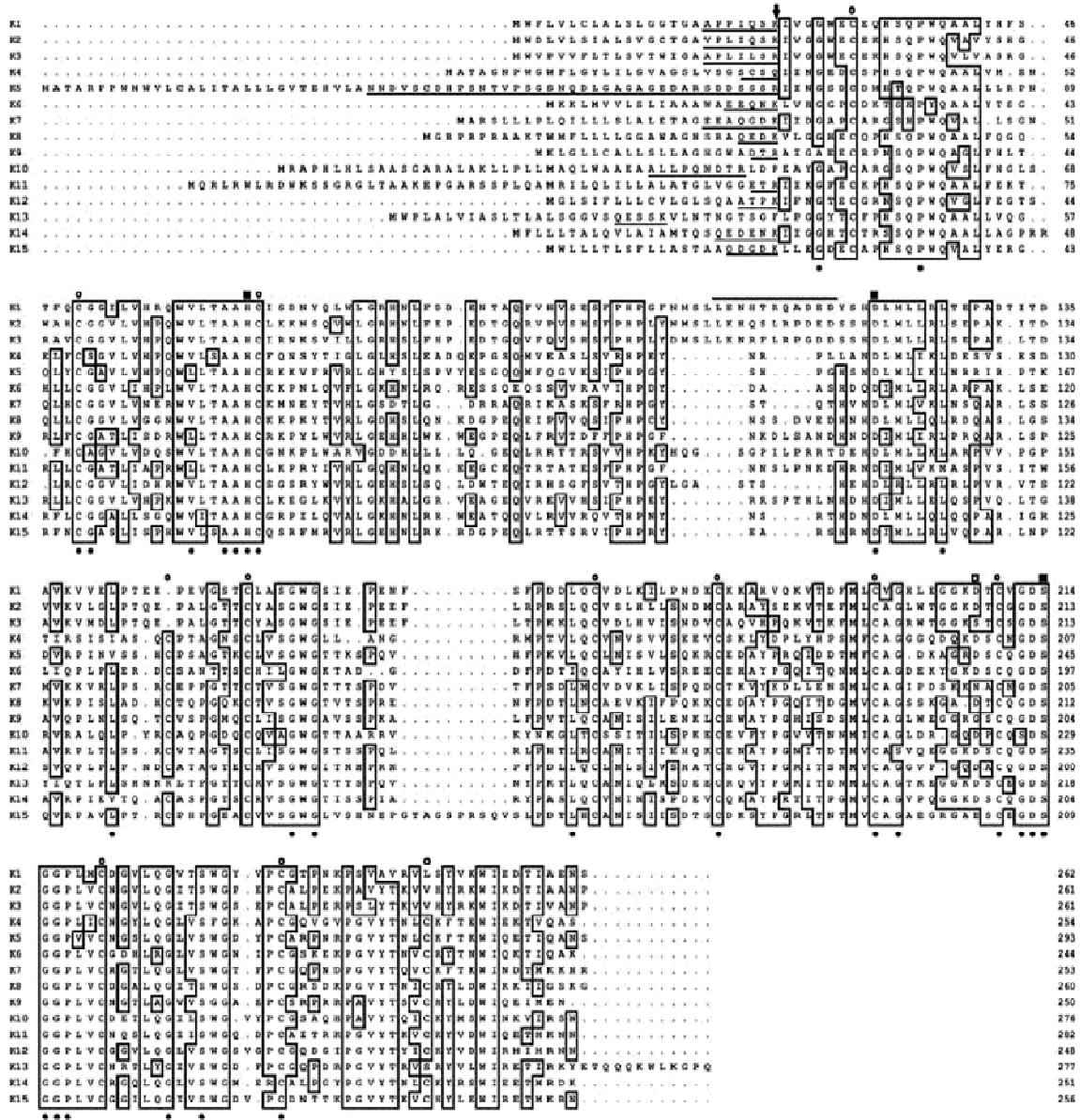


Figure 9 : Alignement de séquence des membres de la famille des kallicroïnes tissulaires.

Les résidus identiques pour au moins 8 KLK sont encadrés. Les résidus de la triade catalytique sont indiqués par des carrés noirs. Le peptide signal est suivi par le propeptide qui est souligné. Les sites d'activation connus ou prédits sont indiqués par une flèche. Les ponts disulfures formés par les résidus cystéines sont indiqués par des cercles. Les résidus situés au fond de la poche de fixation du substrat sont indiqués par un carré vide. Les résidus formant la boucle des kallicroïnes sont surlignés. Les résidus invariants qui sont typiquement conservés chez les protéases à serine sont indiqués par un point noir en dessous. D'après Clements et coll, 2004 (Clements et al. 2004)

2. Spécificité de substrat

La spécificité enzymatique des kalllicréines dépend du résidu 189. Les kalllicréines 1, 2, 4, 5, 6, 8 et 10-14 ont un résidu aspartate en position 189, ce qui leurs confèrent une activité de type trypsine, c'est-à-dire capable de cliver un substrat après une arginine ou une lysine (Debela et al. 2008; Lundwall et al. 2006b). Il est à noter que KLK10 ne présente pas d'activité protéolytique vis-à-vis des substrats traditionnels des kalllicréines, ceci pourrait être dû à la substitution de la Glycine₁₉₃ par un résidu glutamate. KLK15 a aussi une activité de type trypsine, mais possède un glutamate en position 189 (Yoon et al. 2008a). KLK3 avec une serine₁₈₉ et KLK7 avec une asparagine₁₈₉, ont une activité de type chymotrypsine et peuvent accommoder des résidus tels que la tyrosine, la leucine et la phénylalanine (Skytt et al. 1995; Watt et al. 1986). Il est difficile de prédire la spécificité de KLK9 car elle possède un résidu glycine en position 189, ce qui est rare parmi les protéases à serine. Il est possible qu'elle ait une spécificité similaire à l'élastase du neutrophile humain, qui possède aussi un résidu glycine₁₈₉ et qui tend à cliver après les résidus valine et alanine (Blow 1977; Sinha et al. 1987).

La spécificité de substrats des kalllicréines est encore accentuée par les résidus des 8 boucles qui entourent le site actif et des exosites chargés à la surface de la protéine (Debela et al. 2008).

3. Mécanisme protéolytique

Lorsque les kalllicréines sont activées elles fonctionnent comme tous les membres du clan SA. L'activité protéolytique dépend des résidus de la triade catalytique Histidine-Aspartate-Serine composent le site actif. Le mécanisme catalytique s'effectue en plusieurs étapes :

-La serine₁₉₅ possède un groupement –OH permettant une attaque nucléophile sur le groupement carbonyle du substrat. L'histidine va pouvoir récupérer l'hydrogène de la serine, ce résidu est quant à lui stabilisé par une liaison hydrogène avec l'Aspartate. Cette réaction donne un intermédiaire tétraédrique. L'Histidine va donner le proton au groupement amine du substrat ce qui permet une décomposition de l'intermédiaire tétraédrique. Un intermédiaire acyl-enzyme se forme alors par catalyse générale acide de l'Histidine polarisé par l'Aspartate.

-Le produit amine du substrat est ensuite libéré, une molécule d'eau intervient pour le remplacer. Ceci se fait à l'aide de l'Histidine qui va accepter un proton de l'eau, on obtient un second intermédiaire tétraédrique.

-Enfin, la Serine va accepter le proton de l'Histidine, relâchant le groupement acide du substrat, et l'enzyme revient à son statut initial.

Il est à noter que lors de la formation des deux intermédiaires tétraédrique, on peut observer ce qui est appelé un trou pour l'oxygénation. Le substrat est stabilisé dans la poche catalytique grâce à deux ponts hydrogènes entre son groupement carbonyle et les groupements amide de la serine 195 et de la glycine 193 (Di Cera 2009; Hedstrom 2001).

4. Régulation de l'activité enzymatique

a) Régulation par l'activation du zymogène

Comme la majorité des protéases à serine, les proformes des kallicroéines ne possèdent pas d'activité protéolytique. Celle-ci apparaît suite à un clivage protéolytique du pro-segment dont la séquence et la taille varie entre les KLK. A l'exception de KLK4, toutes les kallicroéines présentent un résidu lysine ou arginine en position P1 par rapport au site de clivage (Paliouras and Diamandis 2006) (tableau n°3). La libération du prosegment nécessite donc l'intervention de protéases à activité de type trypsine.

Ainsi la capacité de la trypsine à cliver le prosegment a été étudiée *in vitro* et il a été démontré que KLK1, 3, 5-7 et 15 sont des substrats de la trypsine (Angermann et al. 1992; Brattsand and Egelrud 1999; Gomis-Rüth et al. 2002; Skytt et al. 1995; Takada et al. 1985; Takayama et al. 2001a). D'autres enzymes sont capables d'activer les kallicroéines *in vitro* comme la thermolysine, la kallicroéine plasmatique, la plasmine, le facteur Xa, l'uPA (*urokinase-type plasminogen activator*), les MMP (*matrix metalloproteinase*), et la thrombine (Beaufort et al.; Blaber et al. 2010; Ryu et al. 2002; Takada et al. 1985; Tye et al. 2009; Yoon et al. 2012; Yoon et al. 2008b). Pour KLK4 dont le prodomaine est clivé après un résidu glutamine, elle peut donc être activée par des enzymes de type metalloprotéase et la dipeptidyl-peptidase, une protéase à cystéine (Simmer and Hu 2002; Tye et al. 2009).

Kallicréines	Site de clivage	Références
ProKLK1	I-Q-S-R↓I-V-G	(Yoon et al. 2007)
proKLK2	I-Q-S-R↓I-V-G	(Kumar et al. 1996) (Yoon et al. 2007)
proKLK3	I-L-S-R↓ I-V-G	(Lövgren et al. 1997) (Yoon et al. 2007)
proKLK4	S-C-S-Q↓I-I-N	(Simmer and Hu 2002) (Tye et al. 2009)
proKLK5	S-S-S-R↓I-I-N	(Brattsand and Egelrud 1999) (Yoon et al. 2007)
proKLK6	E-Q-N-K↓L-V-H	(Gomis-Rüth et al. 2002)
proKLK7	Q-G-D-K↓I-I-D	(Hansson et al. 1994)
proKLK8	Q-E-D-K↓V-L-G	(Shimizu et al. 1998)
proKLK9	A-D-T-R↓A-I-G	(Yoon et al. 2007)
proKLK10	N-D-T-R↓L-D-P	(Yoon et al. 2007)
proKLK11	G-E-T-R↓I-I-K	(Luo et al. 2006) (Yoon et al. 2007)
proKLK12	A-T-P-K↓I-F-N	(Memari et al. 2007)
proKLK13	E-S-S-K↓V-L-N	(Yoon et al. 2007)
proKLK14	D-E-N-K↓I-I-G	(Brattsand et al. 2004)
proKLK15	D-G-D-K↓L-L-E	(Yoon et al. 2007)

Tableau 3 : Site d'activation des kallicréines.
La liaison clivée est indiquée par une flèche.

D'autres travaux ont été réalisés afin d'examiner leur capacité à s'auto-activer ou à réaliser une activation croisée. Plusieurs études *in vitro* ont démontré que les kallicréines pouvaient interagir entre elles (Borgoño and Diamandis 2004; Brattsand et al. 2004; Michael et al. 2006; Yoon et al. 2008a). Ainsi le terme « KLK activome » a été introduit pour décrire l'activation en série des proformes des KLK par d'autres KLK matures (Yoon et al. 2008a). Ce profil supposé d'activation en série est représenté sur la figure n°10, cependant ce profil est principalement basé sur des clivages protéolytiques *in vitro* de pro-KLK recombinantes.

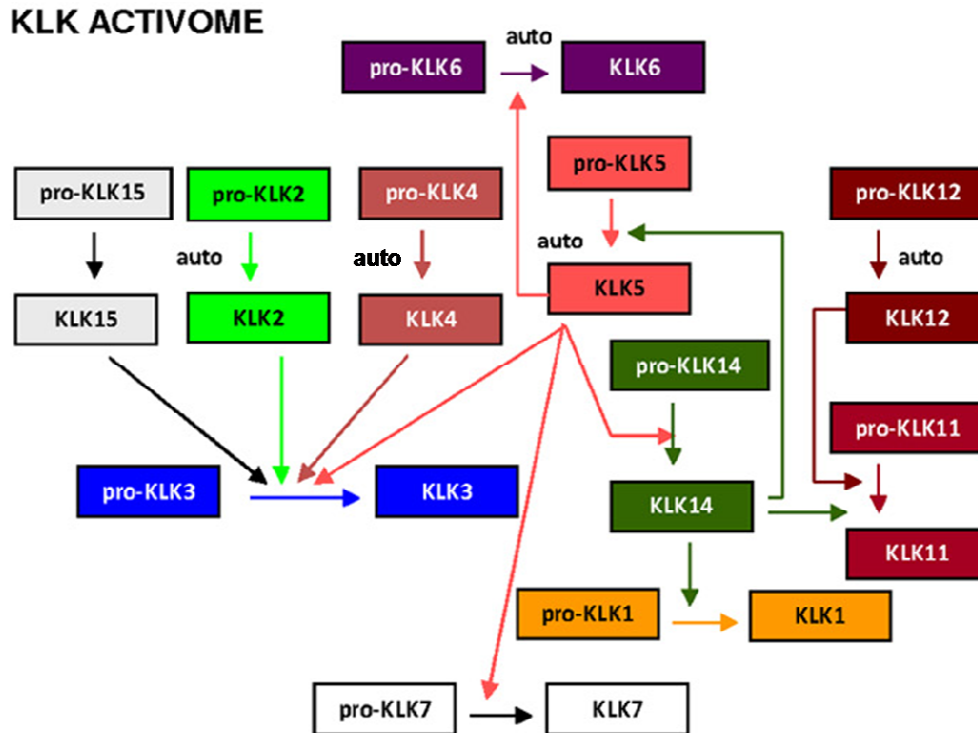


Figure 10 : « KLK activome », schéma représentant l'activation en série des proformes des kallicroïnes par d'autres kallicroïnes matures.

D'après G. Sotiropoulou et coll, 2009 (Sotiropoulou et al. 2009)

Il a été montré que KLK2, KLK4 et KLK15 sont capables d'activer *in vitro* proKLK3 (ou proPSA), KLK4 et KLK15 étant plus efficaces que KLK2 (Kumar et al. 1997; Lövgren et al. 1997; Takayama et al. 2001a; Takayama et al. 1997; Takayama et al. 2001b). KLK5 serait également capable d'activer proKLK3 (Michael et al. 2006) ainsi que la proforme de KLK7 et de KLK14 (Brattsand et al. 2004). Après activation, KLK14 pourrait à son tour cliver le prosegment de KLK5 (Brattsand et al. 2004), cette dernière pouvant activer proKLK1 et proKLK11 (Emami and Diamandis 2008; Yoon et al. 2008a). proKLK11 constitue par ailleurs un substrat de KLK12 (Yoon et al. 2008a).

D'autres travaux ont révélé la capacité des kallicroïnes 2 (Denmeade et al. 2001), 4 (Takayama et al. 2001b), 5 (Brattsand et al. 2004), 6 (Blaber et al. 2007), 12 (Yoon et al. 2008a; Yoon et al. 2008b) et 13 (Sotiropoulou et al. 2003) à s'auto-activer.

b) Régulation par des inhibiteurs

L'activité des kallicroïnes est régulée par des inhibiteurs endogènes (Goettig et al. 2010), en particulier les SERPINE (*SER*ine *Peptidase IN*hibitors), les inhibiteurs de type kazal et les

macroglobulines (Barrett et al. 2003). Il n'existe que deux inhibiteurs de type kunitz capable d'agir sur les kallikréines. Le premier est la bikunine qui se lie à KLK1, ce qui peut jouer un rôle important dans la fonction et les maladies pulmonaires, et elle est également associée à KLK6 et 10 dans les ascites du cancer de l'ovaire (Delaria et al. 1997; Forteza et al. 2007; Oikonomopoulou et al. 2010a). Le second est un inhibiteur de l'HGFA (*Hepatocyte Growth Factor Activator*) qui est impliqué dans la progression tumorale. L'HGFA est activé par KLK4 et 5 qui sont en retour inhibées par les domaines inhibiteurs de type 1 de l'HGFA (HAI-1) (Mukai et al. 2008)

➤ Les SERPINES (*serpin : SERine Protease INhibitors*)

La superfamille des SERPINE est composée de protéines de 33-46 kDa qui représentent environ 10% du plasma sanguin humain (Hunt and Dayhoff 1980; Potempa et al. 1994). Les SERPINES agissent comme des substrats suicides des protéases à sérine. Elles présentent une boucle réactive qui est clivée par la protéase ce qui la bloque de manière irréversible dans le site catalytique de l'enzyme. Le clivage entraîne des changements de conformation de l'enzyme et de la serpine (Huntington et al. 2000).

La SERPINE α_1 -antitrypsine (AAT) est capable d'inhiber fortement *in vitro* KLK4 et KLK14 et à un moindre degré, KLK12 (Borgoño et al. 2007b; Luo and Jiang 2006; Memari et al. 2007; Obiezu et al. 2006). De façon surprenante, elle est également capable d'inhiber KLK7 qui possède une activité de type chymotrypsine, mais elle n'agit pas sur KLK 1, 2, 5, 6, 8, 11 et 13 *in vitro* (Geiger et al. 1981; Luo and Jiang 2006; Magklara et al. 2003; Michael et al. 2005; Mikolajczyk et al. 1998; Zhang et al. 1997). Des études *in vivo* ont révélé l'existence de complexes KLK3-AAT dans la prostate et leur quantité est augmentée dans les formes bénignes d'hyperplasie de la prostate (Stenman et al. 1991; Zhang et al. 1999). Récemment des analyses immunologiques des ascites de cancer de l'ovaire indiquent la présence de complexes formés entre KLK 5, 6, 8 et 10 et l'ATT (Oikonomopoulou et al. 2010a).

KLK3/PSA est principalement complexée avec l' α_1 -antichymotrypsine (ACT) dans le plasma sanguin, ces complexes formant 85% de la KLK3 circulante totale. Une augmentation du ratio de la KLK3 libre/ KLK3-ACT est corrélé avec la progression du cancer de la prostate (Becker and Lilja 1997; Stenman et al. 1991). *In vitro* l'ACT n'inhibe pas ou modérément les kallikréines de type trypsine soit KLK 1, 2, 4, 5, 8 et 11-14 (Borgoño et al. 2007b; Hutchinson et al. 2003; Luo and Jiang 2006; Michael et al. 2005; Mikolajczyk et al. 2004; Mikolajczyk et al. 1998; Obiezu et al. 2006). De façon intéressante, des analyses de lait et d'ascites humain

montre qu'environ 5% de KLK6 est liée à l'ACT sous forme de complexe qui reste stable après une purification par HPLC (Hutchinson et al. 2003).

L'antithrombine III (AT) est un inhibiteur dont l'effet peut être augmenté en formant un complexe avec l'héparine (Dementiev et al. 2004). Cet effet de l'héparine a pu être observé pour l'inhibition de KLK2 par l'AT dans des cellules tumorales où il existe une expression élevée et une colocalisation avec KLK2 (Cao et al. 2002). *In vitro*, l'AT n'inhibe pas les KLK de type chymotrypsine (Cao et al. 2002; Luo and Jiang 2006). Parmi les KLK de type trypsine, seulement KLK6 et KLK14 sont modérément inhibées par l'AT, bien que l'héparine ait été rajoutée (Borgoño et al. 2007b; Magklara et al. 2003).

L' α_2 -Antiplasmine (AP) inhibe fortement KLK2, 4, 5 et 12, et inhibe modérément KLK7, 8 et 13 (Borgoño et al. 2007b; Luo and Jiang 2006; Memari et al. 2007; Mikolajczyk et al. 1998).

La PCI (*proteinase C inhibitor*) se lie rapidement à KLK 1, 2, 5, 7, 8, 13 et 14 et lentement à KLK 3 et 12 (Cao et al. 2003; Luo and Jiang 2006; Memari et al. 2007). *In vivo*, la PCI est présente dans le plasma séminal, et des complexes avec KLK2 et à un plus faible niveau KLK3 ont été trouvés (España et al. 1995; España et al. 1991; España et al. 2007).

Apparemment, une des SERPINE, la kallistatine affiche une forte spécificité pour les KLK 1 et 7, alors que KLK14 est faiblement inhibée (Luo and Jiang 2006; Zhou et al. 1992). Cependant elle ne peut inhiber KLK 5 et 11-13 (Luo and Jiang 2006). Il est probable que la kallistatine régule l'activité de KLK1, influençant la pression sanguine et l'angiogénèse qui peut aussi dépendre de la capacité de fixation de l'héparine par la kallistatine (Chao et al. 2001; Chen et al. 2001; Miao et al. 2003).

➤ Les inhibiteurs de type kazal

LEKT1 (*LymphoEpithelial Kazal-Type inhibitor*), est produit par une protéolyse de SPINK5 (*Serine Protease INhibitor Kazal-type 5*). LEKT1 est une protéine sécrétée qui nécessite un clivage protéolytique pour générer des fragments bioactifs qui agissent comme des inhibiteurs spécifiques de protéases à serine, incluant certaines kallicréines (Deraison et al. 2007). Dans des cultures de keratinocytes et dans l'épiderme, il a été démontré que certains fragments de LEKT1 étaient capable d'inhiber KLK 5, 7 et 14 (Deraison et al. 2007). Ces inhibiteurs seraient d'importants régulateurs des KLK dans la peau (Eissa and Diamandis 2008; Meyer-Hoffert et al. 2010).

➤ Les macroglobulines

L' α_2 -macroglobuline (α_2 M) est un inhibiteur dont le mécanisme d'action consiste à un englobement irréversible de la protéase suite à un changement de conformation induit par le clivage d'une séquence cible (Barrett 1989). La capacité de l' α_2 M d'englober KLK1 a été démontré *in vitro* (Barrett 1989) et des complexes de l' α_2 M avec KLK2 ont été détectés dans le sérum de patients atteints d'un cancer de la prostate (Grauer et al. 1998; Heeb and España 1998). KLK3 forme également un complexe stable avec l' α_2 M dans le sérum (Christensson et al. 1990). De manière intéressante, KLK 4, 5, 6, 12 et 13 ne sont pas inhibées de façon significative par l' α_2 M (Magklara et al. 2003; Memari et al. 2007; Michael et al. 2005; Obiezu et al. 2006; Sotiropoulou et al. 2003).

➤ Inhibition par le zinc (Zn)

Des inhibitions des KLK 2, 3, 4, 5, 7, 8, 12 et 14 par le zinc ont été rapportées à plusieurs reprises (Borgoño et al. 2007b; Brattsand et al. 2004; Debela et al. 2007a; Debela et al. 2007b; Debela et al. 2006; Kishi et al. 2006; Lövgren et al. 1999; Memari et al. 2007; Ménez et al. 2008). Le zinc serait sans effet sur KLK1 et KLK6 tandis que les données sur KLK 9-11, 13 et 15 sont encore manquantes.

c) *Inactivation par protéolyse*

Les kallitréines matures peuvent perdre leur activité enzymatique par protéolyse interne et se retrouver alors sous forme multicaténaires inactives. Par exemple, des formes dégradées de KLK2, avec principalement un site de clivage situé entre les résidues R¹⁴⁵-S¹⁴⁶ et un site mineur entre les résidus R¹⁰¹-L¹⁰² ont été isolées du plasma séminal et des tissus prostatiques (Lövgren et al. 1999; Lövgren et al. 1997). De la même manière, environ 30% de la kallitréine 3 est présente sous des formes clivées dans le liquide séminal et les tissus prostatiques. Le principal site de clivage se situe entre les résidus K¹⁴⁵-K¹⁴⁶, deux autres sites mineurs se situent entre les résidus R⁸⁵-F⁸⁶ et K¹⁸²-S¹⁸³ (Christensson et al. 1990; Sensabaugh and Blake 1990; Watt et al. 1986). Les enzymes responsables du clivage interne de KLK2 et KLK3 sont toujours inconnues.

Certaines kallitréines sont capables de s'auto-inactiver, en effet des protéines recombinantes de KLK6, 7, 12, 13 et 14 (Bayes et al. 2004; Blaber et al. 2001; Blaber et al. 2007; Borgoño et al. 2007b; Hansson et al. 1994; Magklara et al. 2003; Memari et al. 2007;

Sotiropoulou et al. 2003) sont fragmentées *in vitro*, probablement par un mécanisme auto-protéolytique. Un point intéressant est que l'activation de certains zymogènes des kallibréines par d'autres kallibréines est suivi plus tard par un clivage interne et l'inactivation par la même kallibréine voire par une kallibréine différente. Cela a été démontré notamment pour KLK3 qui est activée par KLK5 puis inactivée ultérieurement lorsque l'on prolonge le temps d'incubation (Michael et al. 2006). D'autres protéases à sérine peuvent également inactiver des kallibréines, ceci a été rapporté pour KLK11 qui est protéolysée *in vitro* par la plasmine (Luo et al. 2006).

V. Rôles Physiopathologiques des kallibréines tissulaires

Les kallibréines tissulaires interviennent dans de nombreux processus physiologiques comme le contrôle de la pression sanguine, la défense immunitaire innée, la liquéfaction du sperme, la desquamation. Elles ont également été impliquées dans des pathologies comme le syndrome de Neverthon au niveau de la peau, des pathologies neurodégénératives et des cancers.

Les kallibréines tissulaires étant souvent co-exprimées dans de multiples tissus, il a été proposé que certains processus résulteraient de l'activation en cascade des kallibréines et pas simplement de l'action d'une kallibréine particulière. C'est le cas pour la liquéfaction du sperme ou la desquamation. Toutes les kallibréines sont en effet présentes dans le plasma séminal, bien que KLK2, 3 et 11 soient les plus abondantes (Emami et al. 2009; Shaw and Diamandis 2007). Dans la peau, les kallibréines 1 et 4-14 sont co-exprimées (Brattsand and Egelrud 1999; Hansson et al. 1994; Komatsu et al. 2005; Komatsu et al. 2003; Stefansson et al. 2006). Puisque KLK5 peut s'autoactiver et activer KLK6, 7, 11, 12 et 14, elle est considérée comme l'initiatrice de cascades protéolytiques (Michael et al. 2006). Il est important de noter que la plupart des substrats candidats ont été identifiés *in vitro*, aussi les rôles physiologiques ou physiopathologiques proposés relèvent souvent du domaine de l'hypothèse.

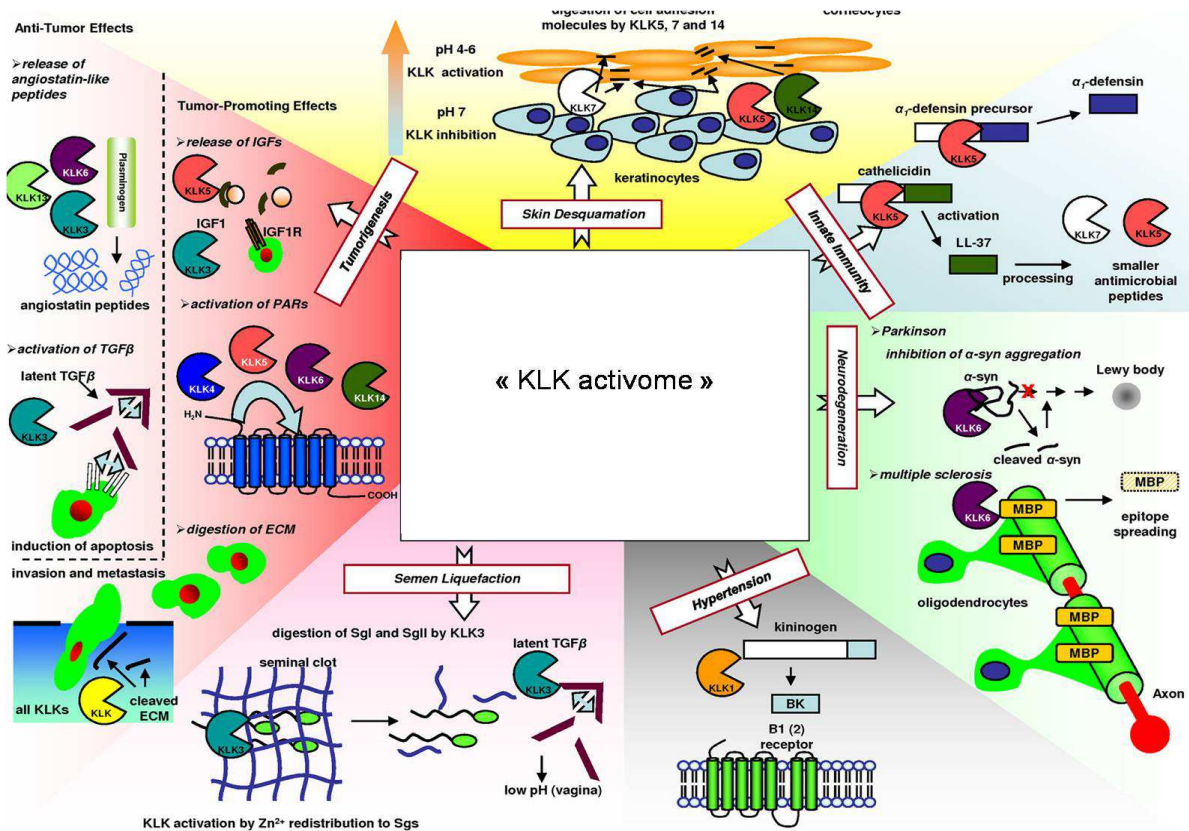


Figure 11 : Substrats et implication des kallitréines dans des processus biologiques.
D'après Sotiropoulou et coll, 2009 (Sotiropoulou et al. 2009)

1. KLK tissulaire et pression sanguine

Le kininogène de faible poids moléculaire a été le premier substrat identifié pour une kallitréine tissulaire. KLK1 est capable de libérer la bradikinine à partir du kininogène de faible poids moléculaire. Ce peptide via une fixation aux récepteurs de la bradikinine B1 et B2 régule alors des mécanismes variés comme la pression sanguine ou des processus inflammatoires (Bhoola et al. 1992; Chao et al. 2004; Clements 1997)

2. KLK et défense immunitaire innée

Des kallitréines tissulaires ont été impliquées dans la défense immunitaire innée via l'activation de peptides antimicrobiens produits par les leucocytes humains et des cellules épithéliales. Ces peptides peuvent tuer une large gamme de microorganismes en rompant leurs membranes. Les principaux peptides antimicrobiens sont les défensines et les cathélicidines (Herr et al. 2007; Teclé et al. 2010). Les défensines sont divisées en deux groupes : les α -

défensines et les β -défensines (Teclé et al. 2010). Les β -défensines 1 et 2 sont des composants constitutifs des cellules épithéliales des voies respiratoires, des leucocytes et des cellules dendritiques, mais elles ne sont pas encore considérées comme des substrats des KLK. En effet, la β -défensine 1 n'est pas clivée par KLK5, 6, 11, 12 ou 13 *in vitro* (Shaw et al. 2008). Les α -défensines 1-4 sont produites par les neutrophiles et leurs précurseurs sont contenus dans les granules azurophiles des neutrophiles. L'obtention de la forme mature de ces défensines implique au moins 3 clivages protéolytiques. KLK5 clive l' α -défensine 1 *in vitro* alors que KLK6, 11, 12 et 13 sont inactifs sur cette défensine (Shaw et al. 2008). L'activité de la cathélicidine est contrôlée par le clivage d'un précurseur : hCAP-18 pour former un peptide mature LL-37 (Herr et al. 2007). Il a été montré que KLK5 et KLK7 étaient capable de générer du LL-37 à partir du précurseur mais aussi de fragmenter LL-37 en peptides antimicrobiens plus petits (Yamasaki et al. 2006).

3. La liquéfaction du sperme

Les séménogélines sont des protéines sécrétées par les vésicules séminales et représentent les principales protéines du sperme humain. Après l'éjaculation les séménogélines I et II et la fibronectine s'agrègent pour former une masse gélatineuse qui est ensuite liquéfiée en 5 à 20 minutes permettant la libération des spermatozoïdes. Le liquide prostatique contient les kalicréines 2, 3, 4, 5, 8, 11, 12, 14, 15 sous une forme inactivée par le zinc (Yousef and Diamandis 2001). Au moment de l'éjaculation, le liquide prostatique se mélange aux fluides épидидymaires et vésiculaires (contenant les séménogélines) pour former le sperme. Lors de cette étape, une dilution du liquide prostatique intervient qui perturberait l'équilibre ion zinc/kalicréines établi au sein du liquide prostatique. Ainsi, les ions zinc se détacheraient des kalicréines pour aller se fixer sur les séménogélines, cette dissociation provoquant l'activation des kalicréines (Jonsson et al. 2005). Plusieurs études ont montré que les protéines KLK2, KLK3 et KLK5 actives étaient capables de cliver les séménogélines I et II et la fibronectine qui composent le coagulum séminal (Brattsand et al. 2004; Deperthes et al. 1996; Lilja 1985; Michael et al. 2005). La protéine KLK3 cliverait majoritairement les séménogélines et aurait une influence mineure dans la dégradation de la fibronectine qui serait de préférence hydrolysée par KLK2.

4. Rôle dans la peau : la desquamation et le syndrome de Netherton

Dans le processus naturel de desquamation, l'épiderme élimine les couches superficielles de cellules cornées ou cornéocytes. Ce processus requiert la présence de protéases de type trypsine et chymotrypsine capables de cliver les protéines des desmosomes, tels que les desmogléines, desmocollines et cornéodesmosine, pour libérer les cornéocytes. KLK5 a été démontré comme pouvant cliver la cornéodesmosine, la desmogléine I et la desmocolline I (Caubet et al. 2004; Descargues et al. 2006), alors que KLK7 peut cliver la cornéodesmosine et la desmocolline I (Caubet et al. 2004; Descargues et al. 2006).

Les kallicroïnes seraient également impliquées dans une maladie de la peau : le syndrome de Netherton, une maladie cutanée caractérisée par une érythrodermie ichtyosiforme congénitale, une anomalie capillaire et des manifestations atopiques (Sun and Linden 2006). En effet, dans la peau, les kallicroïnes sont principalement régulées par l'inhibiteur LEKT1 qui est produit par une protéolyse de SPINK5. Il a été démontré qu'une mutation de SPINK5 cause le syndrome de Netherton (Komatsu et al. 2002), car LEKT1 n'est pas physiologiquement actif et ne peut assurer son rôle de protéine protectrice. Ceci conduit à une augmentation de l'activité enzymatique des kallicroïnes qui dégraderaient d'une manière excessive les protéines des desmosomes dans ce syndrome (Descargues et al. 2005).

5. Les maladies neuro-dégénératives

L'agrégation de protéines et la formation de filament sont la marque de la plupart des maladies neuro-dégénératives. Le rôle physiologique de l' α -synucléine n'est pas encore bien établi, cependant l'accumulation d' α -synucléine dans le cerveau est observée dans la maladie de Parkinson et d'autres pathologies présentant également des corps de Léwy qui sont de petites inclusions (corps étrangers) situées à l'intérieur des neurones. KLK6 est capable de cliver l' α -synucléine dans des cellules en culture. Ce point et le fait que KLK6 soit localisée au niveau des corps de Lewy a conduit à l'hypothèse de son implication dans la maladie de Parkinson et autres α -synucléinopathie (Iwata et al. 2003). Cependant le clivage de l' α -synucléine ne s'effectuerait pas au niveau des corps de Lewy mais dans le milieu extracellulaire (Tatebe et al. 2010).

La myéline est un autre substrat de la KLK6 identifié *in vitro*, ce qui a conduit à suggérer son implication dans des processus de démyélinisation et / ou remyélinisation comme ceux observés dans la sclérose en plaque (Bernett et al. 2002). Cette hypothèse est

soutenue par un certain nombre de données. Ainsi, KLK6 est constamment exprimée dans les sites de démyélination dans des modèles murins de sclérose en plaque et dans des lésions détectées dans les cerveaux de patients humains (Blaber et al. 2004). De plus la concentration de KLK6 était augmentée dans le fluide cérébrospinal de patients atteints de sclérose en plaque à un stade avancé (L.O. Hebb et al. 2010).

6. La régulation de cytokines et de facteurs de croissances

L'interleukine-1 β (IL-1 β) est une cytokine pro-inflammatoire puissante avec des actions pléiotropiques, surtout dans les réponses inflammatoires et immunitaires. L'IL-1 β est produite sous une forme inactive, la pro-IL-1 β qui est activée soit en intracellulaire par la caspase-1 elle-même activée par l'inflammasome (Netea et al. 2010) soit en extracellulaire notamment par des protéases des neutrophiles (Van de Veerdonk et al. 2011). Certaines KLK (7 et 13 en particulier) peuvent activer l'IL-1 β *in vitro* (NylanderLundqvist and Egelrud 1997; Yao et al. 2006).

Les TGF- β (*Transforming Growth Factor β*) forment une famille de cytokines pléiotropiques dans les voies respiratoires. Ce sont des régulateurs importants de quelques réactions inflammatoires et jouent un rôle clé dans la régulation de la réparation et du remodelage tissulaire (Santibañez et al. 2011). Trois membres de la famille des TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3) ont été identifiés chez l'Homme. Le TGF- β est synthétisé sous forme d'un précurseur latent lié de façon non covalente à la protéine LAP (*latency-associated protein*). Ce complexe inactif peut se lier aux protéines de la matrice extracellulaire par l'intermédiaire d'une protéine de liaison au TGF- β (LTBP : *latent-TGF- β -binding protein*). L'activation du TGF- β nécessite la libération de celui-ci des protéines LAP et LTBP par protéolyse ou par changement conformationnel. Les kallicroïnes 1, 2, 3, 5 et 14 peuvent activer le TGF- β en clivant la protéine LAP et/ou la protéine LTBP (Borgoño and Diamandis 2004; Emami and Diamandis 2009).

Les IGF (*Insulin Growth Factor*) (IGF I et II) sont parmi les premiers substrats décrits pour des kallicroïnes tissulaires (Cohen et al. 1992; Réhault et al. 2001). Ce sont d'importants peptides mitogéniques impliqués dans la régulation de la prolifération, de la différenciation, de l'apoptose et de la transformation de cellules saines en malignes. Mais les IGF ne peuvent agir qu'après avoir été libérés de l'IGFBP (*IGF-binding-protein*). Ces IGFBP forment une famille de six protéines qui empêche la fixation des IGF avec leur récepteur IGF-I (IGF-IR).

Plusieurs KLK (KLK1-5, 11 et 14) peuvent cliver les IGF1 et donc baisser leurs affinités pour les IGF. Cette protéolyse permettrait d'augmenter la biodisponibilité de ces facteurs de croissance (Borgoño et al. 2007b; Maeda et al. 2009; Michael et al. 2006; Réhault et al. 2001; Sano et al. 2007).

7. Remodelage matriciel et régulation de récepteurs membranaires

Les kallibréines interviennent également dans le remodelage de la matrice extracellulaire. Plusieurs études ont montré que des composants de la matrice extracellulaires (MEC), tels que le collagène, la fibronectine ou des protéines membranaires comme l'E-Cadhérine sont des substrats directs des kallibréines (Debela et al. 2008; Emami and Diamandis 2007; Johnson et al. 2007; Klucky et al. 2007; Lawrence et al. 2010; Sotiropoulou and Pampalakis 2010). Les KLK seraient également impliquées indirectement dans leur protéolyse via l'activation de protéases comme la pro-uPA et les pro-MMP2 ou pro-MMP9 (Sotiropoulou and Pampalakis 2010).

Les PAR (*Proteinase-Activated Receptor*) sont des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR : *G-protein-coupled-receptors*) particuliers qui sont principalement activés par des protéases à serine et les métalloprotéases matricielles. L'activation des PAR par les KLK a été démontrée par plusieurs travaux (Caliendo et al. 2012; Oikonomopoulou et al. 2006b; Stefansson et al. 2007). KLK2, 4, 5, 6 et 14 activent les PAR (PAR1, PAR2 et PAR4) par un clivage partiel de leur domaine extracellulaire N-terminal. Le segment libéré agit comme ligand en se fixant sur les boucles extracellulaires des PAR. Cette activation des PAR par les KLK résulte en une mobilisation de Ca^{2+} , mais également dans la transduction du signal de ces récepteurs qui jouent un rôle dans l'inflammation ou dans la migration et la prolifération de cellules tumorales (Gratio et al. 2010; Mize et al. 2008; Oikonomopoulou et al. 2010b; Oikonomopoulou et al. 2006a; Oikonomopoulou et al. 2006b; Ramsay et al. 2008; Stefansson et al. 2007). De plus les protéases peuvent agir sur les PAR en les désarmant. En effet, lorsqu'elles clivent le récepteur en amont de la séquence nucléotidique contenant le ligand, l'activation du récepteur ne peut plus s'effectuer (Hollenberg et al. 2008). Ce mode de régulation des PAR par les KLK a très peu été étudié, cependant Oikonomopoulou et collaborateurs ont démontré que les KLK5, 6 et 14 ont la capacité de générer des fragments amenant au désarmement de certains PAR *in vitro* (Oikonomopoulou et al. 2006a).

C. Les kallicroéines dans le poumon

I. Expression des kallicroéines

1. Dans le poumon sain

La présence dans le poumon de membres de la famille des KLK a été rapporté pour la première fois par Christiansen et ses collaborateurs (Christiansen et al. 1987). Ils ont identifié KLK1 dans les lavages broncho-alvéolaires de patients asthmatiques. D'autres études confirmèrent plus tard la présence de KLK1 dans les granules des cellules séreuses des glandes sous-muqueuses de la trachée et des bronches (Poblete et al. 1993; Proud and Vio 1993). Durant la dernière décennie, plusieurs études ont examiné l'expression des KLK dans le tissu sain pulmonaire en utilisant des techniques de RT-PCR, d'ELISA ou d'IHC (tableau n°4).

Ces études ont montré qu'il existait une expression faible ou modérée de la plupart des membre de la famille des KLK dans le poumon, à l'exception de *KLK2*, *4* et *15*. La distribution tissulaire de plusieurs KLK (*KLK5*, *6*, *7*, *10-14*) a aussi été examinée par immunohistochimie (Petraki et al. 2003; Petraki et al. 2002; Petraki et al. 2001; Petraki et al. 2006; Planque et al. 2008a). L'expression de ces huit kallicroéines a été observée dans l'épithélium de la trachée et de l'arbre bronchique, dans les glandes sous-muqueuses, alors que l'épithélium alvéolaire a été trouvé négatif. Ainsi, l'expression des KLK semble limitée aux structures supérieures du poumon sain et ces mêmes structures (épithélium de surface de l'arbre bronchique et les glandes sous-muqueuses des bronches) produisent simultanément plusieurs KLK. Puisque ces structures émettent leurs sécrétions dans la lumière des voies respiratoires, les KLK sont probablement des composants du fluide bronchique. La présence de KLK1 et KLK11 dans les lavages broncho-alvéolaires et les expectorations confirme cette hypothèse (Christiansen et al. 1987; Nicholas et al. 2006).

Kallicréine	Localisation	Référence
1	Présence de KLK1 dans les glandes sous muqueuses de la trachée et des bronches par IHC	(Poblete et al. 1993; Proud and Vio 1993)
2	Faible expression dans la trachée (RT-PCR), pas d'expression dans les tissus pulmonaire (RT-PCR ; ELISA)	(Olsson et al. 2005; Shaw and Diamandis 2007)
3	Faible expression de KLK3 (ELISA, RT-PCR)	(Shaw and Diamandis 2007)
4	Pas d'expression (PCR, IHC et ELISA)	(Seiz et al. 2010; Shaw and Diamandis 2007)
5	Exprimé (qRT-PCR, WB, IHC et ELISA)	(Petraki et al. 2006; Planque et al. 2005; Shaw and Diamandis 2007)
6	Expression dans l'épithélium bronchique (IHC, qRT-PCR)	(Heuzé-Vourc'h et al. 2009; Petraki et al. 2001)
7	Expression observée dans le poumon sain par qRT-PCR, WB et ELISA	(Planque et al. 2005; Shaw and Diamandis 2007)
8	Expression détectée par qRT-PCR	(Planque et al. 2010; Sher et al. 2006)
9	Faible expression des ARNm	(Shaw and Diamandis 2007)
10	Détection par qRT-PCR et ELISA dans les tissus pulmonaires. Détection dans l'épithélium bronchique par IHC.	(Luo et al. 2001; Petraki et al. 2002; Planque et al. 2006)
11	Détection dans l'épithélium bronchique (IHC, ELISA, qRT-PCR)	(Petraki et al. 2006; Planque et al. 2006; Shaw and Diamandis 2007)
12	Détection dans le tissu pulmonaire (qRT-PCR)	(Guillon-Munos et al. 2011)
13	Détection dans l'épithélium bronchique (IHC, qRT-PCR)	(Petraki et al. 2003; Planque et al. 2008a)
14	Détection dans l'épithélium bronchique (IHC, qRT-PCR)	(Petraki et al. 2006; Planque et al. 2008a)
15	Non exprimé dans le poumon	(Shaw and Diamandis 2007)

Tableau 4 : Profil d'expression des kallicréines tissulaires dans le poumon sain

2. Dans le cancer du poumon

De nombreuses études ont révélé l'expression de plusieurs kallicréines tissulaires dans une grande variété de carcinomes et des données multiples indiquent une implication de ces

protéases dans la progression cancéreuse (Avgeris et al. 2010; Borgoño and Diamandis 2004; Borgoño et al. 2004; Paliouras et al. 2007). Le nombre d'étude effectuées sur le cancer du poumon est encore limité (tableau n°5) cependant elles ont permis de mettre en évidence des dérégulations de certaines KLK.

Kallicréine	Localisation	Références
1	Détection dans le cytoplasme dans 53-80% des cellules de CBNPC et CBPC. Détection nucléaire dans 20-30% des cellules de CBNPC et CBPC	(Chee et al. 2008)
2	Pas d'expression dans les CBNPC	(Planque et al. 2008b)
3	Expression de l'ARNm dans environ 60% des spécimens de CBNPC.	(Zarghami et al. 1997)
4	Pas de différence entre les patients atteints de CBNPC et les individus sains	(Planque et al. 2008b)
5	Expression de l'ARNm dans 93% des CBNPC	(Planque et al. 2005)
6	L'ARNm est surexprimé dans les CBNPC et un fort est associé à un pronostic défavorable. Localisation cytoplasmique dans 70-90% de cellules cancéreuses de carcinome épidermoïde, de tumeurs carcinoïdes et les CBPC	(Heuzé-Vourc'h et al. 2009) (Singh et al. 2008)
7	L'ARNm est exprimé dans 100% de spécimens malins. L'expression diminue dans les adénocarcinomes. Localisation cytoplasmique dans 40, 70 et 90% des cellules cancéreuses de carcinomes épidermoïdes, de tumeurs carcinoïdes et de CBPC respectivement. Fortement localisée dans le noyau des tumeurs carcinoïdes	(Planque et al. 2005) (Singh et al. 2008)
8	Les patients avec une expression élevée de <i>KLK8</i> aux stades précoces ont peu de risque de récurrence. L'activité de <i>KLK8</i> augmente dans les CBNPC mais n'est pas associée à un pronostic. Le variant alternatif <i>KLK8-T4</i> est un marqueur indépendant d'un pronostic défavorable. Détection cytoplasmique dans 60-90% des cellules cancéreuses (carcinomes épidermoïdes, tumeurs carcinoïde et CBPC)	(Sher et al. 2006) (Planque et al. 2010) (Singh et al. 2008)
9	Non étudié	
10	L'ARNm est sous-régulé dans 43% des CBNPC. Une forte expression est associée aux carcinomes épidermoïdes. Sous-régulation dans 57% des patients atteints de CBNPC due à l'hyperméthylation des îlots CpG	(Planque et al. 2006) (Zhang et al. 2009)
11	L'expression des ARNm diminue dans tissus tumoraux de CBNPC en comparaison aux tissus sains adjacents. L'expression est diminuée pour environ 40% de patient atteints de CBNPC	(Planque et al. 2006; Sasaki et al. 2006) (Planque et al. 2008b)
12	Sur-régulation dans les CBNPC	(Guillon-Munos et al. 2011)
13	Augmentation de l'expression dans environ 1/3 des patients de CBNPC et diminution dans environ 1/3 des patients. Une surexpression de l'ARNm est corrélée avec une diminution de la survie. Une détection cytoplasmique est présente dans 68% des spécimens de CBNPC et est associée aux adénocarcinomes. Augmentation des transcrits dans les métastases d'adénocarcinome pulmonaire	(Planque et al. 2008a) (Chou et al. 2011)
14	Dans les CBNPC, l'expression augmente pour 1/3 des patients et diminue pour 1/3.	(Planque et al. 2008a)
15	Non étudié	

Tableau 5 : Profil d'expression des kallicréines dans le cancer du poumon.

Onze gènes (*KLK1, 3, 5-8, 10-14*) sont exprimés dans le cancer du poumon. La plupart des études concernent les CBNPC, peu les CBPC. Cependant, *KLK 1, 5, 6, 7 et 8* ont été détectées par immunohistochimie dans des spécimens de patients atteints de CBPC (Chee et al. 2008; Singh et al. 2008). En général les *KLK* sont détectées dans le cytoplasme des cellules tumorales des deux types de cancer. Ceci étant en adéquation avec le fait que les kallicroïnes sont des enzymes secrétées. Une présence nucléaire de *KLK1, 5, 7 et 8* a néanmoins été observée avec des proportions variables dans des cellules malignes de quelques sous-types de cancer du poumon (Chee et al. 2008; Singh et al. 2008), cependant la signification biologique de cette localisation reste inconnue. Quelquefois des kallicroïnes ont été détectées dans les cellules stromales localisées à la périphérie des nodules tumorales (Planque et al. 2008a).

Le niveau d'expression des ARNm, *KLK6, 8, et 12* est clairement augmenté dans les tissus de cancer du poumon non à petites cellules en comparaison aux tissus sains adjacents. Un taux élevé de *KLK6* est associé à un pronostic défavorable à l'inverse des patients ayant un taux élevé de *KLK8* dans les stades précoces qui ont une durée de vie plus longue que les patients ayant un faible taux (Heuzé-Vourc'h et al. 2009; Sher et al. 2006). Il est bien connu que les CBNPC sont des cancers hétérogènes et les analyses génétiques et moléculaires ont révélé des différences au sein des sous-groupes. Des efforts sont donc nécessaires pour examiner l'expression des *KLK* en lien avec les mutations importantes découvertes dans ces sous groupes de CBNPC (Petersen. 2011; Sanders and Albitar. 2010).

Les données cliniques et pré-cliniques montrent que les *KLK* n'ont pas le même rôle dans la carcinogénèse. Ces protéases favorisent ou inhibent la progression tumorale selon le type de tissu et le microenvironnement tumoral (Borgoño and Diamandis 2004; Emami and Diamandis 2007; Sotiropoulou et al. 2009). Dans le poumon *KLK6* et *KLK13* favoriseraient la progression tumorale alors que *KLK8* et *KLK10* agiraient comme des inhibiteurs (Chou et al. 2011; Heuzé-Vourc'h et al. 2009; Sher et al. 2006; Zhang et al. 2009). Des études récentes montrent que les *KLK* peuvent contribuer à la progression des CBNPC en régulant la prolifération des cellules cancéreuses. Le cycle des cellules de CBNPC produisant de la *KLK6* est accéléré entre la phase G1 et S. Ceci était accompagné d'une augmentation d'expression de la cycline E et de c-myc et d'une diminution de p21 (Heuzé-Vourc'h et al. 2009). A l'inverse *KLK10* supprime la prolifération cellulaire *in vitro* et *in vivo* (Zhang et al. 2009). Ce rôle suppresseur de tumeur est en adéquation avec des résultats cliniques montrant que l'expression de *KLK10* est fréquemment diminuée dans les CBNPC (Planque et al. 2006;

Zhang et al. 2009). KLK8 a aussi un rôle suppresseur dans les stades précoces des CBNPC (Sher et al. 2006). Une surexpression de KLK8 diminue le potentiel invasif de cellules de CBNPC *in vitro* ainsi que la croissance tumorale et l'invasion cellulaire *in vivo*. Ces effets ont été attribués en partie à la dégradation de la fibronectine par KLK8. D'autres études indiquent que les kalicréines peuvent participer à la formation de métastases en facilitant le détachement des cellules tumorales, la mobilité cellulaire et en participant à l'invasion au travers de la matrice extracellulaire. Par exemple, KLK13 est capable d'induire l'expression de la N-Cadhérine, une molécule d'adhésion cellulaire, dans les cellules de CBNPC. Il a été démontré que cette molécule était capable de faciliter l'invasion et la migration transendothéliale des cellules malignes en se fixant aux cellules endothéliales. De plus, KLK13 faciliterait le comportement invasif et métastatique des cellules tumorales pulmonaires *in vitro* et *in vivo* en dégradant la laminine, un composant de la MEC (Chou et al. 2011).

Plusieurs kalicréines seule ou en combinaison sont des biomarqueurs prometteurs pour certains cancers (Avgeris et al.2010; Paliouras et al. 2007). Le nombre limité de patients examinés jusqu'à lors ne permet pas de déterminer si les kalicréines pourraient constituer des marqueurs du cancer du poumon, cependant quelques études ont révélé des candidats potentiels. Par exemple, Bhattacharjee et coll ont analysé 12600 transcrits de 186 tumeurs pulmonaires afin d'effectuer différents sous-groupes. Ils ont montré une surexpression des transcrits de KLK11 dans les adénocarcinomes du sous-groupe nommé C2 qui sont des tissus tumoraux ayant des caractéristiques neuroendocriniennes. Cette surexpression a été associée avec un pronostic de survie inférieur à la moyenne (Bhattacharjee et al. 2001). De façon similaire, une forte expression des ARNm de KLK6 et du variant alternatif de type 4 de KLK8 a été identifié comme des indicateurs indépendants d'un pronostic défavorable dans les CBNPC (Heuzé-Vourc'h et al. 2009; Planque et al. 2010). Enfin, plusieurs kalicréines, KLK7, 8 et 12-14, ont été proposées comme marqueurs sériques potentiels du cancer du poumon. La combinaison de plusieurs KLK (KLK4, 8, et 10-14) pourraient favoriser la détection de ce cancer (Planque et al. 2008b).

II. Mécanismes possibles de dérégulation des kallibréines dans le cancer du poumon

Peu d'études ont examiné les mécanismes pouvant expliquer la dérégulation des kallibréines dans le cancer du poumon. Cependant, il est possible que quelques mécanismes de régulation analysés dans d'autres contextes physiologiques/pathologiques interviennent également dans le poumon. Les paragraphes suivants examinent les données connues pouvant soutenir de telles interventions.

1. Contrôle de la transcription des gènes des kallibréines

Des altérations génomiques ont été observées au locus 19q13 dans le cancer du poumon et ont été associées à un pronostic défavorable (Kim et al. 2005). Il est envisageable que ces réarrangements situés dans la région chromosomique des *KLK* puissent affecter ces gènes et contribuer à leurs dérégulations dans le cancer du poumon. L'expression des *KLK* pourrait aussi être régulée par la méthylation de l'ADN. Ainsi, le gène *KLK10* est hautement méthylé dans des échantillons de tissus de CBNPC, ce qui n'est pas le cas des tissus sains. La méthylation de l'exon 3 de *KLK10* a été associée à un faible taux du transcrit (Zhang et al. 2009). *KLK13* est régulé par méthylation dans des lignées cellulaires de cancer du poumon et pourrait donc l'être également dans les tissus. Ainsi une hypométhylation de ce gène en phase tardive du CBNPC pourrait expliquer l'augmentation de l'expression de *KLK13* observée alors (Chou et al. 2011; Planque et al. 2008a).

Comme nous l'avons vu précédemment, les hormones stéroïdiennes sont des régulateurs des gènes *KLK* dans différents organes. Des données récentes indiquent que des hormones sexuelles, notamment les hormones sexuelles femelles, pourraient jouer un rôle dans les CBNPC. Ainsi, le cancer du poumon est plus répandu chez les femmes n'ayant jamais fumé que chez les hommes non fumeurs (Yano et al. 2011). Par ailleurs, l'aromatase, enzyme clé de la synthèse d'œstrogène, est présente dans les CBNPC (Miki et al. 2010; Siegfried et al. 2009), et les femmes avec une forte concentration en aromatase ont un taux de survie plus faible (Verma et al. 2011). De plus, environ 73% des CBNPC des hommes et des femmes ont une forte concentration en œstradiol dans la tumeur en comparaison au tissu sain (Niikawa et al. 2008). Les cellules cancéreuses pulmonaires produisent donc leurs propres œstrogènes (Verma et al. 2011). Enfin, des récepteurs aux œstrogènes (ER α et ER β) ont été détectés au niveau nucléaire et cytoplasmique dans la plupart des CBNPC (Marquez-Garban et al. 2011;

Siegfried et al. 2009) et l'administration d'œstrogènes stimule l'expression de gènes oestrogène-dépendants et la prolifération de cellules tumorales pulmonaires (Hershberger et al. 2005; Stabile et al. 2002).

Le récepteur à la progestérone (PR) a souvent été détecté dans des échantillons de patients de CBNPC, principalement dans le noyau. Sa présence est associée à de meilleurs pronostics cliniques. La prolifération des cellules de CBNPC positives au PR est inhibée avec la progestérone de manière dose-dépendante *in vitro* et *in vivo* (Ishibashi et al. 2005). Le récepteur des androgènes (AR) est quant à lui présent dans le poumon adulte, principalement dans l'épithélium bronchique et les pneumocytes de types II. Plusieurs types de NSCLC ont des récepteurs aux androgènes, particulièrement les carcinomes épidermoïdes (Mikkonen et al. 2009).

En résumé, alors que le poumon n'était pas considéré comme un organe cible des stéroïdes sexuels, des découvertes récentes indiquent que ces hormones pourraient influencer la biologie du cancer du poumon humain. Leur implication dans la régulation des gènes des kallitréines mériterait donc d'être analysée.

La tumorigénèse et la progression du cancer du poumon dépendent d'un ensemble de voies de signalisation interconnectées contrôlant l'expression de facteurs de transcription. Les plus étudiées dans le cancer du poumon sont les voies de signalisation Ras/Raf/MAPK, la voie de signalisation phosphatidyl-inositol 3-kinase (PI3K), et la voie de la phospholipase C/proteine kinase C (Pallis et al. 2010). Quelques facteurs de transcription ciblés par ces voies contribuent probablement au contrôle de la transcription des gènes des *KLK* dans le cancer du poumon. Ainsi des liens entre les voies de signalisation RAS/MEK/ERK et PI3K/AKT et l'activation de *KLK3*, *KLK10* ou *KLK11* ont été rapportés dans les cancers de la prostate et du sein (Bakin et al. 2003; Paliouras and Diamandis 2008a; Paliouras and Diamandis 2008c). De façon similaire, l'activation de la voie RAS a été associée à une sur-régulation de *KLK6* dans le cancer du colon (Henkhaus et al. 2008). Finalement plusieurs études ont montré qu'une grande variété de facteurs de transcription se fixe aux promoteurs des gènes de kallitréines et régule leurs expressions (Dong et al. 2008; Lawrence et al. 2010; Paliouras and Diamandis 2008c).

2. Contrôle post-traductionnel de la fonction des KLK

Comme il déjà été décrit précédemment, l'activation des KLKs fait intervenir des endoprotéases et des cascades d'activation impliquant les KLKs ont été proposées dans différents tissus. (Borgoño et al. 2004; Emami and Diamandis 2007). La présence simultanée de plusieurs kalicréines dans les tissus sains et cancéreux pulmonaires nous amène à penser qu'il pourrait exister des cascades d'activation similaires dans le tissu pulmonaire et/ou dans le fluide bronchique.

Les inhibiteurs des KLK pulmonaires ne sont pas connus mais plusieurs antiprotéases intervenant dans d'autres tissus sont présentes dans cet organe. Les SERPINE, notamment l'alpha1-antitrypsine (1-AT), sont les principaux inhibiteurs de protéases dans le poumon (Askew and Silverman 2008) et les individus avec une déficience héréditaire en 1-AT ont des risques accrus de développer des maladies pulmonaires comme l'emphysème (Gooptu et al. 2009). Cette SERPINE est capable de contrôler l'activité de plusieurs kalicréines, spécialement KLK4 et KLK7 (Goettig et al. 2010). D'autres SERPINE aptent à moduler l'activité des KLK, comme PAI1 (*Plaminogen Activator Inhibitor*), l'ATIII (Antithrombine III), le PCI (*Peptidase C Inhibitor*) sont également présentes dans le poumon sain et malade (Askew and Silverman 2008) et pourraient y jouer un rôle régulateur sur les KLKs. Pour l'instant, le statut pulmonaire des inhibiteurs de type kazal est inconnu. La bikunine qui est un des deux inhibiteurs de type Kunitz des KLK a été détectée dans les cellules environnant les nodules tumaux et dans les cellules cancéreuses hautement différenciées de CBNPC (Bourguignon et al. 1999). Il a été montré qu'une déficience en bikunine chez la souris provoquait une augmentation de la fréquence des métastases pulmonaires (Yagy et al. 2006).

D'autres facteurs, comme la compartimentation, pourraient jouer un rôle majeur dans le contrôle de l'activité des KLK dans le poumon. Ainsi, le glycosaminoglycane hyaluronique (HA) peut immobiliser de la KLK1 mature sous forme inactive à la surface épithéliale et à l'intérieur de la lumière des glandes sous-muqueuses. Cette action créerait un réservoir de KLK1 potentiellement mobilisable à la surface des voies respiratoires. En effet, La dépolymérisation de l'HA par les espèces réactives oxygénées (ROS : *Reactive oxygen species*) entraîne une augmentation importante de l'activité de KLK1 et l'activation des voies de signalisation cellulaire contrôlées par cette protéase (Casalino-Matsuda et al. 2004). Ce phénomène d'immobilisation/mobilisation pourrait être responsable de l'augmentation de

l'activité de KLK1 observée dans les voies respiratoires lors de pathologies pulmonaires associées à une production de ROS.

III. Les cibles potentielles des KLK dans le cancer du poumon

1. Les substrats impliqués dans la défense de l'hôte

L'épithélium respiratoire constitue une barrière physique vis-à-vis des particules inhalées et des pathogènes. Ce mode de protection est accentué par une couche de mucus qui recouvre l'épithélium respiratoire de surface depuis les voies aériennes supérieures jusqu'aux bronchioles terminales. Les particules inhalées sont piégées dans la couche de mucus et seront entraînées, grâce aux mouvements ciliaires engendrés par les cellules ciliées, jusqu'au pharynx où elles seront dégluties, ce phénomène s'appelle la clairance mucociliaire. Les composants majeurs du mucus normal sont les mucines, des macromolécules hautement glycosylées, qui sont sécrétées ou fixées à la membrane (Thornton et al. 2008). Dans l'appareil respiratoire humain inférieur, l'expression d'au moins 12 gènes de mucines a été observée en ARNm dans les tissus de patients sains, mais MUC2, MUC4, MUC5AC et MUC5B sont surexprimés chez les patients de maladies pulmonaires chroniques ou dans le cancer du poumon (Evans et al. 2009; Thai et al. 2008). Shaw et Diamandis ont démontré que KLK5 et KLK12, deux kallicroïnes retrouvées dans le poumon, clivent MUC4 et MUC5B. Au contraire, KLK6, KLK11 et KLK13 ne dégradent pas ces mucines (Shaw et al. 2008). Ceci soulève la question de l'intervention de kallicroïnes dans le remodelage de la couche de mucus lors des pathologies respiratoires. Les mucines capturent également les molécules biologiquement actives, certaines d'entre elles sont surexprimées dans les adénocarcinomes pulmonaires et sont associées à la tumorigénèse (dos Santos Silva et al. 2000; Hollingsworth and Swanson 2004; Radloff et al. 2011). De plus les mucine fixées à la membrane comme MUC4 peuvent activer certains récepteurs de tyrosine kinase ErbB, soit directement ou en exposant un domaine EGF-like (Evans and Koo 2009; Hollingsworth and Swanson 2004). Le clivage des mucines par des KLK pourrait donc moduler la disponibilité de facteurs sécrétés ou réguler des voies de signalisation.

Dans le poumon sain, le précurseur de la cathélicidine, hCAP-18 est produit par des cellules inflammatoires, les cellules épithéliales respiratoires et les glandes sous-muqueuses. KLK5 et KLK7 sont également produites à ces endroits et sont probablement impliquées dans

le clivage de hCAP-18 des voies respiratoires. Le précurseur hCAP-18 et le peptide mature formé après son clivage, LL-37 sont également produits par les cellules cancéreuses pulmonaires et plusieurs études ont montré que LL-37/hCAP-18 activent les cellules tumorales entraînant la croissance cellulaire (von Haussen et al. 2008; Wu et al. 2010). Ainsi les kalllicréines sont susceptibles de contribuer à la progression du cancer du poumon en clivant hCAP-18 en LL-37, lequel agirait alors comme un facteur de croissance autocrine libéré des cellules épithéliales tumorales pulmonaires.

LL-37 n'est pas le seul peptide antimicrobien capable d'activer les cellules cancéreuses épithéliales pulmonaire. L'alpha-défensine 1 stimule également la prolifération des cellules cancéreuses pulmonaires humaines *in vitro*, cependant cet effet est encore controversé (Aarbiou et al. 2002; Xu et al. 2008).

2. Les cytokines et les facteurs de croissances

a) L'Interleukine-1 β

Un des substrats potentiel des kalllicréines 7 et 13 est l'IL-1 β qui peut être activée *in vitro* par ces protéases (NylanderLundqvist and Egelrud 1997; Yao et al. 2006). Dans le poumon, L'IL-1 β joue un rôle dans la réparation des cellules épithéliales et la sécrétion de mucine (Crosby and Waters 2010; Fujisawa et al. 2009). L'IL-1 β a également été détectée dans les tumeurs humaines pulmonaires, où sa concentration est significativement plus élevée que la normale (Colasante et al. 1997; Landvik et al. 2009). La sécrétion d'IL-1 β est souvent stimulée lors de la progression tumorale pulmonaire dans des modèles expérimentaux et chez les patients cancéreux où elle est souvent associée à un mauvais pronostic (Apte and Voronov 2008). C'est également le cas de KLK13 (Chou et al. 2011; Planque et al. 2008a), il semble donc envisageable que l'activation de l'IL-1 β par KLK13 puisse contribuer à la progression tumorale pulmonaire. L'IL-1 β stimule la progression tumorale et les métastases des NSCLC via différents mécanismes. Elle induit l'invasion tumorale en stimulant la synthèse de protéases (Cho et al. 2011). Elle peut aussi contribuer à l'angiogenèse via la production d'IL-8 et de TGF- β 1 dépendante de l'IL-1 β dans les cellules de CBNPC (Colasante et al. 1997).

b) La famille des TGF- β (Transforming growth factor beta)

Nous avons vu précédemment que les kalllicréines 1, 2, 3, 5 et 14 peuvent activer le TGF- β en clivant la protéine LAP et/ou la protéine LTBP. Lorsque le TGF- β est activé, il agit par

l'intermédiaire des récepteurs au TGF- β de type I (TGF- β 1R) et de type II (TGF- β 2R) qui sont présents dans le poumon (Camoretti-Mercado and Solway 2005; Santibañez et al. 2011). Le TGF- β peut aussi interagir avec les protéines de la MEC de la famille des CCN, lesquelles servent de protéines chaperonnes pour améliorer la présentation du TGF- β 1 au récepteur du TGF- β (Abreu et al. 2002). Plusieurs tumeurs, y compris celles du poumon, contiennent de fortes concentrations de TGF- β et cette concentration est corrélée avec la progression tumorale et le pronostic clinique. La concentration plasmatique de TGF- β est élevée pour toutes les formes de cancers du poumon (Toonkel et al. 2010). Le TGF- β peut agir comme suppresseur de tumeur dans les stades précoces, en vertu de son effet d'inhibiteur de croissance sur les cellules épithéliales pulmonaire (Colasante et al. 1997; Santibañez et al. 2011). Cependant, les cellules cancéreuses pulmonaires peuvent s'échapper de cette action suppressive (Toonkel et al. 2010). De façon paradoxal, le TGF- β devient alors un facteur pro-oncogénique qui stimule la croissance cellulaire et l'invasion dans les stades tardifs du cancer en stimulant la production de facteurs de croissance mitogéniques autocrines, la transition épithélio-mesenchymateuse (TEM), la génération de myofibroblaste, la néoangiogenèse et en aidant les cellules cancéreuses à échapper à la surveillance immunitaire (Santibañez et al. 2011). Dans ce contexte, la possibilité d'une implication des KLKs dans le contrôle de la biodisponibilité du TGF- β pulmonaire mériterait d'être examinée avec soin.

c) Les composants de l'axe de l'IGF (Insulin-like Growth Factor)

Certains composants de l'axe de l'IGF joueraient un rôle important dans la physiopathologie pulmonaire. Une forte concentration sérique d'IGF-1 est un facteur de risque pour le cancer du poumon, et les cellules épithéliales des voies respiratoires produisent les IGF de façon autocrine, entraînant l'activation de l'IGF-IR (Kim et al. 2011a; Kim et al. 2011c). Il a aussi été montré qu'une surproduction de l'IGF-IR dans le poumon induit le développement et la progression tumorale pulmonaire. Par ailleurs, l'IGFBP-3 a été décrite comme agissant en tant que suppresseur de la croissance tumorale et de l'angiogenèse par deux mécanismes, IGF-dépendant et indépendant (Kim et al. 2011a; Kim et al. 2011c). Comme nous l'avons vu, cette IGFBP est une cible de plusieurs KLK (KLK5, 11 et 14) présentes dans le tissu pulmonaire tumoral. Certaines actions des KLKs pourraient donc passer par un contrôle de l'axe des IGF.

3. Substrats membranaires et pericellulaires

Le rôle des kallibréines dans le remodelage tissulaire peut probablement se produire dans le poumon car ce tissu contient ces enzymes et leurs substrats. Plusieurs études récentes le montrent que les KLKs agissent sur des constituants de la matrice extracellulaire. Sher et ses collaborateurs ont révélé que KLK8 modifie le microenvironnement extracellulaire dans les CBNPC en clivant la fibronectine. Cela supprime la voie de signalisation des intégrines et retarde la motilité cellulaire en inhibant la polymérisation de l'actine (Sher et al. 2006). KLK13 peut également dégrader la laminine, ce qui faciliterait à l'inverse la migration et l'invasion de cellules NSCLC (Chou et al. 2011).

Les récepteurs PAR sont, comme nous l'avons vu, activables par des kallibréines. Par contre, il n'existe que très peu d'études sur le rôle des PAR dans le cancer du poumon. Une forte concentration en PAR1 est accompagné d'un phénotype agressif et d'un mauvais pronostic chez les patients de CBNPC (Cisowski et al. 2011). Il existe également une corrélation entre l'expression de PAR1 et le VEGF dans les tissus de cancer du poumon humain (Ghio et al. 2006). L'activation de PAR1 a été associée avec une augmentation de la motilité de cellules cancéreuses pulmonaires et de l'angiogenèse via la stimulation de la production de VEGF dans des tumeurs pulmonaires humaines implantées chez des souris nues (Cisowski et al. 2011). La stimulation de PAR2 dans une lignée cellulaire de cancer du poumon (A549) a permis la libération de médiateurs pro-inflammatoires, incluant PGE2, l'IL-6 et l'IL-8 (Moriyuki et al. 2009). L'IL-8 est connu pour induire des réponses angiogéniques dans les cellules endothéliales, d'augmenter la prolifération et la survie de cellules endothéliales et cancéreuses et facilite la migration des cellules cancéreuses (Waugh and Wilson 2008).

Matériels et Méthodes

I. La culture cellulaire : les cellules, leurs conditions et leurs milieux de culture

Dans le cadre de la thèse, différentes lignées cellulaires ont été utilisées. Les cellules HEK et A549, mais nous avons également effectués des transfections stables sur ces lignées parentales afin qu'elles expriment la kallistéine 6. Toutes les cellules ont été cultivées à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂ dans l'air.

➤ La lignée cellulaire HEK 293 (*Human Embryonic Kidney*) parentale

Il s'agit d'une lignée adhérente de cellules embryonnaires de rein humain (ATCC) transformées par l'adénovirus de type 5. Le milieu de culture D-MEM concentré en glucose (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* ; 4500 mg/ml de glucose, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) était additionné de L-Glutamine à 2 mM et de 1% de pénicilline/streptomycine (PS) à 100µg/ml. Selon les expériences le milieu était additionné ou non de 10% de sérum de veau foetal (SVF, Lonza, Saint Beauzire, France).

➤ La lignée cellulaire A549 parentale

Elle a été établie à partir de cellules d'un carcinome bronchiolo-alvéolaire prélevé chez un homme caucasien de 58 ans (ATCC). Le milieu de culture est le milieu RPMI (Invitrogen) supplémenté de L-Glutamine à 2mM et de 1% de pénicilline/streptomycine (PS) à 100µg/ml. Comme les cellules HEK, selon les expériences le milieu était additionné ou non de 10% de Sérum de Veau Foetal (ATGC, France).

➤ Les cellules HEK Flp-In et A549 Flp-In

Les cellules HEK Flp-In proviennent du fournisseur Invitrogen (Cergy-Pontoise, France), tandis que les cellules A549 Flp-In ont été développées au préalable au sein du laboratoire. Les cellules Flp-In dérivent de leurs cellules parentales suite à l'intégration à un locus génomique unique, d'une cassette contenant un site FRT (*flp-In Recombination Target*). Ce site FRT constitue le site de reconnaissance de la recombinaise Flp de levure qui est capable d'induire une recombinaison homologue entre deux exemplaires d'un tel site. Ainsi, l'introduction simultanée d'un gène situé dans un vecteur d'expression portant un site FRT et de la recombinaise (codée par le vecteur pOG44) aboutit à l'intégration dirigée du transgène au locus cellulaire où se trouve intégré l'autre exemplaire du site FRT. Elles ont été cultivées

dans le même milieu de culture que leurs cellules parentales cependant celui-ci a été additionné de zéocine à 100 µg/ml (Cayla Invivogen, Toulouse, France).

Tous ces milieux seront appelés par la suite milieu complet. Cependant il est à noter que lors des expériences, le milieu de culture des cellules A549 Flp-In et HEK Flp-In était dépourvu de zéocine.

II. Obtention de lignées sur-exprimant la proKLK6

1. Préparation d'ADN contenant le transgène codant proKLK6

Deux constructions plasmidiques ont été réalisées, l'une codant la proKLK6 sauvage, l'autre codant la proKLK6 mutée. La première a été réalisée au préalable au sein du laboratoire. Elle correspond à l'introduction de la séquence codant la préproKLK6 avec son codon STOP dans le vecteur d'expression eucaryote pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO[®] (plasmide NH201410.04) (Invitrogen). La séquence de la forme mutée a également été réalisée au préalable au sein de l'équipe, l'insertion de cette séquence dans le plasmide pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO[®] s'est effectuée à l'aide du système « TOPO Cloning » d'Invitrogen. Pour cela, 1µl de la séquence de KLK6 mutée a été mélangé avec 1 µl de solution saline, 1µl de vecteur et 3 µl d'eau stérile. Puis le mélange a été incubé pendant 5 minutes à température ambiante. Avant utilisation pour la transfection cellulaire, l'insertion du gène dans l'insert a été vérifiée en deux étapes. Premièrement, une digestion du plasmide a été effectuée avec 0,5 µl d'enzyme de restriction AccI (New England Biolab, Evry, France) qui ont été incubés pendant plusieurs heures à 37°C avec 5 µl d'ADN plasmidique, 2µl de tampon de réaction de l'enzyme AccI (New England Biolab) et 12,5 µl d'eau stérile. Deuxièmement un séquençage du plasmide a été effectué par Eurofins, mwg Operon (Ebersberg, Allemagne). La construction plasmidique du gène de la KLK6 mutée est numérotée NM012909.08.

L'amplification des plasmides a été effectuée à l'aide des bactéries E. Coli TOP10 (Invitrogen) qui ont été transformées avec le plasmide selon les recommandations du fournisseur. Brièvement, 10 pg à 100 ng de plasmide ont été déposés dans le tube « One Shot TOP10 » contenant les bactéries. Le mélange a été incubé pendant 30 minutes dans la glace, puis un choc thermique de 30 secondes à 42°C a été effectué. Les bactéries ont ensuite été replacées dans la glace pendant 2 minutes puis 250 µl de milieu S.O.C (Invitrogen) préchauffé à 37°C ont été rajoutés et les bactéries ont été placées à 37°C sous agitation pendant 1h. Les

bactéries ont ensuite été étalées sur une boîte de pétri contenant du milieu Luria Bertani (LB) Agar additionné de 100µg/ml d'ampicilline, et mises en culture sur la nuit à 37°C. Le plasmide possédant un gène de résistance à l'ampicilline, seules les bactéries ayant intégré le plasmide ont pu former des colonies qui ont été placées le lendemain dans 2 ml puis dans 100 ml de milieu LB additionné de 100µg/ml d'ampicilline et cultivées à 37°C sur la nuit. L'ADN plasmidique a ensuite été extrait en utilisant le kit QIAGEN® Plasmid Purification (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les recommandations du fournisseur. Cette technique repose sur une minilyse alcaline des bactéries, suivie d'une purification de l'ADN plasmidique sur une membrane de silice, puis d'une élution. Après précipitation à l'isopropanol, le culot contenant l'ADN plasmidique a été repris dans de l'eau stérile dépourvue de nucléase (Ambion®, Courtaboeuf, France).

Afin de déterminer la quantité d'ADN plasmidique extrait, une mesure spectrophotométrique a été réalisée. Pour cela, l'ADN plasmidique a été dilué au 1/100^{ème} dans de l'eau stérile dépourvue de nucléase. La densité optique a ensuite été mesurée à 260 et 280 nm avec un spectrophotomètre Eppendorf BioPhotometer.

2. Transfection et sélection de clones cellulaires

La veille de la transfection les cellules HEK-Flp-In et A549 Flp-In ont étéensemencées en plaque 6 puits à raison de $1,5 \cdot 10^6$ et $0,5 \cdot 10^6$ cellules par puits respectivement et maintenues dans 1,5 ml de milieu de culture sans antibiotique. Le lendemain, les cellules Flp-In ont été co-transfectées avec le vecteur d'expression contenant la séquence codant la kallistéine 6 et le vecteur pOG44 codant la recombinaise. Les deux vecteurs ont été introduits dans un rapport 9/1 (pOG 44/vecteur d'expression). La transfection a été réalisée à l'aide de la lipofectamine (Invitrogen) et selon le protocole du fournisseur. Brièvement, une solution contenant 10 µl de lipofectamine dans 250 µl d'OptiMEM (GIBCO, Cergy-Pontoise, France) et une deuxième solution contenant 0,4 µg de vecteur d'expression codant la KLK6 et 3,6 µg de pOG44 dans 250 µL d'OptiMEM ont été équilibrées pendant 5 minutes. Les deux solutions ont ensuite été mélangées puis incubées 20 minutes à température ambiante afin de permettre la formation de complexes d'acides nucléiques/lipofectamine. Ce mélange de 500µl de milieu de transfection, contenant au total 4µg d'ADN, a ensuite été laissé en contact avec les cellules à 37°C pendant 24 h pour les cellules HEK Flp-In et 4h pour les cellules A549 Flp-In. Après ce délai, les cellules ont été remises pour la nuit dans du milieu sans antibiotique, le lendemain, les

cellules ont été passées dans des boîtes de 10 cm de diamètre contenant 8 mL de milieu sans antibiotique. Une fois adhérentes, les cellules ont été soumises à une pression de sélection en présence de milieu de culture contenant 100 µg/mL d'hygromycine. Le milieu a été renouvelé tous les 2 à 3 jours pendant toute la période de sélection (environ 3 semaines) pour éliminer les débris cellulaires et renouveler l'antibiotique.

3. Isolement et propagation des clones cellulaires

Les clones, une fois visibles à l'œil nu ont été isolés à l'aide d'un anneau de clonage. Brièvement, après un lavage avec du PBS (Invitrogen), une fine couche de graisse de silicone a été étalée à la base des cylindres, qui ont ensuite été placés autour des clones cellulaires. De la trypsine a ensuite été placée à l'intérieur du cylindre. Les cellules dissociées ont été prélevées et transférées dans un puits de plaque 96 puits. Une fois à confluence, les cellules ont été propagées par des passages dans un puits d'une plaque 24 puits puis 6 puits, puis un flacon de culture de 25 cm² et enfin un flacon de culture de 75 cm². Les cellules sont ensuite conservées dans des cryotubes avec du milieu complet additionné de 5% de DMSO (Sigma) dans de l'azote liquide.

L'expression de KLK6 par les clones a régulièrement été contrôlée lors de la thèse par un test ELISA. Les lignées transformées stablement ont été dénommées HEK proKLK6 et A549 proKLK6. Le milieu de culture, qui sera appelé plus tard milieu complet, est identique à leurs lignées parentales mais additionné d'hygromycine à 100µg/ml.

III. Production de proKLK6 recombinante à partir de la lignée HEK proKLK6

1. Production en cellules HEK proKLK6

La proKLK6 recombinante a été produite dans le surnageant de cellules HEK surexprimant la proKLK6 cultivées en milieu CD Hybridoma (GIBCO, Cergy Pontoise, France), un milieu ne contenant pas de protéines ou de peptides d'origine animale, végétale ou synthétiques. Les cellules ont été propagées en flasque de 175 ml dans leur milieu complet puis celui-ci a été remplacé par du milieu CD hybridoma lorsque les cellules étaient à 80% de confluence. Dix jours après, les surnageants ont été récupérés. La production a été réalisée avec un volume total de 2500 ml. Le surnageant de culture contenant la proKLK6 a été

concentré 50 fois par l'utilisation d'une membrane de nitrocellulose « Centricon ultra-filtration device » (Millipore, Molsheim, France) comportant un seuil de coupure de 10 kDa.

2. Purification de la proKLK6

La purification du zymogène de KLK6 a été réalisée sur un appareil ÄKTA purifier 10 (Amersham Biosciences, Pantin, France) avec une colonne HiTrapTM SP HP Cation exchange de 5mL (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Royaume-Uni). Le tampon de fixation (nommé tampon A) utilisé était de l'acétate de sodium 50mM pH 5,8 et le tampon d'élution (nommé tampon B) était constitué d'acétate de sodium 50mM et de chlorure de sodium 1 M, pH 5,8. La vitesse de dépôt a été de 0,8 mL/min alors que la vitesse d'élution a été de 3 mL/min.

L'élution a été réalisée en gradient discontinu avec les étapes suivantes :

- montée jusqu'à 10 % de B en 15 volumes de colonne (CV)
- plateau à 10 % de B pendant 15 CV
- montée jusqu'à 20 % de B en 20 CV
- plateau à 20 % de B pendant 15 CV
- montée à 30 % de B (4 CV) suivi d'un plateau (10CV)

Le lavage de la colonne a été effectué avec 100% de tampon B. Les fractions recueillies en sortie de colonne ont été de 4 mL et la collecte a été effectuée du début du programme jusqu'au plateau de 30 % de tampon B, soit 87 tubes. Les fractions contenant de la proKLK6 ont été réunies, puis concentrées par centrifugation à l'aide d'une membrane de nitrocellulose « Centricon ultra-filtration device » (Millipore, Molsheim, France) pour obtenir un volume final de 7 ml.

3. Activation de la proKLK6

La fraction concentrée d'élution a été ajusté à un pH 7,4 puis 24µg de thermolysine (Sigma-Aldrich, Lyon, France) ont été ajoutés. Le mélange a été incubé pendant 2 heures à température ambiante. L'arrêt de la réaction a été effectué par un rajout de 7 ml de tampon A et à un réajustement du pH à 5,3.

4. Mesure de l'activité de la KLK6

L'activité de KLK6 maturée a été mesurée à l'aide du substrat Boc-V-P-R-AMC (RetD, Lille, France) Le groupement AMC du substrat émet de la fluorescence après sa libération dans le milieu par une protéolyse de la liaison Arg-AMC. Ce substrat a été dilué à une concentration finale de 10 mM dans un tampon composé de Tris-HCl 50 mM à pH 7,6, d'EDTA 0,1mM, de NaCl 0,1 mM et de 0,01% Tween 20. 150 µl de ce mélange ont été déposés dans des puits de plaque 96 puits à fond noir. Puis, selon les puits, 1µl de produit de purification avant et après l'activation du zymogène par la thermolysine a été rajouté, le contrôle négatif a été effectué sans aucun rajout. L'activité protéolytique a été déterminée à 37°C pendant 20 minutes par la mesure de l'émission de fluorescence à 460 nm après excitation à une longueur d'onde à 380nm.

5. Purification de la KLK6 active

Cette purification a été effectuée de la même manière que la purification du zymogène cependant la vitesse d'élution a été modifiée à 1ml/min, et le volume des fractions récupérés a été de 800 µl.

IV. Etudes fonctionnelles de KLK6

1. Croissance et cytotoxicité : le test MTS

Pour cela, les cellules ont été cultivées en plaque 96 puits dans du milieu complet. Il est à noter que pour une expérience, plusieurs sérums ont été testés, ainsi, les cellules ont été cultivées dans du sérum A (ATGC, France) ou B (Euroclone, Pero, Italie) ou C (Lonza, Saint Beauzire, France). La densité cellulaire de départ a variée selon les expériences, ainsi que le temps de culture avant l'analyse de la croissance et de la cytotoxicité. Pour ce dernier, le kit « CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay » qui est composé de MTS (un composé de tetrazolium) provenant du fournisseur proméga a été utilisé (Charbonnières-les Bains, France) pour mesurer la croissance cellulaire et la cytotoxicité. Le milieu de culture des cellules a été remplacé par 100 µl de milieu complet additionné de 20 µl de MTS. Après une incubation de 2h, la réduction du MTS par les cellules viables en formazan, un produit coloré, a été mesurée par une mesure de l'absorbance à 490 nm.

2. Etude de l'apoptose

a) *Induction de l'apoptose*

Les cellules A549 ont étéensemencées en plaque 96 puits à raison de 5000 cellules par puits dans 150 µl de milieu complet, 6 puits ont étéensemencés par lignée. Lors de culture en plaque 6 puits, les cellules A549 ont étéensemencées dans 1,5 ml de milieu complet à raison de $0,5 \cdot 10^6$ cellules par puits. Les cellules ont été cultivées pendant 16 à 24h. Le milieu a ensuite été éliminé et les cellules ont été rincées avec 3ml ou 300µl de milieu complet à 2% de SVF selon le support utilisé. Les cellules ont été incubées pendant 24h dans du milieu complet à 2% de SVF supplémenté de 0, 0,1 ; 0,2 ou 0,3 µM de staurosporine, un inducteur d'apoptose (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France).

b) *Analyse par cytométrie en flux*

Le test apostain a été utilisé pour mesurer l'apoptose par cytométrie en flux. Ce test repose sur la propriété des cellules apoptotiques à être plus sensibles à la dénaturation de l'ADN que les cellules non apoptotiques. Cet ADN dénaturé est détecté par l'anticorps F7-26 anti ss DNA/APOSTAIN (AbCys, Les Ulis, France) qui se fixe à l'ADN simple brin.

Les cellules traitées avec de la staurosporine en plaque 6 puits pendant 24h ont été récoltées. Pour cela, les surnageants de culture, contenant les cellules mortes, ont été récoltés, puis un rinçage au PBS a été effectué et conservé. Les cellules restantes dans les puits ont été incubées 5 minutes à 37°C avec 200µl de trypsine (GIBCO, Cergy-Pontoise, France) afin de les détacher du support, la réaction a été arrêtée avec 500 µl de SVF, puis un nouveau lavage avec du PBS a été effectué pour récupérer les dernières cellules. Le tout a été placé dans un tube 15 ml. Les cellules ont été centrifugées pendant 5 minutes à 1100 rpm à 4°C, le surnageant a été retiré et les cellules ont été remises en suspension dans 3 ml de PBS pour retirer toute trace de sérum. Une nouvelle centrifugation de 5 minutes à 1100 rpm à 4°C a été effectuée, le surnageant a été retiré et les tubes contenant les cellules ont été placées dans de la glace pilée. Les cellules ont été re-suspendues dans du PBS à 4°C et vortexées à vitesse maximale, 1,5 ml de méthanol à -20°C a été rajouté goutte à goutte sur les cellules tout en les vortexant. Les tubes ont ensuite été placés à -20°C jusqu'à l'analyse par cytométrie en flux (entre 24 et 48 heures).

Les cellules fixées par congélation dans du méthanol ont été centrifugées à 1500 rpm pendant 5 minutes à 20°C. Le culot cellulaire a été resuspendu dans 250µl de formamide et incubé pendant 5 minutes à température ambiante, puis les cellules ont été placées dans un bain-marie à 75°C pendant 10 minutes, ces deux étapes permettant la dénaturation de l'ADN. Les cellules ont ensuite été remises à température ambiante pendant 15 minutes puis 2ml de PBS contenant 1% de lait ont été rajoutés, le mélange a été vortexé afin de permettre une meilleure homogénéisation et une incubation de 15 minutes à température ambiante a été effectuée. Les cellules ont été centrifugées pendant 5 minutes à 700g et le culot cellulaire a été repris dans 75µl d'anticorps F7-26 (AbCys, Les Ulis, France) ou d'un IGM (contrôle négatif, Sigma-Aldrich, Lyon, France) dilué à 10 µg/ml et à 20µg/ml respectivement dans du PBS (GIBCO) contenant 5% de SVF. Les cellules ont été laissées en présence des anticorps pendant 15 minutes à température ambiante, puis 1 ml de PBS (GIBCO) a été rajouté et le mélange a été vortexé et centrifugé pendant 5 minutes à 700g. Le culot, contenant les cellules, a ensuite été resuspendu dans 100µl d'IGM couplé au fluorochrome FITC (*fluorescein isothiocyanate*) (Sigma-Aldrich, Lyon, France) dilué à une concentration finale de 20 µg/ml et incubé pendant 15 minutes à température ambiante avant le rajout de 1 ml de PBS (GIBCO). Les cellules ont ensuite été centrifugées pendant 5 minutes à 700g et le culot a été resuspendu dans 200µl de PBS (GIBCO) contenant 1 µg/ml de 7-AAD (*7-Aminoactinomycin D*), un marqueur des acides nucléiques. Les cellules ont ensuite été analysées par cytométrie en flux (Beckman Coulter, France), le FITC est excité à une longueur d'onde de 488 nm et émet à 525nm, le 7-AAD absorbe à une longueur d'onde de 555nm et émet à 655 nm

c) Analyse par ELISA

Pour cela le kit « cell death detection ELISA » (Roche, Meylan, France) a été utilisé. Ce kit contient une plaque 96 puits dont les fonds des puits ont été préalablement coatés avec un anticorps détectant les histones des chromosomes, le tampon de lyse des cellules permettant d'extraire les nucléosomes, l'anticorps de détection qui se fixe à l'ADN simple brin déjà couplé à la peroxydase, le substrat ABTS de la peroxydase et le tampon de lavage.

Les cellules A549 cultivées en plaque 96 puits et traitées à la staurosporine ont été centrifugées pendant 10 minutes à 200g. Les surnageants ont été retirés, puis les cellules ont été reprises dans 200µl de tampon de lyse. Une incubation de 30 minutes à température ambiante a été effectuée puis le lysat a été centrifugé à 200g pendant 10 minutes. 20µl de

surnageant contenant les nucléosomes ont été prélevés pour le test ELISA. Les échantillons ont été déposés dans des puits d'une plaque 96 puits contenue dans le kit avec 80µl de tampon comprenant l'anticorps de détection. La plaque a été couverte et une incubation pendant 2h sous agitation (300 rpm) à température ambiante a été effectuée. Le mélange a été retiré et les puits ont été rincés avec 200µl de tampon de lavage, ensuite 100µl de substrat ont été déposés et incubés pendant 15 minutes sous agitation. L'absorbance a ensuite été mesurée à 405nm avec une correction à 490nm.

3. Etude de la voie de l'E-cadhérine/ β -caténine

a) Détection de l'E-Cadhérine membranaire

Les cellules à 70-80% de confluence ont été détachées du support plastique (une boîte de pétri de 10 cm²) par une incubation de 10 minutes à 37°C dans 7 ml de tampon citrate composé de chlorure de citrate 138mM et de citrate de sodium 15mM. Les cellules ont été centrifugées à 1500 rpm pendant 5 minutes puis remises en suspension dans du PBS (GIBCO Cergy-Pontoise, France), pour être rincées et comptées grâce à une cellule de Malassez. Pour chaque essai 0,75.10⁶ cellules ont été étudiées, le contrôle a été effectué avec un pool des différentes lignées. Après une centrifugation à 1500 rpm pendant 5 minutes, les cellules ont été remises en suspension dans 250µl de PBS (GIBCO) supplémenté de 2% de SVF (tampon FACS), contenant de l'IgG lapin ou un anticorps dirigé contre le domaine extracellulaire de l'E-Cadhérine (Santa-Cruz, Le Perray en Yvelines, France) à une concentration de 8µg/ml. Le mélange a été incubé pendant 45 minutes à 4°C, puis 2 lavages dans 1 ml de tampon FACS ont été effectués entre des centrifugations à 1500 rpm pendant 5 minutes. Après une centrifugation, les cellules ont été resuspendues dans 500µl de tampon FACS additionné de 5µg/ml d'anticorps secondaire (anti-lapin) couplé au flurochrome (Alexa488, Invitrogen, Cergy-Pontoise France). Le mélange e été incubé pendant 45 minutes à 4°C à l'abri de la lumière, pour finir les cellules ont été rincées 2 fois dans du tampon FACS et remises en suspension dans 200 µl de tampon FACS additionné de 1µg/ml de 7-AAD (7-*Aminoactinomycin D*). Les cellules ont ensuite été passées au cytomètre en flux (Beckman Coulter, France), l'Alexa 488 est excité à une longueur d'onde de 495 nm et émet à 519 nm, le 7-AAD absorbe à une longueur d'onde de 555nm et émet à 655 nm.

b) Localisation cellulaire de la β -caténine

Les cellules à 90-100% de confluence cultivées dans des chambres de cultures LAB-TEK (Nunck, Dominique Dutscher, Brumath, France) ont été fixées dans du méthanol glacial pendant 10 minutes. Elles ont été rincées deux fois avec du PBS 1X (GIBCO, Cergy-Pontoise, France) et stockées à 4°C. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 1 heure à température ambiante dans 200 μ l de PBS supplémentés de 1% de BSA (*Bovine serum Albumin*, Sigma-Aldrich, Lyon, France). Les cellules ont ensuite été incubées pendant 2 heures à température ambiante dans 150 μ l de PBS, 1% BSA et un anticorps anti- β -caténine (Santa-Cruz, Le Perray en Yvelines, France) à 4 μ g/ml. Les cellules ont ensuite été rincées 2 fois pendant 5 minutes avec du PBS 1X, puis incubées pendant 1 heure à température ambiante, à l'abri de la lumière, avec l'anticorps secondaire (anti-souris) couplé au fluorochrome Alexa488, (Invitrogen, Cergy-Pontoise France) à une concentration de 10 μ g/ml dans du PBS supplémenté de 1% de BSA. Les cellules ont ensuite été rincées deux fois pendant 5 minutes puis incubées dans 150 μ l de PBS contenant 1 μ g/ml de 7-AAD. Après un lavage, les parois des chambres de culture ont été retirées, la lame a été recouverte de milieu de montage (*Mounting medium, for IF fluoromount G*, Interchim, Montluçon, France) permettant de conserver la fluorescence et de maintenir une lamelle déposée sur le dessus du montage. Les lames ont ensuite été observées au microscope à fluorescence ou confocal, l'Alexa 488 est excité à une longueur d'onde de 495 nm et émet à 519 nm, le 7-AAD absorbe à une longueur d'onde de 555nm et émet à 655 nm.

c) Etude de la fonctionnalité de la béta-caténine avec un gène rapporteur

Pour cela, nous avons utilisé une construction comportant le gène de la luciférase sous la dépendance du promoteur TCF/LEF activé par la β -caténine. Une fois la construction transfectée, l'activation du gène de la luciférase induit une bioluminescence qui est mesurée et qui est directement proportionnelle à l'activité de la β -caténine.

Les cellules A549 Flp-In et proKlk6 sauvage ont été ensemencées dans les puits d'une plaque 24 puits de à raison de 40 000 cellules par puits. Le lendemain, les cellules ont été transfectées avec 15ng/puits de vecteur rapporteur Super8 Top Flash (Addgene : plasmide codant la *firefly* luciférase sous la dépendance du promoteur TCF/LEF, Proméga, Charbonnières-Les-Bains, France) ou Super8 Fopflash (Addgene : contrôle négatif, il code la *firefly* luciférase mais il possède un promoteur TCF/LEF muté). Les cellules ont également été transfectées avec 1ng par puits de vecteur codant la *renilla* luciférase (don de Pascale

Crépieux) servant de contrôle pour la normalisation. Les transfections ont été réalisées à l'aide de la lipofectamine PlusTM (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) à raison de 1,3µl par puits et réalisées dans le milieu OptiMEM (GIBCO) sans SVF ni P/S dans un volume total de 52µl. Les mélanges ont été laissés en contact avec les cellules pendant 4h, puis le milieu a été remplacé par 300µl de milieu complet additionné de 200µl de milieu conditionné contenant ou non du Wnt 3a sur la nuit. Ces milieux conditionnés ont été obtenus après centrifugation et filtration de surnageants de culture de cellules fibroblastiques murines sur-exprimant ou non Wnt3a.

La mesure d'activité du gène rapporteur a été effectuée à l'aide du kit « Dual-Luciferase Reporter Assay System » (Promega, Charbonnières-les Bains, France). Les cellules ont été mises sur la glace et rincées avec du PBS. Elles ont été lysées grâce à une incubation d'une heure sous agitation en chambre froide avec 100µl par puits de *Passive Lysis buffer*. Après une centrifugation de 5 minutes à 4°C à 12000 rpm pour retirer les débris, 40µl du lysat purifié ont été prélevés et placés dans une plaque 96 puits à fond blanc pour luminomètre. Les substrats des luciférases *firefly* et *renilla* ont été préparés avec une dilution au 1/2 dans du *Passive Lysis buffer*, le substrat de la luciférase *renilla* a préalablement été dilué au 1/50^{ème} dans du *Stop and Glo® buffer* qui est un tampon permettant l'arrêt de l'activité de la luciférase *firefly*. La mesure de la luminescence a été effectuée sur le luminomètre Centro XS³ LB 960 (Berthold Technologies, Thoiry, France) à injection automatique. Deux injections ont été effectuées, la première a été le substrat de la luciférase *firefly*, la deuxième injection a été le réactif permettant l'arrêt de la luciférase *firefly* et le substrat de la luciférase *renilla*.

4. Etude de la voie de l'EGFR (*Epidermal Growth factor Receptor*)

a) Inhibition de la fixation du ligand par le cetuximab

Afin d'empêcher la liaison de ligand sur l'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), les cellules ont été incubées avec le cetuximab (Merck, don de l'Hôpital Bretonneau, Tours, France) qui est un anticorps monoclonal chimérique dirigé contre l'EGFR, celui-ci bloque la liaison des ligands endogènes de ce récepteur. Afin de permettre la fixation de l'anticorps sur les cellules, celles-ci ont été incubées dans un milieu dépourvu de SVF comprenant du cetuximab. Selon les expériences les concentrations de cetuximab ont été : 1µg/ml, 10µg/ml, 50µg/ml et 100µg/ml. Le contrôle sans cetuximab comprenait du PBS pour remplacer le volume de cetuximab des puits testés.

Pour les expériences de prolifération cellulaire en plaque 96 puits, les cellules A549 ont étéensemencées à raison de 2500 cellules par puits dans 150 µl de milieu dépourvu de SVF comprenant ou non du cetuximab. Après une incubation de 30 minutes avec le cetuximab, du milieu à 20% de SVF a été rajouté pour obtenir un milieu à 10% de SVF dans les puits. Les cellules ont été cultivées durant 24h, puis un test MTS a été effectué.

Pour les expériences en plaque 6 puits, les cellules A549 ont étéensemencées à raison de $0,5 \cdot 10^6$ cellules par puits dans 1,5 ml de milieu complet. Le lendemain les cellules ont été incubées pendant 2h avec le cetuximab dans du milieu sans sérum avant le rajout de peptide agoniste de PAR2 ou de KLK6 active dans le milieu.

b) Dosage de l'EGFR total et phosphorylé

Ce dosage a été effectué à l'aide du kit Human total EGFR ELISA DuoSet IC (R&D systems europe, Lille, France) contenant l'anticorps de capture de l'EGFR total ou de l'EGFR phosphorylé, l'anticorps de détection de l'EGFR total ou phosphorylé, une solution d'EGFR phosphorylé ou non purifié ainsi que de la streptavidine couplé à l'HRP (*Horseradish peroxidase*).

Les cellules à 80% de confluence ont été lysées après un rinçage au PBS (GIBCO, Cergy Pontoise, France) à l'aide du lysis buffer #9 contenant 1% de NP-40, 20 mM de Tris à pH 8, 137 mM de NaCl, 10% de glycerol, 2 mM d'EDTA, 1mM de sodium orthovanadate activé et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma Aldrich, Lyon, France) au 1/100^{ème}. Pour 1 puits de plaque 6 puits 100µl de lysis buffer #9 ont été utilisés, la plaque a ensuite été incubée pendant 10 minutes sur de la glace, puis les lysats ont été congelés à -80°C. Avant utilisation, les lysats ont été décongelés dans la glace puis centrifugés à 15000g pendant 15 minutes afin d'éliminer les débris cellulaires, les surnageants ont été prélevés pour être analysés. Le test ELISA a été effectué selon les recommandations du fournisseur. Brièvement, l'anticorps de capture a été dilué à une concentration finale de 0,8µg/ml dans du PBS (GIBCO). 100µl de cette dilution ont immédiatement été déposés dans des puits de plaque 96 puits (Maxisorp, Nunc). La fixation de l'anticorps a été effectuée par une incubation sur la nuit à température ambiante. Les puits ont ensuite été rincés avec le tampon de lavage composé de PBS à pH à 7,2 (GIBCO) et du Tween à 0,05%. La saturation des puits s'est effectuée pendant 1h30 à température ambiante avec un tampon comprenant du PBS à pH 7,2 (GIBCO), 1% de BSA (*Bovine Serum Albumine*, Sigma Aldrich, Lyon, France) et 0,05% de NaN₃ (Sigma Aldrich,

Lyon, France). Après rinçage des puits avec du tampon de lavage, 100µl d'échantillons ont été déposés dans les puits. Après une incubation de 2h à température ambiante, les puits ont été rincés avec le tampon de lavage et une incubation de 2h à température ambiante a été effectuée avec 100µl d'anticorps de détection dilué à une concentration finale de 200ng/ml dans un tampon à pH 7,2 composé de 20mM de Tris, 137 mM de NaCl, 0,05% de Tween 20 et 0,1% de BSA. Après un rinçage avec du tampon de lavage, 100µl de streptavidine couplé à l'HRP ont été déposés dans les puits, la plaque a ensuite été incubée pendant 20 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière, puis rincée avec le tampon de lavage. 100µl de substrat de la peroxydase IC (RetD systems europe, Lille, France) ont ensuite été déposés, ce substrat est composé pour moitié de H₂O₂ et de tetramethylbenzidine, ce mélange a été préparé 15 minutes avant le dépôt dans les puits. Une incubation de la plaque pendant 20 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière a été effectuée avant d'ajouter 50 µl solution stop composé de 2N de H₂O₂. La mesure de l'absorbance a été faite à 450 nm avec une correction à 540 nm.

5. Etude de la voie de PAR2 (*proteinase activated Receptor 2*)

a) *Activation de la voie de PAR2 par un agoniste*

Pour les expériences de prolifération cellulaire, les cellules A549 ont étéensemencées à raison de 3000 cellules par puits en plaque 96 puits dans du milieu complet. Le lendemain les cellules ont été rincées au PBS puis incubées durant 1h dans du milieu dépourvu de SVF mais supplémenté avec 0,1% de BSA (*Bovine Serum albumine*, Sigma-Aldrich, Lyon, France). Le peptide agoniste de PAR2 : SLIGKV (PolyPeptide group; Strasbourg, France) a ensuite été rajouté au milieu pour obtenir une concentration finale de 100µM, ce rajout a été effectué tous les jours jusqu'à la mesure de la prolifération par un test MTS.

Pour les différentes expériences en plaque 6 puits, les cellules ont étéensemencées à raison 0,5.10⁶ cellules par puits dans 1,5 ml de milieu complet. Le lendemain, les cellules ont été rincées dans du milieu sans sérum et ont été incubées pendant 2h dans du milieu sans sérum avant le rajout du peptide agoniste de PAR2 à une concentration de 40µM. Pour une expérience, une transfection des cellules avec un siRNA dirigé contre PAR2 a été effectué, le traitement avec le peptide agoniste a été effectué le lendemain de la transfection.

b) *Inhibition de la voie avec des siRNA*

Les siRNA sont des petits ARN interférents double brins, ces siRNA activent le complexe protéique RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*) où se trouve les protéines nécessaires au clivage de l'ARNm cible (figure 12). Les petits ARN interférents sont incorporés dans le complexe RISC où leur structure double brin est dissociée grâce à l'activité hélicase présente dans le complexe. Le simple brin anti-sens guide le complexe RISC vers l'ARNm de séquence complémentaire qui est alors clivée par la nucléase présente dans le complexe.

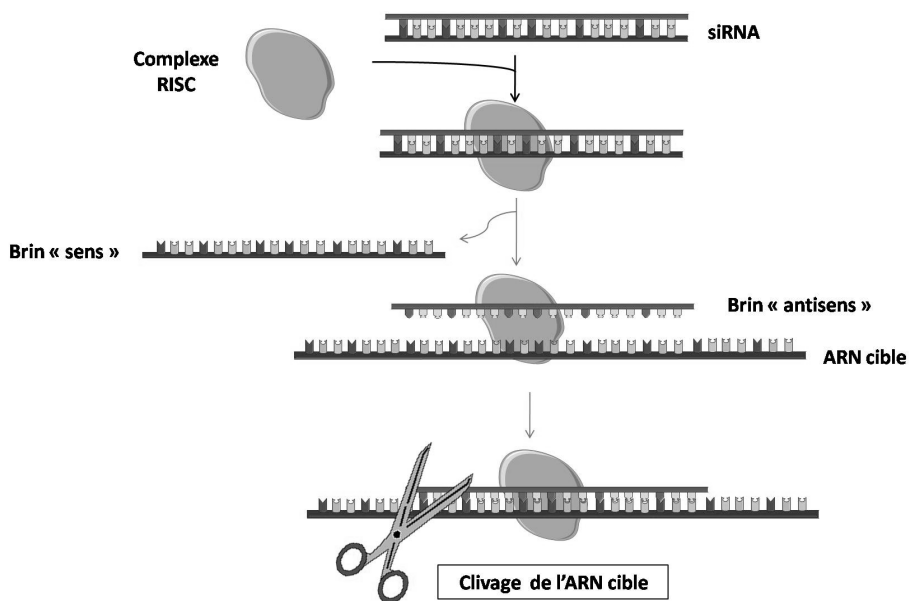


Figure 12 : Mécanisme d'action des siRNA

La transfection du siRNA PAR2 (Applied Biosystem, Courtaboeuf, France) a été effectuée avec de la lipofectamine (*Invitrogen*, Cergy-Pontoise, France). Les cellules A549 parentales ont étéensemencées à raison de 300 000 cellules dans 1,5 ml de milieu complet par puits en plaque 6 puits. Le lendemain, la transfection a été effectuée. Pour cela, deux solutions ont été préparées séparément. La première était composée des siRNA PAR2 (Applied Biosystem, Courtaboeuf, France) à 12,5pmol dans 250µl de milieu OptiMEM (GIBCO, Cergy-Pontoise, France) pour un puits de plaque 6 puits. La deuxième solution était composée de 3µl de lipofectamine (*Invitrogen*, Cergy-Pontoise, France) dans 250 µl d'optiMEM pour un puits de plaque 6 puits. Ces deux solutions ont été équilibrées à température ambiante pendant 5 minutes. Puis, les deux solutions ont été mélangées et vortexées légèrement, et ce

mélange a été incubé à température ambiante pendant 20 minutes afin de permettre la formation de complexes d'acides nucléiques/lipofectamine. Il a ensuite été déposé sur les cellules goutte à goutte.

6. Effets de KLK6 sur la réponse aux agents chimiothérapeutiques

a) *Etude in vitro*

Les cellules A549 et HEK Flp-In et proKLK6 ont été ensemencées à raison de 1000 et 3000 cellules respectivement dans 6 puits de plaque 96 puits. Le lendemain le milieu a été changé par du milieu complet comprenant les anti-cancéreux. Les concentrations testées ont été 0, 0,1 ; 1 ; 10 ; 100 et 1000 nM pour le paclitaxel (EBEWE, don de l'Hôpital Bretonneau, Tours, France) et la gemcitabine (GEMZAR® Lilly laboratoire, don de l'Hôpital Bretonneau, Tours, France), pour la cisplatine (MYLAN/MERCK, don de l'Hôpital Bretonneau, Tours, France) les concentrations testées ont été 0, 0,1 ; 1 ; 10 ; 100 et 1000 μ M. Afin d'éliminer les effets qui seraient dû à l'éluant du traitement, les cellules non traitées ont été placées dans du milieu complet comprenant du PBS avec un volume correspondant au volume maximal d'agents chimio-thérapeutiques utilisés lors des expériences. Les cellules ont été laissées à incuber avec les anticancéreux pendant 72h, puis un test MTS a été effectué.

b) *Etude in vivo*

Cette étude a été réalisée en collaboration avec le Centre d'Imagerie du Petit Animal à Orléans (CNRS-TAAM UPS 44). L'expérimentation animale s'est effectuée sur 48 femelles Balb/c Nude (Charles River, Wilmington, USA), arrivée à l'âge de 4 semaines. Les souris ont été hébergées en portoir ventilé pendant la durée de l'étude. Une durée d'acclimatation d'une semaine a été respectée avant le début de l'étude puis l'expérience a été effectuée sur une durée de 63 jours. L'induction tumorale, réalisée au CIPA (Orléans), a été effectuée par injection sous cutanée de 1.10^6 cellules A549 Flp-In ou sur-exprimant la proKLK6. 18 jours après, les souris ont reçu du sérum physiologique ou du paclitaxel à 30mg/kg ou du carboplatine à 25mg/kg, injectés 1 fois par semaine pendant 4 semaines par voie intraveineuse. Il est à noter que le paclitaxel n'a été introduit par voie intraveineuse que la première semaine, par la suite elle a été injectée par voie intra péritonéale à la même dose à

cause d'une toxicité très importante. Les numéros d'identification des souris ainsi que leurs traitements sont indiqués dans le tableau n°6.

Lignée Tumorale	Traitement Administré	Identifications	Dates des traitements	Dates des autopsies
A 549 KLK6 (clone A3)	Paclitaxel	5446, 5464, 5448, 5449, 5450, 5451, 5452, 5453, 5454	J18, J25, J32 et J 39	J62 et J63
	Sérum Physiologique	5455, 5456, 5457, 5458, 5459, 5460, 5461, 5462, 5463		
	Carboplatine	5447, 5465, 5466, 5467, 5468, 5469, 5491, 5492, 5493		
A 549 FLP-In (clone A11)	Paclitaxel	5470, 5484, 5472, 5473, 5479, 5475, 5490		
	Sérum Physiologique	5477, 5478, 5474, 5486, 5481, 5482, 5483		
	Carboplatine	5485, 5476, 5487, 5488, 5489, 5480, 5471		

Tableau 6 : Composition des lots.

Pour chaque lot, 2 animaux ont reçu un traitement supplémentaire avant l'imagerie de fluorescence de l'apoptose effectuée le dernier jour de l'expérience, c'est-à-dire à J60. Ces 12 souris ont été sélectionnées en fonction du volume tumoral qui a été mesuré une fois par semaine pendant 5 semaines puis 2 fois par semaine jusqu'à la fin de l'étude à l'aide d'un pied à coulisse. La mesure de l'apoptose a été effectuée à l'aide de la fluorescence émise par l'*Annexin-Vivo 750* (Perkin Elmer, Waltham, USA). Il s'agit d'une sonde commerciale comprenant l'annexine V, une protéine sélective, et un fluorochrome proche de l'infrarouge. Ceci permet de visualiser *in vivo* et de quantifier les phospholipides et les phosphatidylsérines fixées à la membrane, qui sont exposées vers l'extérieur de la bicouche lipidique de la membrane lors des stades précoces de l'apoptose. Pour cela 100 µl de la solution prête à l'emploi ont été administrés par voie intraveineuse et 44h après l'administration, la fluorescence a été mesurée à la longueur d'onde de 800nm après une excitation à 745nm sur l'appareil Ivis Lumina (Caliper Life Sciences, Hopkinton, USA) et les données ont été exploitées avec le logiciel Living Image (4.2). Durant l'examen, les souris ont été anesthésiées par un mélange air/isoflurane 2% (Aerrane, Baxter, Maurepas, France). Les souris utilisées pour l'imagerie de l'apoptose ainsi que les traitements reçus en supplément sont indiqués dans le tableau n°7.

Lignée Tumorale	Traitement Administré	Identifications	Dates du traitement précédent l'imagerie	Administration de l'Annexine V 750	Imagerie de fluorescence
A 549 KLK6 (clone A3)	Paclitaxel	5448, 5454	J60	24h après le traitement	24 et 44 h après l'administration d'Annexine V 750
	Sérum Physiologique	5461, 5462			
	Carboplatine	5466, 5468			
A 549 FLP-In (clone A11)	Paclitaxel	5479, 5490			
	Sérum Physiologique	5478, 5582			
	Carboplatine	5471, 5487			

Tableau 7 : Condition d'imagerie de l'apoptose.

A la fin de l'étude, les souris ont été euthanasiées par élévation cervicale et une autopsie a été réalisée. Pour les 12 souris ayant eues une administration d'Annexin-Vivo 750, les tumeurs excisées ont été de nouveau analysées. Pour cela un volume de muscle équivalent à celui des tumeurs a été prélevé afin de mesurer le bruit de fond dans la souris et de le rapporter à la fluorescence mesurée dans la tumeur. Toutes les tumeurs ont été prélevées puis congelées dans l'azote liquide. Elles ont été conservées à -80°C. Lorsque leurs tailles le permettaient, les tumeurs ont été divisées en deux et la seconde partie a été fixée dans du formol neutre 10% (24 à 48h) puis transférée dans de l'éthanol 70.

V. Autres méthodes d'analyses

1. RT-qPCR après purification des ARN totaux

a) Extraction des ARN totaux

La lyse cellulaire et la purification des ARNm ont été réalisées grâce au système « Kit extraction Total ARN Isolation Nucleospin RNA II » (Machery-Nagel, Hoerd, France), selon le protocole du fabricant. Brièvement, les cellules ont été lysées par addition du tampon « RA1 » (contenant du thiocyanate de guanidine) et du β -mercaptoéthanol au 1/100^{ème} directement sur les cellules congelées. Le volume nécessaire de réactif pour 1.10^6 cellules est de 350 μ L, ce réactif permet l'inactivation des RNases cellulaires naturellement présentes dans les cellules. Le mélange a ensuite été vortexé pour homogénéiser et permettre une lyse optimum. Le lysat a ensuite été déposé sur une colonne « NucleoSpin Filter » permettant la filtration du lysat par centrifugation à 11000g pendant une minute. Les différents constituants cellulaires restants (sels, ADN et ARN) ont été fixés sur la colonne « NucleoSpin RNA II »

grâce à une préparation du lysat avec de l'éthanol à 70% qui a été déposée sur la colonne puis centrifugée 30 secondes à 11000g. L'élimination des sels sur le filtre a été faite grâce au tampon « MDB » (contenant du thiocyanate de guanidine et de l'éthanol) qui a été passé sur le filtre par une centrifugation à 11000g pendant 1 minute. L'ADN a ensuite été éliminé par une incubation du filtre avec 95 µl de la solution de rDNase fournie diluée au 1/10^{ème} dans son tampon d'activité pendant 15 minutes à température ambiante. Des lavages successifs de la membrane ont été effectués grâce à des centrifugations de 30s à 11000g avec en premier 200µl de tampon « RA2 » (contenant du thiocyanate de guanidine) puis le tampon « RA3 », d'abord à 600 µl puis 250 µl. Pour le dernier lavage le temps de centrifugation a été de deux minutes, pour sécher la membrane. Enfin, les ARN totaux ont été élués avec 60µL d'eau exempte de RNases et récupérés à la suite d'une centrifugation à 11000g pendant 1 minute. La quantité et la pureté des ARN totaux ont été évaluées par spectrophotométrie à 260nm puis les ARN ont été conservés à -80°C.

b) Obtention de L'ADNc

La rétrotranscription en ADNc des ARNm s'est effectuée à l'aide du kit « SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit » (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). La réaction de transcription inverse a été effectuée dans un volume final de 40µL. Le milieu réactionnel était constitué de 8µL du réactif « 5× VILO Reaction mix » contenant des amorces hexamériques, du MgCl₂, des dNTPs dans un tampon optimisé, de 4µL du réactif « 10× SuperSript Enzyme Mix » contenant la transcriptase inverse « SuperScript III RT » et un inhibiteur de RNases recombinant « RNaseOUT », d'un volume d'ARN correspondant à 5µg d'ARN totaux puis une quantité d'eau exempte de RNases suffisante pour avoir un volume de 40µL. La RT a été réalisée avec le thermocycleur *Mastercycler gradient* (Eppendorf). Après une incubation de 10 minutes à 25°C pour que les amorces puissent se fixer à l'ARN, le mélange a été incubé 1 heure à 42°C. Puis, l'enzyme a été dénaturée lors d'une incubation à 85°C pendant 5 minutes. Les ADNc ont été stockés à -20°C.

c) PCR quantitative en temps réel

Les réactions de PCR quantitatives en temps réel ont été effectuées en présence du fluorophore intercalant « SYBR Green » dans un thermocycleur LightCycler 480® (Roche

Diagnostics). Toutes les réactions ont été effectuées dans un volume réactionnel de 20µl à l'aide d'amorces oligonucléotidiques spécifiques des différents gènes recherchés (tableau n°8).

Gènes	Séquence sens 5'-3'	Séquence anti-sens 5'-3'
Beta-caténine	CACAAGCAGAGTCCAAAGACAG	GATTCCTGAGAGTCCAAAGACAG
E-cadherine	GCCTCCTGAAAAGAGAGTGGAAG	TGGCAGTGTCTCTCCAAATCCG
EGFR	AACACCCTGGTCTGGAAGTACG	TCGTTGGACAGCCTTCAAGACC

Tableau 8 : Séquence des amorces utilisées pour les différents gènes testés après une purification des ARN totaux.

La réaction de PCR quantitative a été réalisée avec le kit *SYBR® Premix Ex Taq (Perfect real Time)* (Takara bio inc). Il contient le *SYBR® Premix Ex Taq (perfect Real Time) 2X* composé de l'enzyme *Takara Ex Taq™ HS* dont l'activité est inhibée par un anticorps (hot start), d'un mélange de dNTP, de Mg²⁺ et de SYBR® Green I. Le milieu réactionnel (20µl) était composé de 10µl de *SYBR Premix EX Taq™ (2X)*, de 0,4 µl d'amorce sens et anti-sens à 10µM (concentration finale de 0,2µM) de 7,2µl d'eau exempt de RNase et DNase et de 2µl d'échantillon. La réaction de PCR a été réalisée avec le programme suivant (tableau n°9).

Nombre de cycles	Etape	Durée	Température
1	Activation de l'enzyme	30 secondes	95°C
45	Dénaturation de l'ADNc	5 secondes	95°C
	Hybridation de amorces et élongation	30 secondes	60°C
1	Courbe de fusion	5 secondes	95°C
		1 minute	65°C
		continu	97°C
		continu	40°C

Tableau 9 : Programme utilisé pour la réalisation des PCR avec le kit Takara

2. RT-qPCR directe à partir de cellules

a) Lyse cellulaire

Le kit « power SybrGreen Cell to Ct kit » (Invitrogen, Cergy-pontoise, France) a été utilisé. Pour cela, les cellules A549 à 80% de confluence en plaque 6 puits ont été détachées du support à l'aide de 200µl de trypsine (GIBCO) pendant 5 minutes à 37°C et la réaction a été stoppée avec 200µl de milieu complet. Les cellules ont ensuite été centrifugées pendant 5 minutes à 1500rpm et elles ont été resuspendues dans 125µl de PBS froid. 5µl de la suspension cellulaire ont été prélevés et traités avec 50µl de solution de lyse additionnée de DNase I au 1/100 contenus dans le kit. Les cellules ont été lysées par 5 aspirations-refoulements et la plaque a été laissée à température ambiante pendant 5 minutes pour permettre la lyse totale des cellules. La lyse a été stoppée par ajout de 5µl de solution stop. Les lysats ont été conservés quelques minutes à 4°C dans la glace puis congelés à -20°C jusqu'à l'étape de retro-transcription.

b) Obtention de l'ADNc

Cette étape a été réalisée dans un volume final de 50 µl contenant 25 µl de la solution 2X SYBR RT buffer, de 2,5 µl de la solution 20X RT enzyme mix, 12,5 µl d'eau exempt de RNase et de 10 µl de lysat cellulaire. La RT a été réalisée avec le thermocycleur *Mastercycler gradient* (Eppendorf) pendant 60 minutes à 37°C ; puis l'enzyme a été inactivée pendant 5 minutes à 95°C. Le mélange réactionnel contenant les ADNc a été congelé à -20°C jusqu'à l'étape d'amplification.

c) PCR quantitative en temps réel

Tout comme avec le kit SYBR® Premix Ex Taq, l'étape d'amplification avec le kit « power SybrGreen Cell to Ct kit » a été effectuée avec le fluorophore intercalant « SYBR Green » dans le thermocycleur LightCycler480® (roche Diagnostics) dans un volume réactionnel de 20µL avec les amorces nucléotidique présenté dans le tableau n°10.

Gènes	Séquence sens 5'-3'	Séquence anti-sens 5'-3'
PAR2	CTCCTCTCTGTGCATCTGGTTCC	TGCACACTGAGGCAGGTCATGA

Tableau 10 : Séquence des amorces utilisées pour les différents gènes testés avec le kit « power SybrGreen Cell to Ct kit »

Le kit *Power SYBR® Green Master Mix* (Applied Biosystems) contenu dans le kit « power SybrGreen Cell to Ct kit » contient le *SYBR® Green I Dye*, l'enzyme *AmpliTaq Gold DNA polymerase LD*, les dNTPs, et un tampon optimisé. Le milieu réactionnel (20µl) était composé de 10 µl de *Power SYBR® Green Master Mix* concentré (2X), de 0,4µl d'amorces sens et anti-sens à une concentration finale de 200nM, de 5,2µl d'eau exempte de nucléase et de 4µl d'ADNc. Les réactions de PCR quantitatives ont été réalisées selon le programme suivant (tableau n°11).

Nombre de cycles	Etape	Durée	Température
1	Activation de l'enzyme	30 secondes	95°C
40	Dénaturation de l'ADNc Hybridation de amorces et élongation	15 secondes 1 minute	95°C 60°C
1	Courbe de fusion	5 secondes 1 minute continu	95°C 65°C 97°C
		continu	40°C

Tableau 11 : Programme utilisé pour la réalisation des PCR avec le kit « power SybrGreen Cell to Ct kit »

3. Contrôle des techniques de qPCR et analyses des résultats

a) Contrôle de la technique

Chaque essai comprenait les ADNc étudiés (en duplicate), des témoins sans ADN (en duplicate) et un calibrateur. Ce dernier permet de relier les résultats des PCR des échantillons qui ont dû être réalisés séparément mais pour une même expérience. En effet, 2 expériences de PCR réalisées ne sont pas dans les mêmes conditions : baisse de l'efficacité des différents

réactifs, changement du matériel... Il s'agit d'un pool d'ARN des extraits de tissus sains et tumoraux ou des différentes lignées cellulaires.

Deux gènes normalisateurs ont été utilisés, ils permettent de compenser les variations inter-échantillons qui ne sont pas dû à une différence d'expression mais à des anomalies expérimentales qui peuvent conduire à des variations de quantité de matrice soumise à la PCR. Ce sont des gènes dont l'expression est inchangée selon les conditions analysées, il s'agit des gènes de l'actine et du 18S, les amorces utilisées sont indiquées dans le tableau n°12.

Gènes	Séquence sens 5'-3'	Séquence anti-sens 5'-3'
actine	GACCATGGCAATGAGCGGTTTC	AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT
18S	GCCACTACTACTCCCTGTACCA	GCATCCTCGCACCTTTTCTG

Tableau 12 : Séquence des amorces utilisées pour les gènes normalisateurs.

A la fin de chaque qPCR, une courbe de fusion a été réalisée (voir les tableaux des programmes) pour vérifier la spécificité des couples d'amorces pour un seul gène.

Afin de vérifier le doublement du nombre d'amplicon à chaque cycle de PCR, l'efficacité a été mesurée. Pour cela nous avons réalisé des dilutions en série d'un pool des différents échantillons. La valeur du cycle seuil (Ct) de ces dilutions a ensuite été mesurée pour chaque amorce et l'efficacité de la PCR a ensuite été calculée par le logiciel du *LightCycler 480*,

b) Analyse des résultats

La quantification de l'expression génique a été réalisée par la méthode de quantification relative dite $\Delta\Delta Ct$ (Livak and Schmittgen 2001). Cette équation est utilisée pour comparer l'expression d'un gène de deux échantillons différents (échantillon traité et non traité). Brièvement, le cycle seuil Ct du gène cible est relié au Ct du gène de référence obtenu pour chaque échantillon, on obtient le ΔCt . Le ΔCt de l'échantillon traité est relié au ΔCt de l'échantillon non traité, on obtient le $\Delta\Delta Ct$. Pour normaliser les résultats obtenus, le calcul $2^{-\Delta\Delta Ct}$ est effectué.

4. Analyse électrophorétique des protéines

a) Les échantillons

Pour l'analyse par électrophorèse deux types d'échantillons ont été analysés. Les surnageants de culture n'ont pas été préalablement traités. Cependant, pour analyser le contenu protéique des cellules, une lyse doit être effectuée. Dans le cadre de cette thèse, nous avons analysé la protéine Erk phosphorylée sur les résidus Thréonine 202 et Tyrosine 204 et la protéine Erk non phosphorylée. Pour cela les cellules ont été lysées avec un tampon comprenant 20mM de Tris, HCl à pH 8, 137mM de NaCl, 1% de NP40, 10% de glycerol, 2mM d'EDTA et 1mM de sodium orthovanadate. Les cellules ont été cultivées en plaque 6 puits, à 80% de confluence, elles ont été traitées avec 100µl de tampon de lyse froid en pratiquant des aspiration/refoulement avec la pipette afin d'optimiser la lyse des cellules. Le mélange a ensuite été récupéré puis vortexé, encore dans le but d'optimiser la lyse cellulaire. Les lysats cellulaires ont ensuite été centrifugés à 15000g pendant 15 minutes et le surnageant a été récolté et conservé à -80°C.

b) Dosage protéique

Pour comparer la différence d'expression d'une protéine entre deux échantillons, il faut analyser la même quantité de protéine afin d'éliminer les différences qui seraient dues à une différence en quantité de cellules lysées ou de volume de surnageants obtenus. Tous les dosages protéiques ont été réalisés à l'aide du kit «BCA Protein Assay» (*PIERCE*, Brebières, France). Cette méthode combine la réaction du biuret (réduction des ions Cu^{2+} en Cu^{1+} par les protéines) avec la chélation par les ions Cu^{1+} de l'acide bicinchoninique conduisant à une coloration violette des solutions dosées. Le dosage a été effectué selon les recommandations du fournisseur, brièvement, le dosage des protéines totales a été réalisé dans une plaque 96 puits. Une gamme étalon a été réalisée avec de la BSA (Sigma-Aldrich) diluée dans du PBS pH 7,2, aux concentrations suivantes : 2 µg/µL ; 1 µg/µL ; 0,5 µg/µL ; 0,25 µg/µL ; 0,125 µg/µL ; 0,0625 µg/µL ; 0,031 µg/µL. Le point 0 a été réalisé avec du PBS pH 7,2. La gamme a été réalisée en triplicate avec 10 µL/puits. Selon la concentration protéique des échantillons, ils ont été dilués ou non dans du PBS pH 5,2 puis déposés en triplicate à raison de 10µL/puits. Le kit comprend un réactif A contenant du sulfate de cuivre dilué et un réactif B contenant notamment de l'acide bicinchoninique. La solution B a été diluée au 1/50^e dans la solution A,

puis le mélange est déposé à raison de 100 µL/puits. La plaque a été placée à 37°C pendant 30 minutes puis, après agitation, les absorbances ont été lues à 570 nm.

c) Electrophorèse en gel de polyacrylamide

Les protéines ont été diluées dans du tampon échantillon composé de 0,5% de beta-mercaptoéthanol (permettant de dénaturer les protéines et de les protéger de l'oxydation), 50mM de tris à pH 6,8, 1% de sucrose et 2% de SDS ainsi qu'un colorant, le bleu de bromophénol. Les échantillons ont été chauffés à 95°C pendant 5 minutes pour dénaturer les protéines. Ils ont ensuite été déposés sur le gel qui se compose : d'un gel de séparation (Tris HCl SDS pH 8,8, acrylamide 40 %, eau ultra pure, APS 10 % et TEMED) et d'un gel de concentration (Tris HCl SDS pH 6,8, acrylamide 40%, eau ultra pure, APS 10 % et TEMED), la proportion d'acrylamide et d'eau a été modifiée selon les expériences. 5 µl de marqueur de masse moléculaire pré-coloré (Thermoscientific ; Pierce[®], Brebières, France) ont aussi été déposés. La migration s'est déroulée en présence de Tris 25 mM, de glycine 250 mM et de SDS à 0.05 %, à 70 Volts pendant 30 minutes pour le gel de concentration et à 110 Volts pendant 1 heure pour le gel de séparation.

Pour certaines expériences, des gels provenant d'un fournisseur (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) ont été utilisés. Ces gels ont permis d'optimiser les résultats obtenus notamment grâce à des gels à gradient qui sont des gels dont le pourcentage d'acrylamide augmente lors de la progression des protéines au travers du gel.

-Les gels de polyacrylamide Bis-Tris gradient 4-12% (NuPAGE[®] Novex, Bis Tris, Invitrogen)

Les protéines ont été préparées à l'aide du tampon échantillon et l'agent réducteur contenu dans le kit. Les échantillons ont ensuite été chauffés pendant 10 minutes à 70°C. Les échantillons et 5 µl de marqueur de masse moléculaire pré-coloré (Thermoscientific ; Pierce[®], Brebières, France) ont ensuite été déposés dans le gel préalablement rincé deux fois avec du tampon de migration contenu dans le kit. La migration s'est effectuée avec le tampon de migration et de l'antioxydant également contenu dans le kit, à 200 Volt pendant 35 minutes.

- Les gels de polyacrylamide Novex Tris-glycine gradient 4-20% (Invitrogen)

Les échantillons ont été préparés classiquement, puis déposés dans le gel préalablement rincé. 5 µl de marqueur de masse moléculaire pré-coloré (Thermoscientific ; Pierce[®]) ont

aussi été déposés La migration s'est déroulée en présence de Tris 15 mM, de glycine 150 mM et de SDS à 0.1 %, à 125 Volts pendant 90 minutes.

d) Western-Blot

Après la migration par électrophorèse en gel de polyacrylamide, les protéines ont été transférées en milieu liquide sur une membrane de PolyVinylDène Fluoride (Hybond™-P, Amersham Biosciences, Pantin, France) pré-activée dans du méthanol. Le transfert a été réalisé à voltage constant (70 Volts) pendant 1h30, en présence d'un tampon de transfert composé de Tris 25 mM, de glycine 192 mM, de SDS 0.01% et de l'éthanol 15%. Ensuite, les sites de fixation non spécifiques des membranes ont été bloqués pendant 1 heure à température ambiante avec du TBS-T (Tris 50 mM, NaCl 150mM et Tween 20 0,1%) et 5 % de lait déshydraté écrémé ou 1 % de BSA (*Bovine Serum Albumin*, Sigma-Aldrich, Lyon, France). La membrane a ensuite été mise en contact avec l'anticorps primaire pendant toute une nuit à 4°C sous agitation douce. Les principales caractéristiques des anticorps et leurs conditions d'utilisation sont résumées dans le tableau n°13.

Anticorps	Fournisseur	Dilution	Diluant
hKlk6	Santa Cruz Biotechnology, Feidelberg, Allemagne	1/1000	TBS-T 5% lait
E-Cadhérine soluble		1/500	
p-Erk		1/1000	TBS-T 1% BSA
Erk total			

Tableau 13 : Conditions d'utilisation et origine des différents anticorps utilisés.

Après 3 lavages de 10 minutes avec du TBS contenant 0,05 % de Tween 20 à température ambiante, la membrane a été mise en contact avec un anticorps secondaire couplé à une peroxydase, (IgG anti-souris, *Jackson immunoresearch*, Soffolk, Angleterre, ou IgG antilapin, *Santa Cruz*, Heidelberg, Allemagne), dilué au 1/5000^{ème} dans du TBS-T 5% lait. La membrane a été incubée pendant 2 heures à température ambiante sous agitation douce. Après 3 lavages de 10 minutes avec du TBS-T, l'activité peroxydasique des complexes immuns formés a été révélée en utilisant le kit ECI™ Western Blotting Analysis System (*Enhanced Chimiluminescence*, Amersham Biosciences, Pantin, France) conformément au protocole du

fournisseur. La membrane a été exposée avec un film photographique Hyperfilm™ ECI (Amersham Biosciences, Velizy-Villacoublay, France).

e) Bleu de coomassie

Des colorations de protéines au Bleu de Coomassie (*Imperial™ Protein Stain* ; Pierce, Thermo-Fisher Scientific, Illkirch, France) ont été réalisées dans le but de déterminer les protéines totales présentes dans les milieux de culture analysés.

Après la migration par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, le gel a été placé dans un récipient propre et lavé 3 fois pendant 5 minutes avec 100 mL d'eau ultra pure sous agitation douce. Ensuite, le gel a été mis en présence de Bleu de Coomassie (10 mL) sous agitation vigoureuse pendant une heure. Enfin, il a été soumis à 3 lavages de 30 minutes afin d'éliminer l'excès de colorant.

5. Dosage ELISA de KLK6

100 µL de l'anticorps monoclonal 8A8G3 (bioMérieux, Lyon, France) dirigé contre KLK6, dilué à 10µg/mL (soit 1µg par puit) dans un tampon Tris-Maléate pH 6,2 ont été déposés dans des puits d'une plaque de 96 puits (Maxisorp, *Nunc*, Dominique Dutscher, Brumath, France). Après 2 heures d'incubation à 37 °C, afin de permettre la fixation de l'anticorps, les puits ont été lavés 3 fois avec du TBS (Tris 0,05 M, NaCl 0,15 M) contenant 0,05 % de Tween 20 (TBS-T), puis ils ont été saturés toute la nuit à 4 °C avec du TBS contenant 2 mg/mL de BSA (Sigma-Aldrich). Les puits ont ensuite été lavés 3 fois avec du TBS-T. Puis, afin de réaliser la gamme étalon, 100 µL de proKLK6 purifiée et diluée dans un tampon adéquat (TBS-T seul ou 50 % de TBS-T et 50 % de milieu complet) à des concentrations finales comprises entre 0 et 10 ng/mL ont été placés dans les puits. Les échantillons à tester ont été dilués au ½ ou plus dans le tampon TBS-T. La plaque a été incubée pendant 2 h à 37°C. Les puits ont ensuite été lavés 3 fois avec du TBS-T avant l'ajout de l'anticorps monoclonal 3E3H9 biotinylé (bioMérieux) dilué à 0,1 µg/mL (soit 10 ng par puits) en TBS-T contenant 1 % de BSA. Après 2 h d'incubation à 37 °C, les puits ont à nouveau été lavés 3 fois en TBS-T. Ensuite, 100 µL d'alkaline phosphatase couplé à la streptavidine (Jackson immunoresearch) dilué à 50 ng/mL dans du TBS-T (soit 5 ng par puits) ont été ajoutés et incubés pendant 1 h à 37 °C. L'immunoréactivité des complexes formés a

été révélée après 3 nouveaux lavages en TBS-T, à l'aide de 100 μ L de substrat 4-méthylumbelliferyl phosphate (bioMérieux). La fluorescence émise a été mesurée toutes les 5 minutes pendant 30 minutes sur le lecteur de plaque Wallac VICTOR™² 1420 Label Counter (*Perkin Elmer™ life Sciences*, Massachusetts, USA) préalablement tempéré à 37°C (longueurs d'ondes : excitation : 355 nm, émission : 460 nm). Les résultats analysés sont les lectures obtenus après 15 minutes d'incubation avec le substrat.

Résultats

Chapitre I : Développement d'outils d'analyse

A. Obtention de clones stables sur-exprimant proKLK6

Afin d'étudier les effets de KLK6, nous avons choisi de développer des clones cellulaires exprimant stablement la kalllicréine 6 à partir de lignées cellulaires ne l'exprimant pas. Deux lignées ont été utilisées : la lignée HEK-293 et la lignée pulmonaire A549. Pour ce faire, nous avons utilisé le système Flp-In (Invitrogen).

I. Principe du système Flp-In

Ce système repose sur la capacité de la recombinaise *Flp* de levure à induire une recombinaison homologue entre deux sites de reconnaissance FRT (*Flp-In Recombinaison Target*). Ce système permet ainsi le transfert d'un gène situé dans un vecteur portant un site FRT (vecteur d'expression) à un locus cellulaire possédant également un tel site.

Etant donné que les sites FRT ne sont pas naturellement présents dans les cellules de mammifères, ils doivent être préalablement introduits dans le génome des cellules cibles. *Invitrogen* a développé une lignée HEK-293 possédant un site FRT (nommée HEK Flp-In), la lignée A549 Flp-In a, quant à elle, été créée au sein de l'équipe par intégration stable d'un vecteur portant la séquence FRT et un gène de résistance à la zéocine. Les deux lignées Flp-In sélectionnées ont un seul site FRT intégré dans une zone transcriptionnellement active de leur génome et sont résistantes à la zéocine (figure n°13).

Disposant de lignées Flp-In (figure n°13.1), il est alors possible d'introduire un transgène particulier au locus où se trouve le site FRT par une recombinaison homologue induite avec la recombinaise *Flp*. Pour cela, le transgène d'intérêt est cloné dans un vecteur d'expression possédant un site FRT puis les cellules sont co-transfectées avec ce vecteur d'expression et un vecteur codant la recombinaise *Flp* (Figure n°13.2). L'introduction conjointe dans une cellule Flp-In des deux vecteurs aboutie, avec une haute fréquence, à une intégration ciblée du transgène dans le génome de la cellule (Figure n°13.3). Cette recombinaison place le gène de résistance à l'hygromycine du vecteur d'expression sous la dépendance du promoteur SV40 préalablement responsable de la résistance des cellules à la

zéocine. Ceci modifie le phénotype des cellules transformées qui perdent leur résistance à la zéocine et acquièrent celle de l'hygromycine. Le nouveau phénotype permet alors une sélection très aisée des clones cellulaires ayant intégré le transgène au bon endroit. Les cellules transformées ayant toutes intégré le transgène au même endroit, les clones obtenus sont à priori isogéniques.

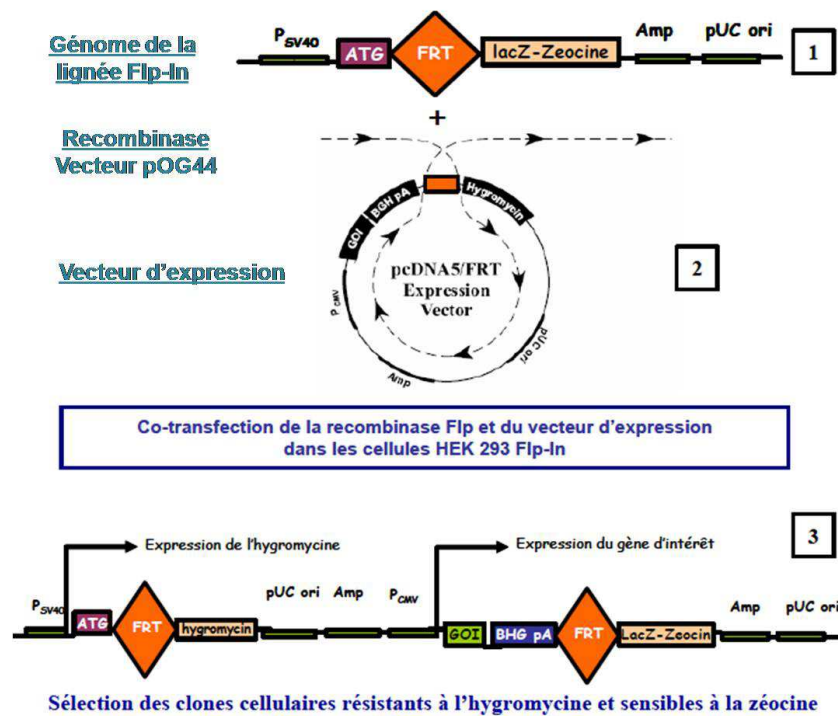


Figure 13 : Le système d'expression Flp-In.

3 éléments le compose : la lignée cellulaire Flp-In dans laquelle se trouve un site de recombinaison FRT ; un vecteur d'expression contenant le transgène et un site FRT ; un vecteur contenant le gène codant la recombinase de levure Flp nécessaire à la recombinaison des sites FRT. Légende 1 : désigne le génome des lignées Flp-In. 2 : désigne la recombinase Flp-In et le vecteur d'expression contenant le transgène. 3 : montre le génome de la lignée transformée après la recombinaison.

II. Construction des vecteurs d'expression codant KLK6

Dans ce système, la séquence codant la protéine d'intérêt est amplifiée par PCR puis intégrée au vecteur pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO. La carte du vecteur est illustrée dans la figure n°14. L'insertion de la séquence au sein du vecteur est réalisée grâce au système

« TOPO ». Ce système met en jeu une topoisomérase. L'intégration d'un résidu adénosine aux extrémités 3' des produits d'amplification lors de la PCR et la présence d'un résidu thymidine aux extrémités 3' du vecteur linéarisé permet à la topoisomérase de ligaturer l'ADNc codant la protéine d'intérêt avec l'ADN plasmidique.

L'introduction d'une séquence nucléotidique dans ce vecteur d'expression peut permettre l'expression d'une protéine chimère présentant à son extrémité C-terminale l'épitope V5 et une étiquette poly-histidine favorisant la détection et la purification de la protéine recombinante. Cependant, il a été observé au laboratoire que la présence d'une étiquette poly-histidine à la fin de la séquence de proKLK6 limite grandement l'activation de la kallicroïne 6. Les constructions qui ont été utilisées ont donc consisté à introduire la séquence codant la préproforme de KLK6 avec un codon stop empêchant la formation d'une protéine chimère.

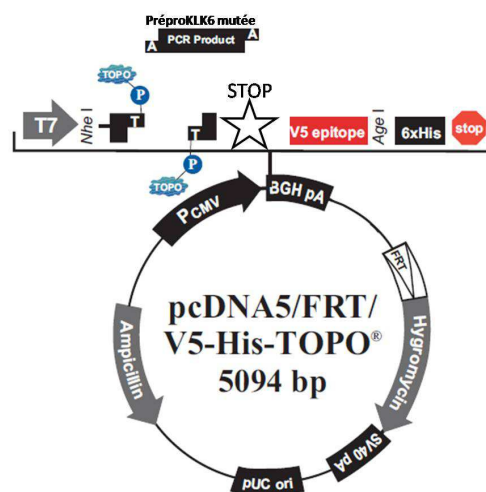


Figure 14 : Vecteur d'expression de la préproKLK6 mutée

L'ADNc codant la préproKLK6 mutée a été introduit dans le vecteur pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO. Légende TOPO : Topoisomérase ; T7 : promoteur ; BGH pA : site de clonage et de polyadénylation ; SV40 pA : site de polyadénylation ; pUC ori : origine de répliation pour les bactéries ; PCMV : promoteur CMV.

Deux types de construction ont été réalisées, l'une codant la prépro-KLK6 sauvage, l'autre pour une prépro-forme mutée de KLK6. Comme nous l'avons vu, KLK6 est une protéase à sérine qui est composée de 3 résidus absolument essentiels pour son activité. Ces 3 résidus appartiennent au site catalytique, y compris la sérine. Afin de disposer d'une forme non active de KLK6, l'équipe a réalisé une mutagenèse dirigée conduisant au remplacement

de la sérine₁₉₇ de KLK6 par une alanine. La figure n°15 montre la séquence codant la prépro-forme mutée qui a été clonée dans le vecteur pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO.

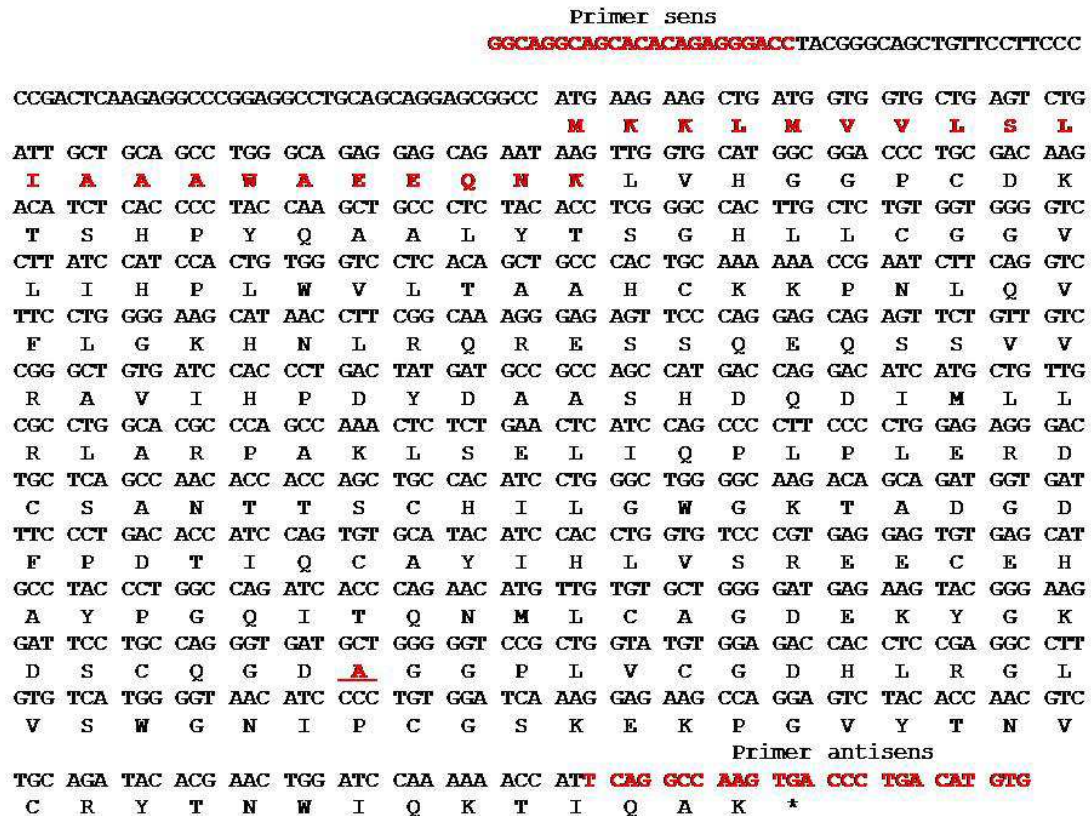


Figure 15 : Séquence nucléotidique et peptidique de préproKLK6 clonée.

La position des primers d'amplification est indiquée. Les acides aminés appartenant aux pré- et pro-peptides sont indiqués en gras. L'alanine substituée à la sérine du site catalytique est soulignée (Clone NM012909.08).

Après vérification des séquences se trouvant dans le plasmide d'expression, un clone plasmidique codant pour préproKLK6 sauvage (clone NH201410.04) et un autre codant la forme mutée (Clone NM012909.08) ont été amplifiés en bactéries puis purifiés en vue des transfections cellulaires.

III. Obtention des clones cellulaires transformés.

Des cellules HEK293 Flp-In et A549 Flp-In ont été co-transfectées avec le vecteur d'expression codant l'une ou l'autre forme de préproKLK6, et le vecteur pOG44 codant la recombinaise *Flp*. Les cellules ont ensuite été soumises pendant quelques semaines à une

pression de sélection avec de l'hygromycine. Les clones résistants ont ensuite été isolés et propagés dans des boîtes puis des flacons de culture de taille croissante.

Les clones cellulaires étant en principe isogéniques, nous avons sélectionné au hasard certains clones qui ont été numérotés et leurs numéros d'identification sont indiqués dans le tableau n°14.

Lignées d'origine	Forme exprimée	Nom du clone
HEK293 Flp-In	Prépro-KLK6 sauvage	H2
	Prépro-KLK6 mutée	B4 et B8
A549 Flp-In A11	Prépro-KLK6 sauvage	A3, A5 et A7
	Prépro-KLK6 mutée	B1 et B2

Tableau 14 : Numéro d'identification des clones.

En ce qui concerne les formes mutées de KLK6, l'idéal était d'obtenir des clones sur-exprimant la proKLK6 mutée à une même concentration que des clones sur-exprimant la proKLK6 sauvage afin de pouvoir comparer plus facilement les effets cellulaires. La production de certains clones a donc été évaluée par dosage ELISA et certains résultats sont illustrés dans la figure n°16.

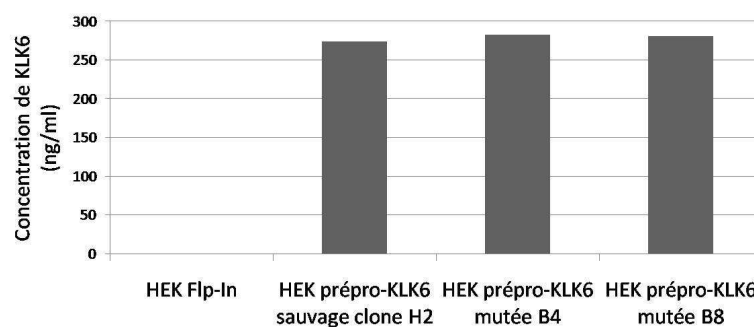


Figure 16 : Production de KLK6 des clones HEK.

Les clones ont étéensemencés à une même concentration cellulaire et cultivés en plaque 6 puits pendant 48h. La KLK6 produite a ensuite été dosée par ELISA.

La production des deux clones HEK B4 et B8 sur-exprimant la proKLK6 mutée est d'environ 280ng/ml, ce qui est équivalent à la production de KLK6 sauvage par le clone H2.

Dans ce cas, le fait que les taux de production des clones soient similaires est en accord avec la génération de lignées isogéniques par le système Flp-In.

L'obtention de clones mutants dans la lignée A549 Flp-In s'est avérée délicate. Comme le montre la figure n°17, les clones obtenus exprimant la forme mutée présentent un niveau d'expression plus de 20 fois plus faible que celui des clones exprimant la forme sauvage. Il apparaît donc que des événements indépendants du site d'intégration (méthylation, micro-réarrangement ?) puissent agir sur l'expression du transgène dans certains contextes cellulaires. Du fait de la grande disparité existant entre les deux types de clones, nous n'avons pas exploité les clones A549 exprimant la forme mutée de KLK6 dans l'étude.

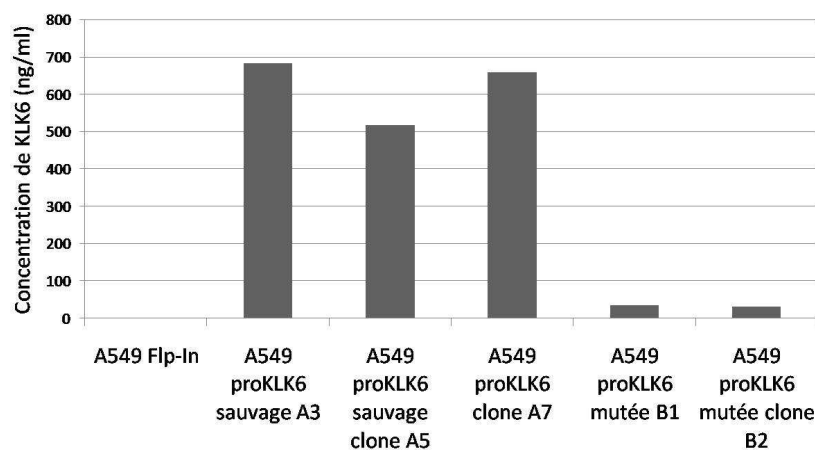


Figure 17 : Production de KLK6 des clones A549.

Les clones ont étéensemencés à une même concentration cellulaire et cultivés en plaque 6 puits pendant 48h. La KLK6 produite a ensuite été dosée par ELISA.

B. Production de KLK6 active

La protéase KLK6 commerciale disponible jusqu'à présent est faiblement active et nécessite pour son fonctionnement des concentrations salines très élevées (> 1M). Ces conditions d'utilisation la rendent peu utilisable pour des études cellulaires. Ces propriétés sont très probablement liées à la présence d'une étiquette poly-His placée en position C-terminale de la protéine recombinante. Nous avons donc développé une production de

protéine KLK6 non étiquetée afin d'éliminer ces problèmes. Les paragraphes suivants présentent les modalités d'expression et de purification de la KLK6 recombinante native.

I. Production et purification de proKLK6

1. Production de proKLK6

Pour produire de la KLK6, nous avons utilisé les cellules HEK293 Flp-In sécrétant de manière stable la proKLK6. Les cellules ont été cultivées dans des flasques de 150 cm² en présence d'un milieu dépourvu de protéines, le CD hybridoma, pendant 10 jours. Nous avons alors déterminé le taux de production à l'aide d'un test ELISA, ce taux était de 1mg/L de milieu de culture. Nous avons réalisé une production de 2,5 L qui a été concentrée en vue de la purification de la proKLK6.

2. Principe de la purification de proKLK6

La proKLK6 a été purifiée à l'aide d'une chromatographie échangeuse d'ions sur un appareil FPLC *ÄKTA purifier*. Cette technique repose sur l'affinité que les ions de la phase mobile ont pour les ions de charges opposés de la phase stationnaire. Cette phase stationnaire est une résine sur laquelle des groupements ioniques sont chimiquement liés tandis que la phase mobile est la solution à purifier. La proKLK6 ayant un point isoelectrique (pI) théorique de 6,4 ; elle se trouve chargée positivement à un pH inférieur à cette valeur. Il est alors possible de la fixer sur une colonne échangeuse de cations à un pH de 5,8. Les protéines fixées à la colonne peuvent être éluées progressivement en augmentant la force ionique (NaCl) du tampon d'éluion. En effet, les ions sodium entrent en compétition pour la fixation à la colonne et les protéines qui ont une faible densité de charge globale positive auront tendance à être éluées les premières, suivies de celles qui ont une plus grande densité de charge.

3. Purification de la proKLK6

Le concentrât du milieu de culture a été équilibré dans le tampon de dépôt puis déposées sur une colonne « HiTrapTM SP HP Cation exchange ». Après lavage de la colonne avec du tampon de dépôt, l'éluion des protéines fixées a été effectuée à l'aide d'un gradient

discontinu de chlorure de sodium (figure n°17). Les protéines éluées ont été détectées par une mesure de l'absorbance à 280nm et 120 fractions de 4 ml ont été collectées. La figure n°18 présente un profil d'élution type.

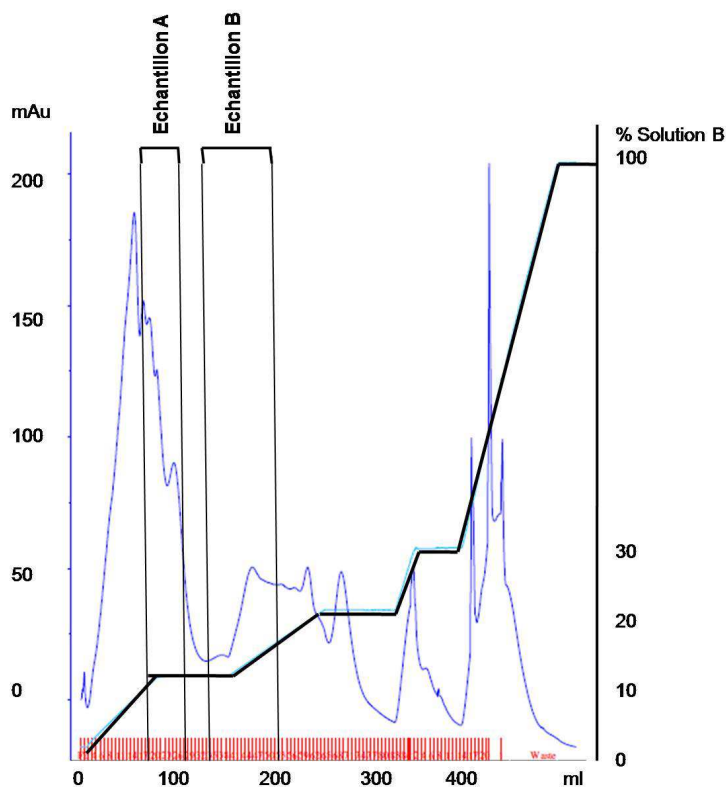


Figure 18: Profil d'élution des protéines du surnageant de culture de cellules HEK.

Les protéines contenues dans les surnageants de cultures ont été fixées sur une colonne échangeuse de cation. Les protéines ont ensuite été éluées grâce une augmentation croissante de solution B dans le tampon d'élution, cette solution contient du chlorure de sodium qui rentre en compétition avec les protéines pour la fixation sur la colonne.

En abscisse, il s'agit du volume de tampon d'élution passé sur la colonne. L'ordonnée de gauche indique l'absorbance en mAU (Unité de milli-absorbance), l'ordonnée de droite indique le pourcentage de tampon B (100% de tampon B = 1M de NaCl). La courbe grise représente les protéines éluées, la courbe noire représente le gradient en sels. A et B réfèrent aux échantillons analysés par la suite

Comme on peut le constater, les protéines éluées sont dispersées dans une large gamme de fractions. Afin de déterminer lesquelles contiennent la proKLK6, un Western-Blot a été effectué avec un anticorps anti-KLK6. Le résultat obtenu est montré sur la figure n°19.

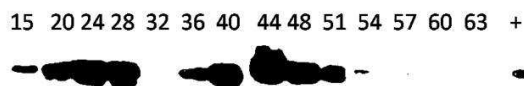


Figure 19 : Détection de la proKLK6 dans les fractions de purification.

Les numéros de fraction de purification sont indiqués au dessus, (+) étant un échantillon connu pour contenir de la KLK6

A l'aide du Western-Blot on a pu déterminer que les fractions immunoréactives contenant de la proKLK6 étaient les fractions 15 à 28 et 36 à 54. Il existe donc deux lots de KLK6 présentant des différences de charges puisque n'éluant pas avec la même concentration de NaCl. Les fractions de chaque lot ont été regroupées, les fractions 13 à 32 d'un volume total de 31 ml ont constitué l'échantillon A, tandis que les fractions 34 à 55 d'un volume total de 76ml ont constitué l'échantillon B. Ces deux échantillons ont été concentrés séparément afin d'obtenir un volume final de 7 ml puis la proKLK6 de chaque lot a été activée par addition de thermolysine. L'apparition d'une activité enzymatique de KLK6 a été vérifiée sur un aliquote à l'aide du substrat peptidique Boc-V-P-R-AMC. Le groupement AMC du substrat est un marqueur fluorescent activé après sa libération par une protéolyse de la liaison Arg-AMC par la KLK6.

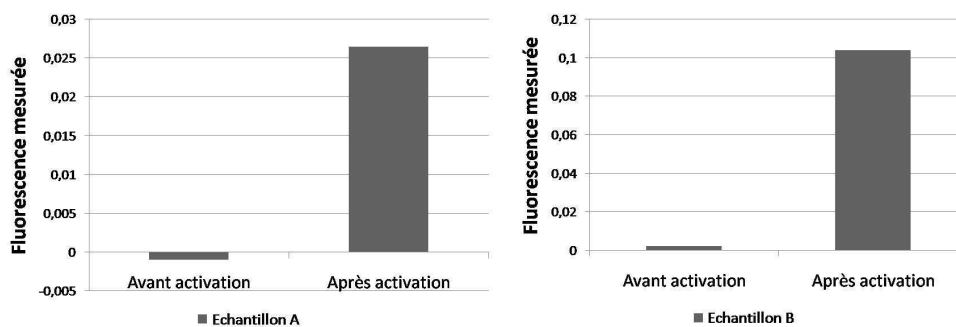


Figure 20 : Mesure de l'activité enzymatique de la KLK6.

La proKLK6 purifiée a été activée à l'aide de thermolysine. Cette activation a été vérifiée avec 1 μ l de chaque échantillon et la mesure de la fluorescence générée par le substrat Boc-V-P-R-AMC lors de son clivage a été mesurée. Les résultats sont représentés sous forme d'histogrammes, la mesure de la fluorescence en ordonnée, avant et après activation en abscisse.

Comme l'indique la figure n°20, l'incubation des fractions d'élution avec la thermolysine a fait apparaître une activité protéolytique liée à l'activation de proKLK6. A un volume égal, l'échantillon B s'est avéré nettement plus actif que l'échantillon A. Ces deux échantillons ne sont cependant pas purs et contiennent un mélange de proKLK6, de KLK6

mature et d'autres protéines. Ce mélange a donc été soumis à une deuxième étape de purification.

II. Purification de la KLK6 active

1. Purification de l'échantillon A

Cette seconde étape de purification a utilisé le même protocole de chromatographie échangeuse d'ions que l'étape 1. L'efficacité de cette seconde étape réside dans le fait que les fragments générés par la thermolysine voient leurs charges modifiées par rapport à la protéine intacte ce qui permet d'éliminer les contaminants de KLK6 (Oikonomopoulou et al. 2008). Ceci est illustré dans la figure n°21 où l'on observe 3 pics majeurs. Les pics latéraux contiennent des protéines contaminantes tandis que le pic central concentre la KLK6.

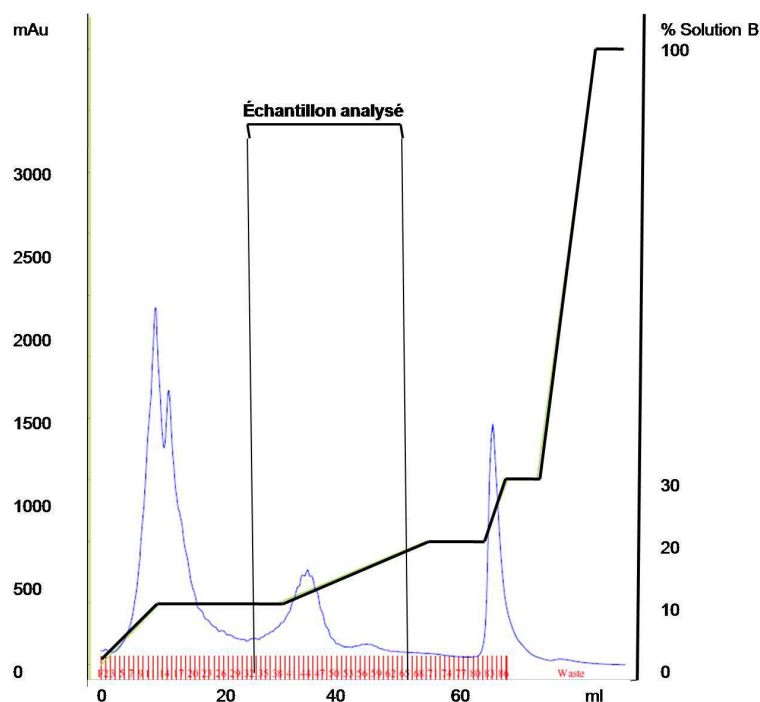


Figure 21 : Profil d'élution des protéines de l'échantillon A.

Les protéines contenues dans l'échantillon A ont été fixées sur une colonne échangeuse de cation. Les protéines ont ensuite été éluées grâce à une augmentation croissante de solution B dans le tampon d'élution qui traverse la colonne, cette solution contient du chlorure de sodium qui rentre en compétition avec les protéines pour la fixation sur la colonne.

En abscisse, il s'agit du volume de tampon d'élution passé sur la colonne. L'ordonnée de gauche indique l'absorbance en mAU (Unité de MilliAbsorbance), l'ordonnée de droite indique le pourcentage de tampon B (100% de tampon B = 1M de NaCl). La courbe grise représente les protéines éluées, la courbe noire représente le gradient en sels. L'échantillon analysé par la suite est indiqué sur la figure.

Les fractions se trouvant dans la zone du pic central ont été analysées au spectrofluorimètre en présence du substrat de KLK6 afin de rechercher son activité enzymatique. Comme le montre la figure n°22, l'activité de KLK6 se concentre dans les fractions 37 à 51.

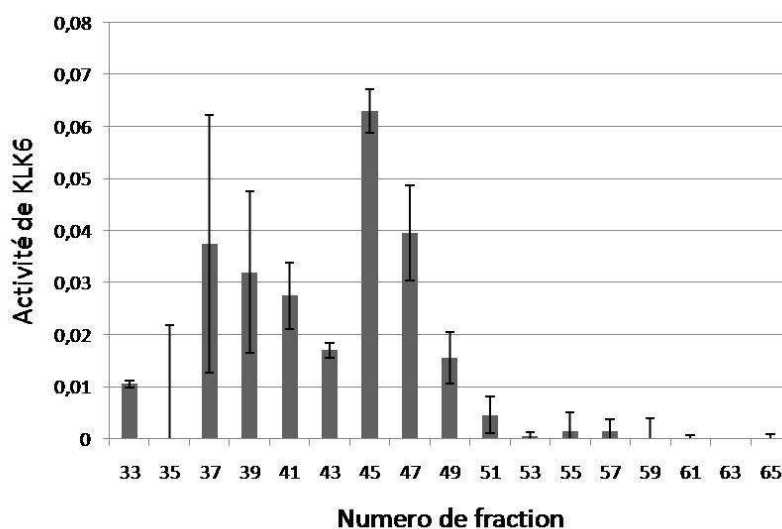


Figure 22 : Mesure de l'activité de KLK6 dans les fractions de purification de l'échantillon A. Cette activation a été vérifiée par la mesure de la fluorescence générée par le substrat Boc-V-P-R-AMC lors de son clivage par la KLK6. En abscisse, il s'agit des numéros de fractions de purification. En ordonnée, il s'agit de la fluorescence mesurée qui est proportionnelle à la quantité de substrat clivée par KLK6.

Afin de juger de la pureté des fractions d'intérêt, un aliquote des fractions a été soumis à une électrophorèse en condition dénaturante et les protéines ont été colorées au bleu de coomassie.

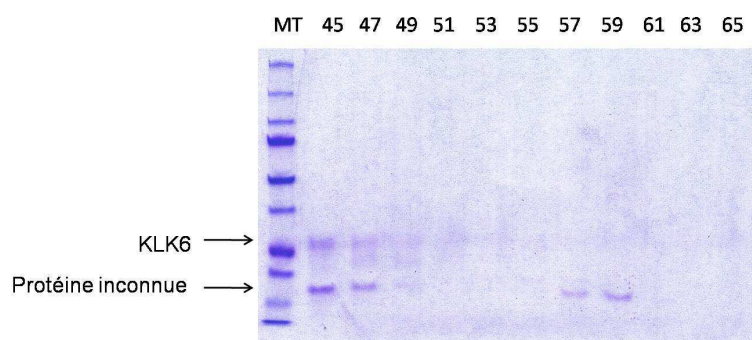


Figure 23 : Profil d'électrophorèse des protéines contenues dans les fractions de purification de l'échantillon A colorées au bleu de coomassie.

Les numéros des fractions de purification se situent au-dessus de l'image du gel. MT=marqueur de taille. Les protéines sont colorées en bleu foncé.

Comme le montre la figure n°23, les fractions d'intérêt contiennent bien de la KLK6 intacte mais également une autre protéine dont l'identité n'a pas été déterminée. Il est possible qu'il s'agisse d'un fragment de KLK6 issu d'un clivage interne de la protéine. Il est en effet connu que KLK6 a la capacité de s'autocliner (Bayes et al. 2004; Blaber et al. 2007; Magklara et al. 2003). Quoiqu'il en soit, la purification de l'échantillon A conduit à l'obtention d'une forme peu active de KLK6 et hétérogène.

2. Purification de l'échantillon B

La purification de l'échantillon B traité à la thermolysine a été effectuée de la même manière que pour l'échantillon A. Un profil d'éluion type est représenté sur la figure n°24.

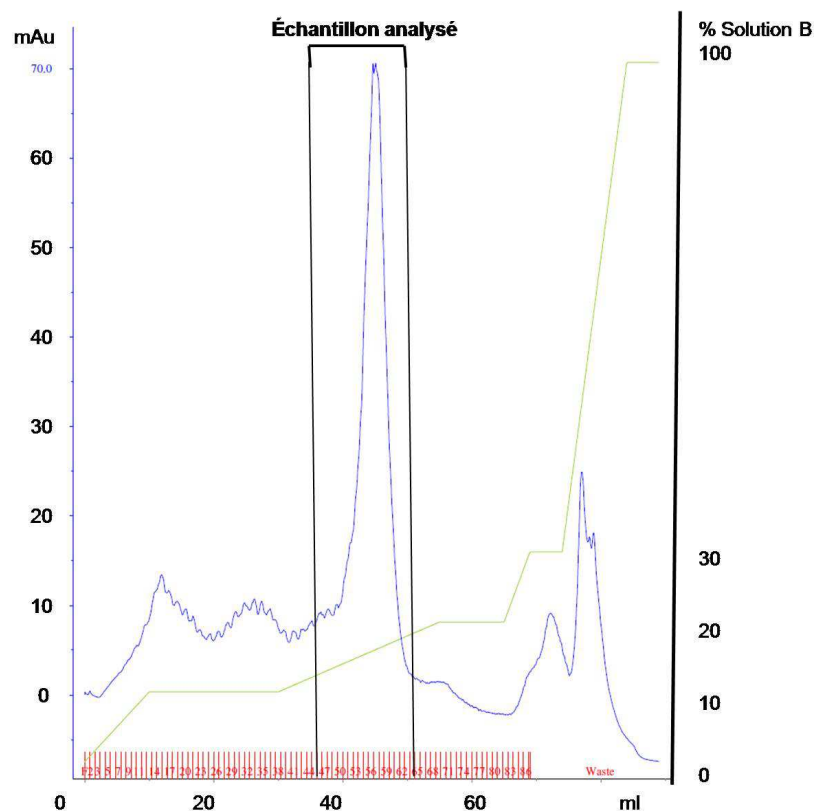


Figure 24 : Profil d'éluion des protéines de l'échantillon B.

Les protéines contenues dans l'échantillon B ont été fixées sur une colonne échangeuse de cation. Les protéines ont ensuite été éluées grâce à une augmentation croissante de solution B dans le tampon d'éluion qui traverse la colonne, cette solution contient du chlorure de sodium qui rentre en compétition avec les protéines pour la fixation sur la colonne.

En abscisse, il s'agit du volume de tampon d'éluion passé sur la colonne. L'ordonnée de gauche indique l'absorbance en mAU (Unité de MilliAbsorbance), l'ordonnée de droite indique le pourcentage de tampon B (100% de tampon B = 1M de NaCl). La courbe grise représente les protéines éluées, la courbe noire représente le gradient en sels. L'échantillon analysé par la suite est indiqué sur la figure.

L'activité enzymatique de KLK6 a été recherchée dans les fractions environnant le pic central à l'aide du substrat Boc-V-P-R-AMC comme décrit précédemment. Les résultats obtenus sont donnés sur la figure n°25.

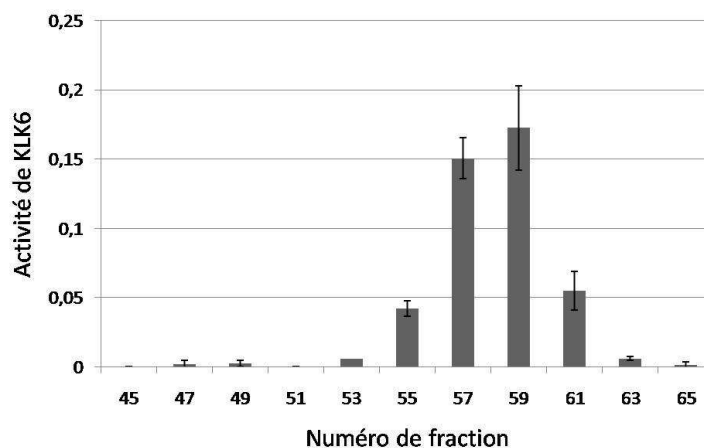


Figure 25 : Mesure de l'activité de KLK6 dans les fractions de purification de l'échantillon B. Cette activation a été vérifiée par la mesure de la fluorescence générée par le substrat Boc-V-P-R-AMC lors de son clivage par la KLK6. En abscisse, il s'agit des numéros de fractions de purification. En ordonnée, il s'agit de la fluorescence mesurée qui est proportionnelle à la quantité de substrat clivée par KLK6.

Une activité enzymatique correspondant à KLK6 a été observée dans les fractions 55 à 63 indiquant la présence d'enzyme active dans ces fractions. La pureté des fractions a ensuite été analysée par électrophorèse en conditions dénaturantes et les protéines ont été colorées au bleu de coomassie. La figure n°26 illustre les profils obtenus.

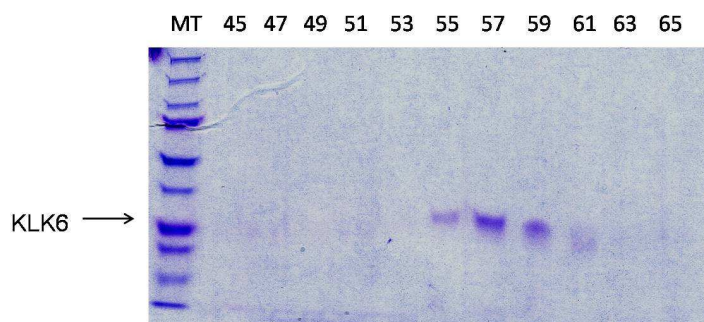


Figure 26 : Profil d'électrophorèse des protéines contenues dans les fractions de purification de l'échantillon A colorées au bleu de coomassie. Les numéros des fractions de purification se situent au-dessus de l'image du gel. MT=marqueur de taille. Les protéines sont colorées en bleu foncé.

Comme le montre la figure, les fractions 55 à 63 ne présentent qu'une seule bande correspondant à de la KLK6 active (d'après les résultats d'enzymologie). Ces fractions ont été regroupées et concentrées. C'est cet échantillon qui a été utilisé pour nos études expérimentales.

III. Rendement de la méthode

Afin de connaître le rendement de purification, la quantité de KLK6 a été mesurée à chaque étape du protocole à l'aide d'un test ELISA spécifique. Les résultats sont indiqués dans le tableau n°15.

Echantillon	Quantité de KLK6 (mg)	Pourcentage de KLK6 récupérée par rapport à l'échantillon de départ
Echantillon de départ	2,5	100
Echantillon de départ concentré	1,4	66
Echantillon A après purification et concentration	0,108	4,32
Echantillon B après purification et concentration	0,179	7,16
Total de KLK6 active final	0,287	11,48

Tableau 15 : Rendement de la purification de KLK6.

L'échantillon de départ (les surnageants de culture) avant et après concentration au travers d'un filtre « centricon ultra-filtration device », ainsi que les échantillons A et B après leur purification et concentration ont été analysés. La quantité de KLK6 totale présente dans les échantillons a été évaluée par un test ELISA et la perte de KLK6 par rapport à l'échantillon de départ a été calculée.

La concentration initiale a occasionnée une perte importante de KLK6 (près de 44%). A la fin de la purification, la quantité de KLK6 totale obtenue a été de 0,287 mg soit un rendement total de 11,5 % environ. Compte tenu du nombre d'étapes de purification et de concentration, ce rendement est acceptable.

Chapitre II : Etude de l'impact de la kalllicréine 6 sur des processus cellulaires

Les études précédentes du laboratoire (Heuzé-Vourc'h et al. 2009) indiquent que la kalllicréine 6 pourrait être impliquée dans la physiopathologie pulmonaire et notamment dans le cancer bronchique non à petites cellules. En effet, la présence de *KLK6* a été observée par immunohistochimie dans le cytoplasme des cellules d'adénocarcinomes et de carcinomes épidermoïdes de patients atteints de CBNPC. L'arbre bronchique sain présentait, quant à lui, une immunoréactivité dans les régions apicales des cellules épithéliales, les pneumocytes de types I et II étaient négatifs. De plus, une augmentation significative de l'expression de *KLK6* dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus sains a été démontrée et une analyse statistique a révélée que cette surexpression était indépendante de tous les paramètres physiopathologiques étudiés (type histologique, taille, degré de différenciation de la tumeur, stades du cancer). Les patients ont été classés en deux cohortes selon le niveau d'expression du gène *KLK6*, les patients exprimant *KLK6* à un niveau élevé présentaient un plus faible taux de survie que les patients exprimant faiblement ce gène. Afin de comprendre comment *KLK6* pouvait intervenir dans la progression du CBNPC, une lignée cellulaire A549 sur-exprimant la pro*KLK6* avait été créée au laboratoire. Ces cellules montraient une prolifération plus importante que les cellules A549 ne l'exprimant pas. Une analyse du cycle cellulaire a révélé qu'une surexpression de la kalllicréine 6 permettait une progression plus rapide dans le cycle cellulaire en accélérant la transition entre la phase G1 et S. Ce phénomène était accompagné d'une augmentation de la cycline E et de c-myc et d'une diminution de la protéine p21, des protéines régulatrices du cycle cellulaire.

L'objectif du travail présenté dans le chapitre II a été de déterminer de manière plus approfondie les effets cellulaires de la kalllicréine 6. Nous avons notamment étudié l'implication de l'environnement des cellules et de l'activité enzymatique de *KLK6* sur des processus cellulaires. De plus, nous nous sommes intéressés à l'aspect moléculaire en étudiant les voies de signalisation cellulaires pouvant être activées par la kalllicréine 6.

A. Etude de l'impact de la surexpression de la kallibréine 6 sur les comportements cellulaires

I. Impact de la kallibréine 6 sur la prolifération cellulaire

1. Effet de la kallibréine 6 sur la prolifération des cellules HEK

Les données préalablement obtenus dans le laboratoire révélaiet qu'une expression ectopique de la proKLK6 dans des cellules A549 provoquait une stimulation de la prolifération de ces cellules. A l'inverse, il a été rapporté que l'expression stable de proKLK6 dans des cellules tumorales mammaires avait un effet anti-prolifératif (Pampalakis et al. 2009). Nous avons donc voulu savoir ce qu'il en était dans un autre contexte cellulaire en étudiant les effets de l'expression de proKLK6 sauvage dans les cellules HEK293 à l'aide des clones stables décrits ci-dessus.

Les résultats précédents du laboratoire sur les cellules A549 avaient été obtenus par comptage journalier des cellules en cellule de Malassez. Dans cette étude, nous avons utilisé un test MTS dont la validité a été vérifiée en évaluant le comportement des cellules A549 exploitées précédemment.

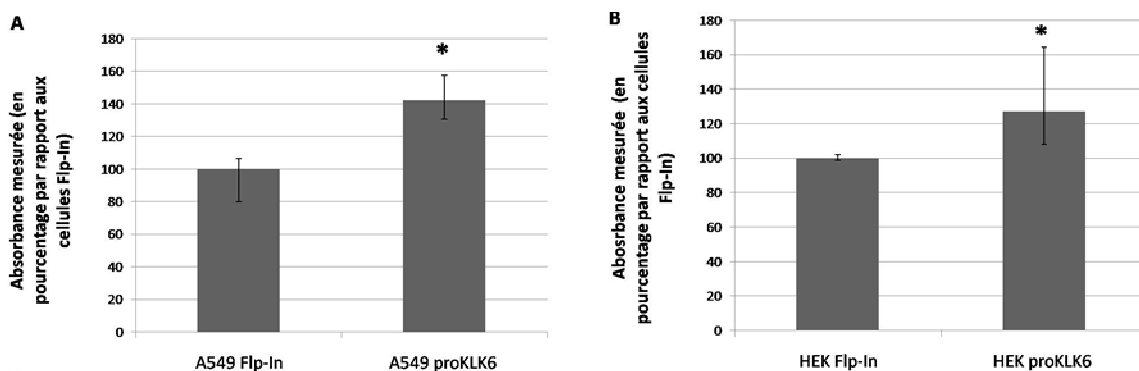


Figure 27 : Effet d'une expression ectopique de KLK6 sur la prolifération cellulaire des cellules A549 (A) et HEK (B).

Les cellules A549 et HEK ont étéensemencées à raison de 2500 et 5000 cellules, respectivement, par puits en P96. 48h après, un test MTS a été effectué. La mesure de l'absorbance est intervenue après 2h d'incubation avec le composé. L'absorbance mesurée est proportionnelle à la quantité de cellules viables et les valeurs obtenues sont indiquées en pourcentage, les valeurs obtenues pour cellules Flp-In étant le 100%. Les différences observées sont statistiquement significatives (test Mann et Whitney ($p < 0,05$)). Les cellules A549 ou HEK Flp-In parentales n'expriment pas KLK6 à l'inverse des cellules Flp-In transformées (A549 proKLK6 ou HEK proKLK6).

Comme le montre la figure n°27.A, l'analyse de la prolifération cellulaire des cellules A549 à l'aide du test MTS donne des résultats similaires à ceux mesurés précédemment par comptage. En effet, quelque soit la méthode d'analyse utilisée, l'expression de proKLK6 stimule la prolifération de cellules A549. Il en va de même pour les cellules HEK293 (figure n°27.B)

2. Influence du sérum sur la prolifération induite par KLK6

Différentes hypothèses pourraient expliquer les disparités entre la réponse décrite par Pampalakis et coll pour les cellules mammaires et celles que nous observons ici. On peut notamment se demander si l'environnement dans lequel baignent les cellules ne pourrait pas moduler l'action de KLK6. En effet, pour agir comme régulateur de la prolifération cellulaire, KLK6 pourrait utiliser des substrats présents ou non dans le milieu de culture. Il est également possible que l'effet de KLK6 dépende de la présence de quantité plus ou moins importante de protéases capables d'activer la proforme sécrétée ou à l'inverse d'inhibiteurs. *In vitro*, ces différents agents sont apportés par le sérum additionné au milieu de culture et par les cellules. Nous avons donc testé l'impact de différents sérums sur la réponse des cellules HEK293 et A549 à l'expression ectopique de proKLK6 (Figure n°28).

Comme le montre la figure, il n'y a aucune différence dans la réponse des cellules HEK293 selon le sérum utilisé. Dans tous les cas, la sécrétion de proKLK6 entraîne une stimulation de la prolifération cellulaire. Pour les cellules A549, on peut constater que le milieu de culture influence les effets de la proKLK6. En effet, pour les sérums A et B, les cellules exprimant proKLK6 montrent une stimulation de la prolifération cellulaire. A l'inverse, on observe une inhibition de la prolifération lors d'une culture avec le sérum C. L'environnement dans lequel baignent les cellules influence donc la réponse de ces cellules à KLK6 soit via des facteurs interagissant directement avec la protéine soit en rendant les cellules plus ou moins sensibles à l'action de KLK6.

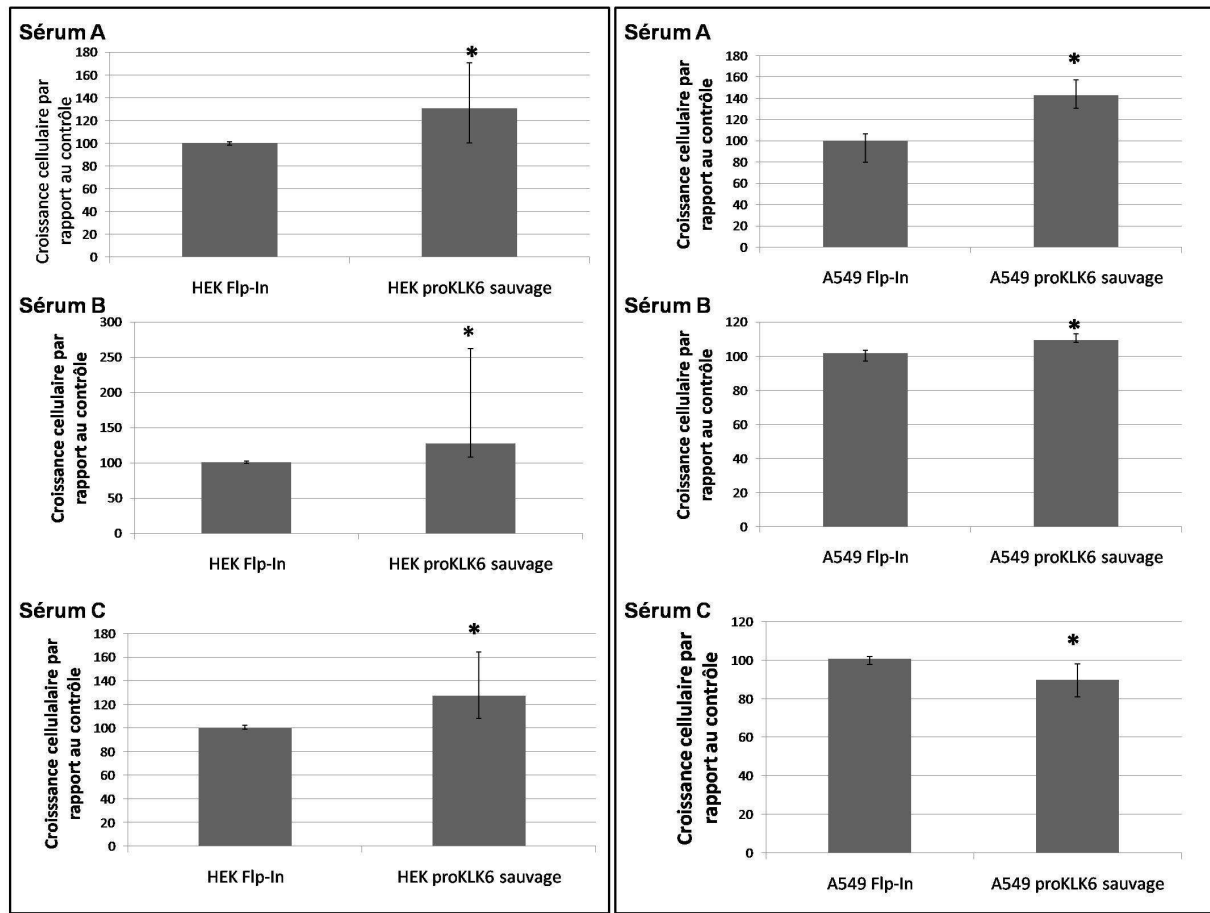


Figure 28 : Prolifération des cellules HEK (gauche) et A549 (droite) sur-exprimant ou non la proKLK6 sauvage dans différents sérums.

Les cellules HEK et A549 ont étéensemencées à raison de 5000 cellules et 2500 cellules, respectivement, en plaque 6 puits. Les milieux de culture ont été composés soit de sérum A (haut), de sérum B (milieu) ou C (bas). Après 48h de culture un test MTS a été effectué. L'absorbance mesurée est proportionnelle à la quantité de cellules viables et les valeurs obtenues sont indiquées en pourcentage avec pour 100% les valeurs enregistrées pour les cellules Flp-In (* : Statistiquement significatif, test Mann et Whitney ($p < 0,05$))

3. L'implication de l'activité enzymatique de KLK6 dans l'induction de la prolifération cellulaire

Les expérimentations décrites ci-dessus ne nous permettent pas de définir si l'effet de KLK6 est dû ou non à son activité enzymatique. Dans nos systèmes cellulaires, KLK6 est exprimée en tant que prépro-enzyme. Comme c'est généralement le cas, le clivage du peptide signal intervient au cours du processus de sécrétion et c'est la proforme de KLK6 qui est sécrétée dans le milieu extracellulaire (Heuze-Vourc'h et al. 2006). Les effets de KLK6 pourraient donc être dus soit à la proforme sécrétée, soit à de l'enzyme maturée dans le milieu extracellulaire. Pour savoir si l'induction de la prolifération cellulaire nécessite ou non

l'activité enzymatique de KLK6, nous avons étudié l'impact du mutant Ser→Ala décrit précédemment sur la prolifération des cellules HEK-293.

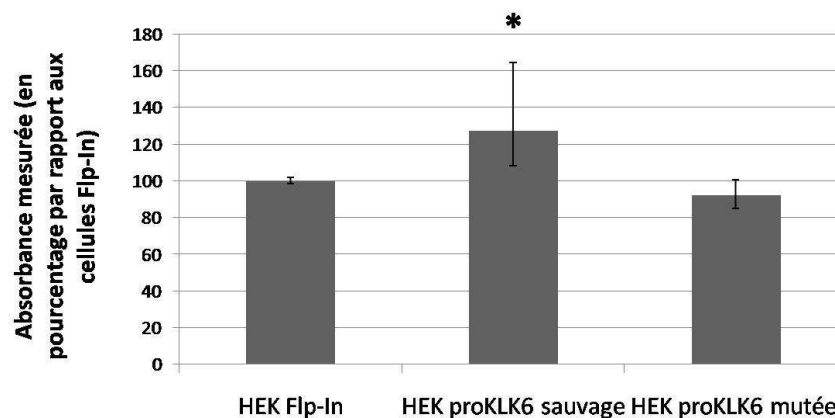


Figure 29 : Effets comparés de la KLK6 sauvage ou mutée sur la prolifération cellulaire.
 Les cellules ont étéensemencées à raison de 5000 cellules par puits en P96. 48h après un test MTS a été effectué, la mesure de l'absorbance s'est effectuée après 2h d'incubation avec le composé. L'absorbance mesurée est proportionnelle à la quantité de cellules viables et les résultats sont indiqués en pourcentage, les cellules Flp-In étant le 100%. Les différences sont statistiquement significatives (test Kruskal et Wallis ($p < 0,05$)).

Comme le montre la figure n°29, l'expression du mutant où la sérine du site catalytique a été remplacée par une Alanine n'a aucun effet sur la prolifération des cellules contrairement à la forme sauvage de KLK6. L'inactivation de KLK6 supprime donc son effet pro-prolifératif.

II. Effet de KLK6 sur la survie cellulaire

KLK6 pourrait également agir sur la progression tumorale en régulant l'apoptose, également appelée mort cellulaire programmée. Afin d'examiner ce point, les clones sur-exprimant ou non KLK6 ont été soumis à un inducteur de l'apoptose : la staurosporine. Cette molécule agit de manière non sélective sur la majorité des Serine-Thréonine kinases, engendrant la mort cellulaire. Nous avons donc déterminé si une expression ectopique de KLK6 pouvait moduler la mort cellulaire induite par la staurosporine. Seules les cellules A549 ont pu être analysées puisque les expériences permettant d'analyser l'apoptose nécessitaient une culture sans SVF et beaucoup d'étapes de lavage, des conditions auxquelles les cellules HEK sont très sensibles. Deux approches ont été utilisées pour mesurer l'effet de KLK6. Dans la première approche, nous avons utilisé le test apostain qui permet de

déterminer la proportion de cellules apoptotiques par cytométrie en flux. Avec ce test, les cellules apoptotiques sont identifiées à l'aide d'un anticorps couplé à un fluorochrome qui détecte l'ADN simple brin. En effet, les cellules apoptotiques sont plus sensibles à la dénaturation de l'ADN par la chaleur. Afin de mesurer la totalité des cellules, il est effectué un autre marquage avec du 7-AAD qui est un marqueur des acides nucléiques. Le deuxième test utilisé permet la détection des nucléosomes libérés dans le cytoplasme lors de l'apoptose. Pour cela, une lyse des cellules est effectuée et les nucléosomes cytoplasmiques sont capturés grâce à un anticorps anti-histones fixés au fond d'une plaque ELISA. La détection des nucléosomes s'effectue à l'aide d'un second anticorps reconnaissant l'ADN. Cet anticorps secondaire est couplé à la peroxydase qui en présence du substrat ABTS permet la formation d'un produit coloré pouvant être quantifié par la mesure de l'absorbance.

Dans un premier temps, nous avons utilisé le test apostain pour déterminer la sensibilité des cellules A549 Flp-In et A549 KLK6 à différentes concentrations de staurosporine. La figure n°30 montre des profils types de dispersion des cellules

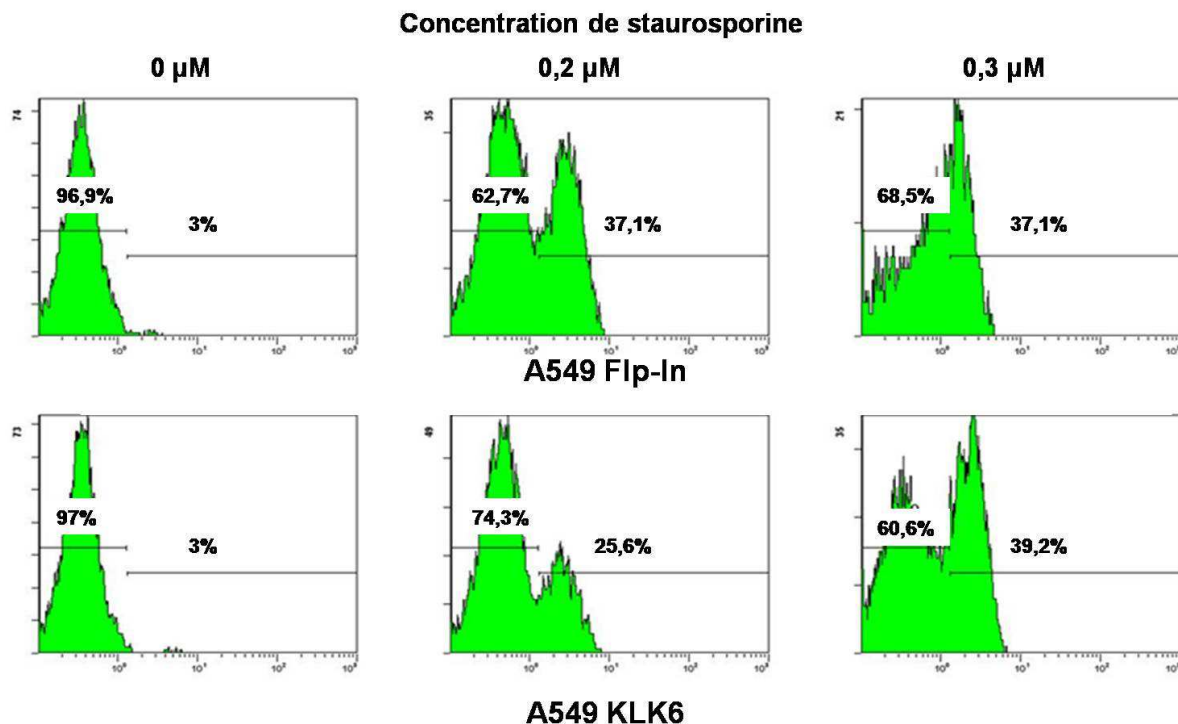


Figure 30 : Dose-Réponse des cellules A549 Flp-In et pro KLK6 à la staurosporine.

Les cellules A549 Flp-In et proKLK6 ont été cultivées en présence de 0 ; 0,2 ou 0,3 µM de staurosporine. Un marquage fluorescent indirect de l'ADN simple brin a été effectué. L'intensité de la fluorescence a été évaluée par cytométrie en flux. Les résultats présentés sont les diagrammes de dispersion des cellules mesurés par le cytomètre avec en abscisse la fluorescence mesurée et en ordonnée la proportion de cellules analysées (R) .

En l'absence de staurosporine très peu de cellules émettent une fluorescence due à l'anticorps détectant l'ADN simple brin (R = 3%), ce qui indique que les cellules sont viables. A 0,2µM de staurosporine, on peut observer un deuxième pic correspondant à une émission de fluorescence par un groupe de cellules qui sont les cellules apoptotiques (R = 25-37 %). A 0,3 µM, le premier pic correspondant aux cellules viables est presque inexistant chez les cellules A549 Flp-In sans que pour autant il y ait une augmentation de la proportion mesurable de cellules apoptotiques. Ceci est dû au fait que les cellules étaient à un stade trop avancé de l'apoptose pour être détectées par le test apostain. Par la suite, nous avons donc utilisé une concentration de 0,2µM de staurosporine pour l'induction de l'apoptose qui a été mesurée avec les deux tests.

Les résultats obtenus avec le test apostain et le test ELISA sont présentés dans la figure n°31.

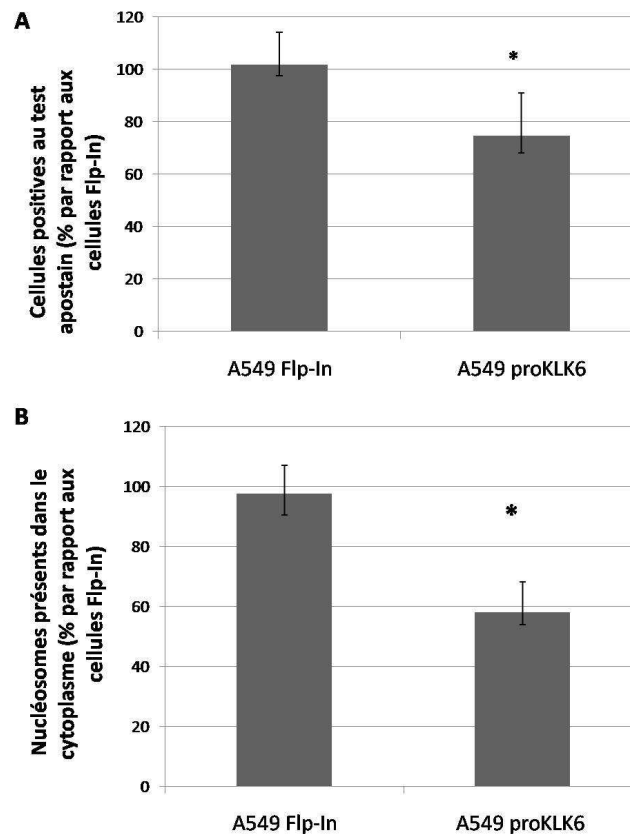


Figure 31 : Effet d'une surexpression de *KLK6* sur l'apoptose induite par la staurosporine. Les cellules A549 Flp-In et proKLK6 en présence de staurosporine pendant 24h, puis les cellules apoptotiques ont été détectées par A : la détection de l'ADN simple brin par cytométrie en flux (test apostain) ; B : la détection des nucléosomes présents dans le cytoplasme par test ELISA. Les différents résultats sont indiqués en pourcentage par rapport aux cellules Flp-In sous forme d'histogrammes. Les différences observées sont significatives (test de Mann et Whitney, $p < 0,05$).

Les deux approches montrent que l'expression ectopique de *KLK6* diminue la mort cellulaire induite par la staurosporine. *KLK6* aurait donc une action anti-apoptotique sur des cellules pulmonaires.

B. *KLK6* et signalisation cellulaire

Nous avons vu précédemment que *KLK6* intervenait au niveau cellulaire en régulant la prolifération et l'apoptose. Ce changement de l'activité cellulaire induit par *KLK6* implique que ces cellules reçoivent un ou des stimuli et transduisent leur reconnaissance pour induire la prolifération et la résistance à l'apoptose. Dans cette partie de l'étude, nous avons cherché à comprendre quels étaient les processus moléculaires impliqués.

Il est à noter que les études de cette partie n'ont été effectuées que sur les cellules A549. En effet, les cellules HEK sont issues de cellules embryonnaires de rein humain tandis que la lignée A549 est issue d'un carcinome bronchiolo-alvéolaire. Ces cellules permettent donc de mieux évaluer l'influence de la KLK6 dans la progression tumorale du cancer du poumon, elles sont également plus facilement manipulables.

I. Etude de la voie E-cadhérine/ β -caténine

Klucky et ses collaborateurs ont montré que la présence de KLK6 dans le milieu de culture de kératinocytes de souris stimule la prolifération, la migration et l'invasion de ces cellules (Klucky et al. 2007). Ces réponses semblent liées à un clivage de l'E-cadhérine membranaire et à une délocalisation de la β -caténine dans le noyau. L'E-cadhérine est un des membres les plus étudiés de la famille des cadhérines. Il s'agit d'une famille responsable de l'adhérence calcium-dépendante des cellules. Le domaine carboxyl cytoplasmique de ces molécules est associé à un groupe de protéines du cytosol appelé caténine. L'E-cadhérine se fixe directement à la β -caténine et à l' α -caténine qui la relie à l'actine du cytosquelette. La β -caténine joue d'autres rôles que celui évoqué ci-dessus. En effet, lorsque la β -caténine est activée, elle a la capacité de se délocaliser vers le noyau où elle agit comme facteur de transcription en se fixant sur le promoteur TCF/LEF. Ce promoteur régule de nombreux gènes dont les gènes de c-myc (He et al. 1998) et de la cycline D1 (Shtutman et al. 1999; Tetsu and McCormick 1999). Or il se trouve que les travaux précédents du laboratoire ont révélé qu'une expression ectopique de proKLK6 dans les cellules A549 est associée à une augmentation de c-myc (Heuzé-Vourc'h et al. 2009). Nous avons donc voulu savoir si les effets de KLK6 sur ces cellules étaient ou non liés à un clivage de l'E-cadhérine et à une translocation nucléaire de la β -caténine.

1. Effet de KLK6 sur l'expression génique de l'E-cadhérine et de la β -caténine

L'expression des ARNm a été analysée par qRT-PCR. Les changements relatifs de l'expression ont été calculés à partir de la méthode comparative des Ct ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). Cette méthode permet de comparer les signaux de PCR du transcrit recherché entre les cellules non traitées (A549 Flp-In) et traitées (A549 proKLK6).

La fiabilité des résultats de PCR quantitative en temps réel repose notamment sur 2 paramètres importants : l'efficacité d'amplification et sa spécificité. La courbe d'efficacité permet de savoir si à chaque cycle de PCR il y a bien doublement du nombre d'amplicon (efficacité de 100%). En effet, différents éléments peuvent altérer l'efficacité d'une PCR : présence d'inhibiteurs, amorçage inefficace, épuisement de réactifs... Pour déterminer l'efficacité de la qPCR, tous les échantillons ont été mélangés et une dilution en série a été effectuée. Le Ct de chaque dilution a été mesuré, l'efficacité de la PCR a ensuite été déterminée par le logiciel du *LightCycler 480*. Brièvement, une droite reliant le Ct déterminé pour chaque dilution en fonction du logarithme de la quantité de matrice (en considérant que l'échantillon non dilué est égale à 1) a été tracée. L'efficacité a été calculée à partir de la pente de la droite selon la formule : $E=10^{(-1/pente)}$. On considère que l'efficacité est bonne si celle-ci se trouve dans l'intervalle 90-110%. Les figures n° 32.A illustrent les résultats obtenus pour le dosage de l'E-cadhérine et de la β -caténine. Dans les deux cas, on peut constater que les valeurs d'efficacité sont satisfaisantes car elles sont de 90% et 97% respectivement. Un dosage correct doit également aboutir à l'obtention d'une seule population de produits de PCR. Ceci est vérifié par la détermination d'une courbe de fusion des amplicons en fin de PCR. La présence d'un seul pic témoigne alors de l'existence d'une seule population de produits de PCR. Les figures n°32.B montrent les courbes de fusion obtenues pour les dosages de la β -caténine et de l'E-cadhérine dans les différents échantillons testés et révèlent une bonne spécificité des dosages.

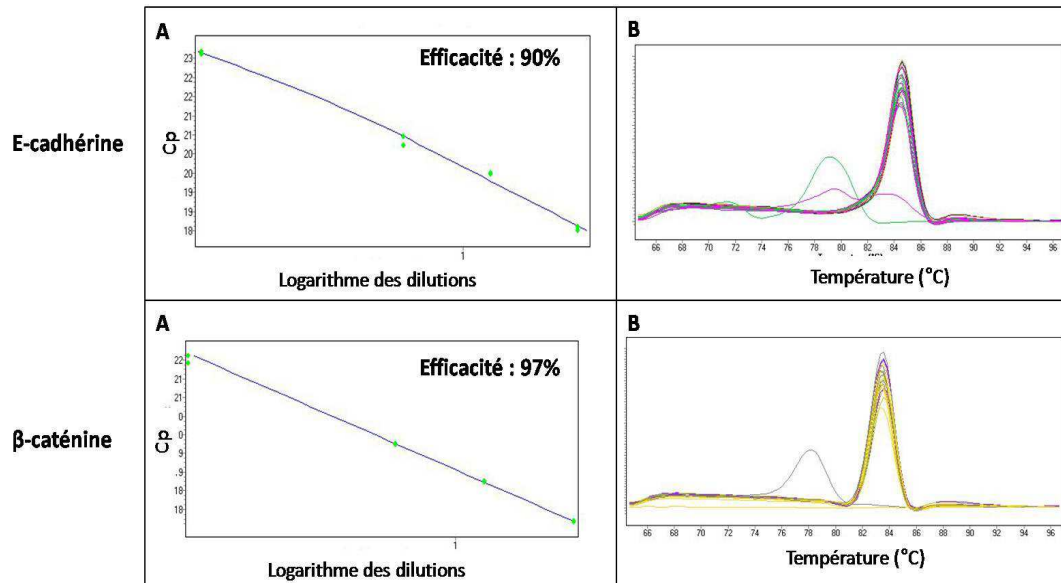


Figure 32 : Validation des méthodes : courbe d'efficacité (gauche) et courbe de fusion (droite) des gènes de l'E-cadhérine (haut) et de la β -caténine(bas).
 Les ARNm ont été obtenus après une étape de purification à partir de cellules cultivées avec du milieu complet. Les ADNc obtenus par retrotranscription ont été analysés par qPCR. Légende : (A) mesure de l'efficacité de la PCR ; (B) courbe de fusion de la qPCR.

La figure n°33 montre l'expression relative de la β -caténine et de l'E-cadhérine des cellules A549 exprimant proKLK6 par rapport aux cellules Flp-In.

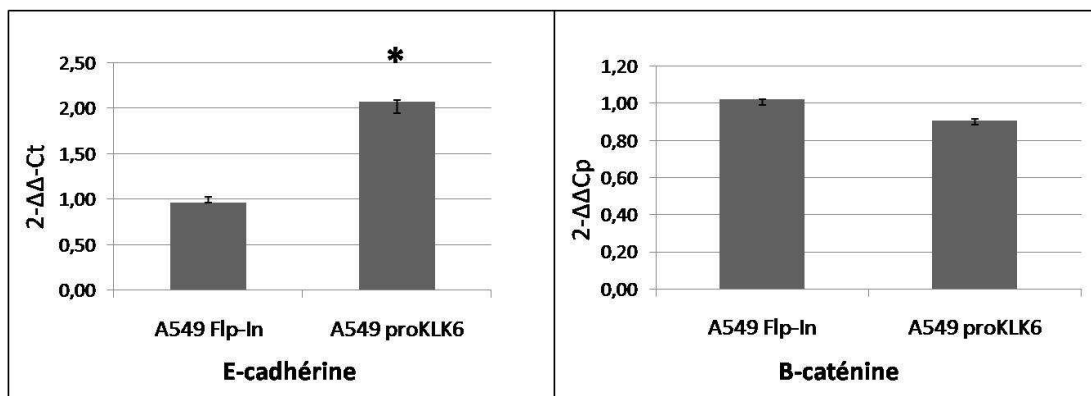


Figure 33 : Expression des transcrits de l'E-cadhérine (gauche) et de la β -caténine (droite) par PCR en temps réel.
 Les ARNm ont été extraits et purifiés à partir de cellules cultivées dans du milieu complet. Les ADNc obtenus par retrotranscription ont été analysés par qPCR.

On peut constater que les cellules exprimant proKLK6 ont un taux deux fois plus élevé de transcrits de l'E-cadhérine que les cellules ne l'exprimant pas. Par contre, il n'y a qu'une

très faible variation de l'expression de la β -caténine qui peut difficilement être prise en compte connaissant les limites de la technique de PCR.

2. Effet de KLK6 sur l'expression protéique de l'E-cadhérine

Comme évoqué précédemment, KLK6 agirait sur les cellules fibroblastiques de souris en provoquant directement ou indirectement le clivage de l'E-cadhérine membranaire et la translocation nucléaire de la β -caténine. Afin d'évaluer s'il en va de même pour les cellules pulmonaires, nous avons analysé par cytométrie en flux le niveau d'E-cadhérine membranaire et nous avons également recherché, dans les milieux de culture par western blot, le fragment soluble de l'E-cadhérine généré par protéolyse. Comme le montre la figure n°34, l'expression de proKLK6 ne diminue pas la quantité d'E-cadhérine présente à la surface des cellules A549. Au contraire, une légère augmentation est observée sans toutefois s'avérer statistiquement significative. Cette tendance à l'augmentation est à mettre en parallèle avec nos résultats de qPCR montrant que l'expression de KLK6 s'accompagne d'une élévation du nombre de transcrits de l'E-cadhérine.

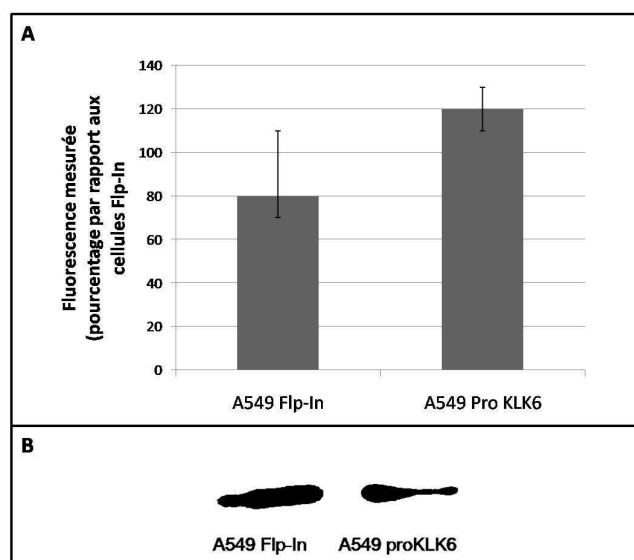


Figure 34 : Détection de l'E-Cadhérine membranaire et soluble.

(A) Les cellules ont été cultivées en milieu complet puis la présence de E-Cadhérine à la surface des cellules a été testée par un marquage indirect du domaine extracellulaire de l'E-cadhérine par des anticorps. Sa présence a ensuite été détectée par cytométrie en flux. Les fluorescences mesurées ont été utilisées pour quantifier les signaux et les résultats ont été normalisés avec pour 100% la moyenne des résultats obtenus pour les cellules A549 Flp-In. Les histogrammes représentent la médiane des résultats normalisés. Le contrôle IgG a directement été soustrait des résultats obtenus (test Mann et Whitney, $p < 0,05$). (B) Les cellules ont été cultivées dans du milieu sans sérum. La présence d'E-cadhérine dans les surnageants a été détectée par western-blot en utilisant un anticorps reconnaissant le fragment soluble de l'E-cadhérine avec 30 μ g de protéines totales par puits.

L'analyse par western blot des surnageants de culture n'a pas permis de mettre en évidence une augmentation de la quantité du fragment soluble de l'E-cadhérine. Les données recueillies n'appuient donc pas l'hypothèse d'une action de KLK6 entraînant le clivage de l'E-cadhérine.

3. Effet de la kallibréine 6 sur la β -caténine

a) Localisation cellulaire de la β -caténine

Malgré l'absence apparente d'action protéolytique directe ou indirecte de KLK6 sur l'E-cadhérine, nous avons voulu savoir s'il existait des altérations au niveau de la β -caténine. Pour cela, la localisation de la β -caténine dans les cellules A549 Flp-In et proKLK6 à confluence a été examinée par immunofluorescence (figure n°35).

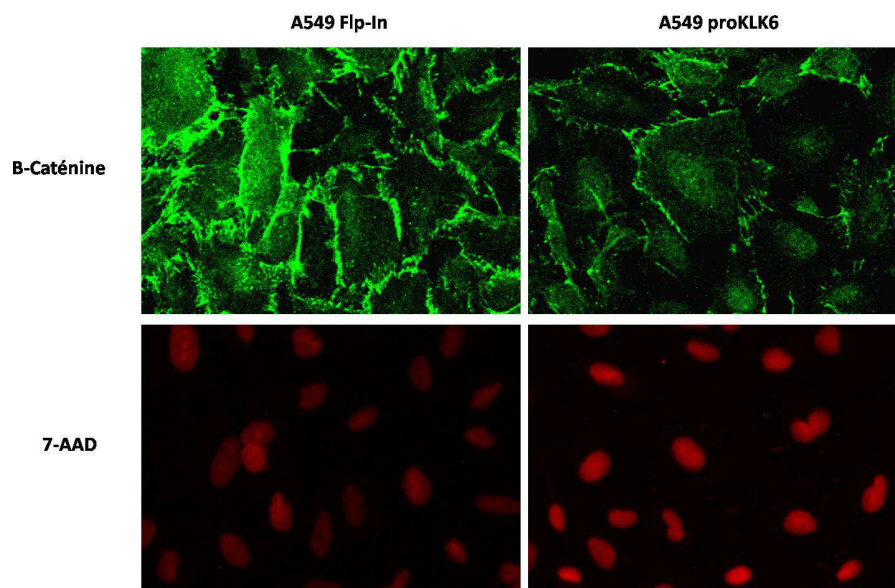


Figure 35 : Immunodétection de la β -caténine.

Analyse par immunofluorescence indirecte des cellules A549 Flp-In (gauche) et proKLK6 (droite) en utilisant un anticorps dirigé contre la β -caténine (vert). Les noyaux ont été marqués avec du 7AAD (rouge).

L'anticorps dirigé contre la β -caténine permet de mettre en évidence une localisation essentiellement membranaire de cette molécule dans les cellules A549 Flp-In. Au contraire, les cellules A549 proKLK6 montrent une diminution de ce marquage membranaire parallèlement à une augmentation du marquage nucléaire. Il semble donc que l'expression de

KLK6 entraîne une dissociation de la β -caténine d'avec la membrane et son transfert au niveau nucléaire.

b) Mesure de l'activité transcriptionnelle de la β -caténine

➤ Présentation de la méthode

Afin de savoir si la β -caténine transférée au niveau nucléaire était transcriptionnellement active, nous avons utilisé un système de « gène rapporteur ». Cette étude a été réalisée en collaboration avec l'Unité INSERM UMR991 de Rennes. Ce système est basé sur l'expression de la luciférase qui catalyse l'oxydation de la luciférine pour générer de la luminescence. Dans ce système le gène codant la luciférase a été placé sous la gouvernance du promoteur TCF/LEF activable par la β -caténine. La figure n°36 présente le vecteur utilisé ici.

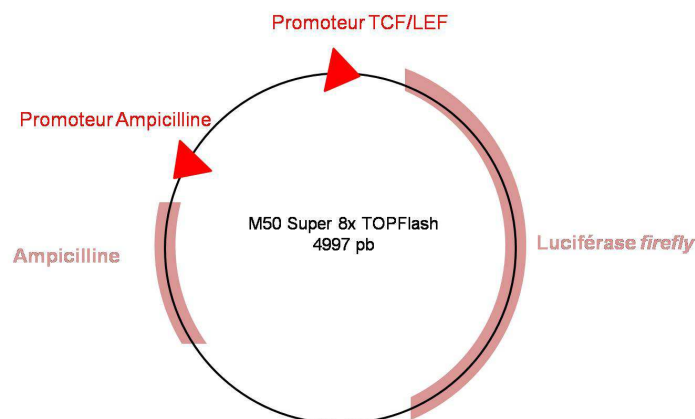


Figure 36 : Plasmide codant la luciférase *firefly* sous la dépendance du promoteur TCF/LEF activable par la β -caténine (Addgene).

Les cellules ont été transfectées avec ce vecteur codant la luciférase *firefly* afin de mesurer l'activité transcriptionnelle du promoteur TCF/LEF et indirectement l'activité de la β -caténine. Afin d'éviter les différences de luminescence qui pourraient être dues à une différence dans le nombre de cellules transformées, les cellules ont également été transfectées avec un plasmide codant la luciférase *Renilla* sous la dépendance d'un promoteur permettant l'expression constitutive de ce gène. La réponse du promoteur TCF/LEF a été normalisée avec le niveau d'expression constitutif.

➤ Résultats obtenus

Dans un premier temps, le système a été évalué en testant la réponse des cellules à un inducteur de translocation de la β -caténine, la protéine Wnt3a. Comme le montre la figure 36, l'incubation avec Wnt3a des cellules A549 exprimant proKLK6 stimule fortement l'expression du gène rapporteur. Les réponses observées sont bien dû à l'induction du promoteur TCF-LEF puisque Wnt3a ne stimule pas l'expression de la luciférase *firefly* lorsque les cellules sont transfectées avec un promoteur TCF-LEF inactif (figure n°37). L'approche utilisée permet donc bien de mesurer l'activité transcriptionnelle de la β -caténine dans notre système cellulaire.

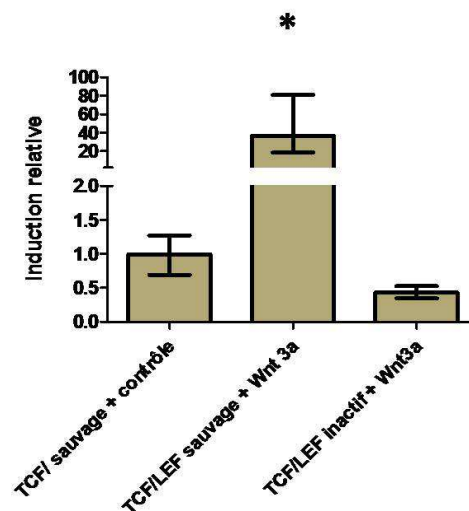


Figure 37 : Mesure de l'activité transcriptionnelle de la β -caténine dans les cellules A549 sur-exprimant proKLK6 en réponse à un inducteur de sa translocation nucléaire : Wnt 3a.

Les cellules A549 proKLK6 ont été cotransfectées avec un plasmide rapporteur codant la luciférase *firefly* sous la dépendance du promoteur TCF/LEF sauvage ou inactif et avec un plasmide codant la luciférase renilla. Les cellules ont ensuite été cultivées pendant 24h dans du milieu contenant ou non du Wnt 3 et l'activité des luciférases *firefly* et renilla ont été mesurées. Les valeurs de luminescence de la luciférase *firefly* ont été normalisées avec la luminescence mesurée pour la luciférase renilla. Les résultats ont été exprimés par rapport aux valeurs basales trouvées pour les cellules transfectées avec le promoteur TCF/LEF sauvage (* = statistiquement significatif, test Kruskal et Wallis, $p < 0,05$)

Suite à cette validation, nous avons comparé l'activité transcriptionnelle de la β -caténine dans les cellules exprimant et n'exprimant pas KLK6. Comme le montre la figure n°38, en absence d'inducteur exogène, l'activité transcriptionnelle du promoteur TCF/LEF est près de 3 fois plus élevée dans les cellules A549 exprimant KLK6 que dans les cellules parentales A549 Flp-In. Cette observation indique que la β -caténine transloquée au niveau

nucléaire est bien active et confirme les observations d'immunodétection révélant une élévation de la β -caténine nucléaire suite à l'expression de KLK6.

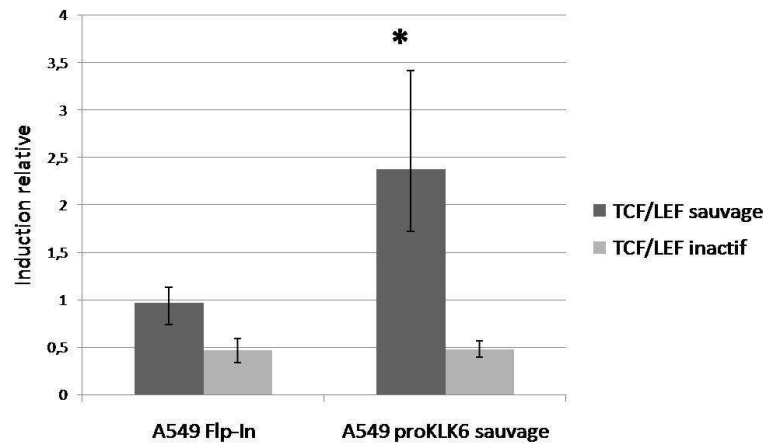


Figure 38 : Comparaison de l'activité transcriptionnelle de la β -caténine entre les cellules n'exprimant pas et exprimant KLK6.

Les cellules A549 Flp-In ou proKLK6 ont été cotransfectées avec le plasmide rapporteur codant la luciférase firefly sous la dépendance du promoteur TCF/LEF sauvage ou inactif et avec un plasmide codant la luciférase renilla. L'activité luciférase firefly a été mesurée 24h après la transfection, et l'activité de la luciférase Renilla a été utilisée comme contrôle interne pour l'efficacité de la transfection. Les valeurs de luminescence du gène de la luciférase firefly ont été normalisées avec la luminescence mesurée pour la luciférase renilla. Les valeurs obtenues ont été rapportées à celle des cellules Flp-In transfectées avec le promoteur TCF/LEF sauvage (* = statistiquement significatif, test Kruskal et Wallis, $p < 0,05$)

II. Etude de la voie du récepteur de l'EGF

Les résultats précédents indiquent que la kallistéine 6 pourrait promouvoir la translocation de la β -caténine membranaire vers le noyau. Cependant cet effet ne semble pas dû à un clivage de l'E-Cadhérine. Lee et collaborateurs ont montré que l'activation de la β -caténine pouvait également résulter d'une stimulation de l'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) (Lee et al. 2010). La possibilité que KLK6 intervienne dans l'activation de ce récepteur a donc été testée avec nos modèles cellulaires.

1. Effet de KLK6 sur l'expression du gène de l'EGFR

Dans un premier temps, nous avons voulu savoir si l'expression de KLK6 modifiait l'expression de l'EGFR. Pour se faire, nous avons utilisé l'approche de qRT-PCR et la

méthode comparative des Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) décrite précédemment. Les résultats obtenus sont indiqués sur la figure n°38.

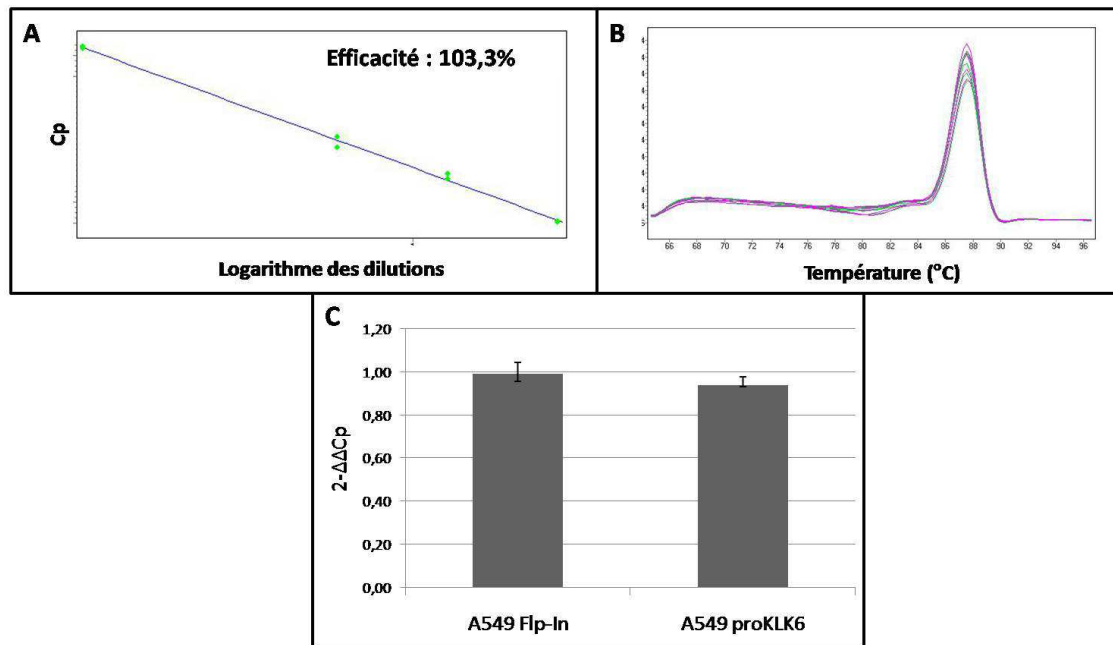


Figure 39 : PCR en temps réel de l'EGFR dans les cellules A549 Flp-In et proKLK6.
 Les ARNm ont été extraits à partir de cellules cultivées dans du milieu complet. Les ADNc obtenus par retrotranscription ont été analysés par qPCR. Légende : (A) mesure de l'efficacité de la PCR ; (B) courbe de fusion de la qPCR ; (C) niveau d'expression des gènes.

Sur la figure n°39.A, on peut observer que l'efficacité de la qPCR est de 103%, ce qui satisfaisant. La courbe de fusion observée sur la figure n°39.B prouve que la méthode était spécifique puisqu'un seul pic de fusion a été observé.

La quantification des ARNm de l'EGFR dans les deux lignées (figure n°39.C) ne montre aucune différence entre les cellules parentales A549 Flp-In et les cellules exprimant proKLK6. L'expression de KLK6 ne modifie donc pas l'expression génique de l'EGFR.

2. KLK6 agit sur la voie de l'EGFR via l'intervention d'un ligand

a) Etude de la sensibilité des cellules au cetuximab

Le cetuximab est un anticorps monoclonal chimérique dirigé contre le site de liaison des ligands à l'EGFR. La fixation du cetuximab sur le récepteur empêche la fixation des ligands et l'activation de la voie de l'EGFR. Cet anticorps inhibiteur a donc été choisi pour déterminer si KLK6 intervient via des ligands sur la voie de l'EGFR.

Dans un premier temps, nous avons analysé la sensibilité des cellules A549 exprimant proKLK6 au cetuximab. Les cellules ont été cultivées avec différentes concentrations de cetuximab pendant 24h. Les cellules témoins ont été incubées avec du PBS en remplacement du cetuximab afin d'éliminer un éventuel effet de l'éluant du cetuximab. L'analyse a été effectuée avec un test MTS.

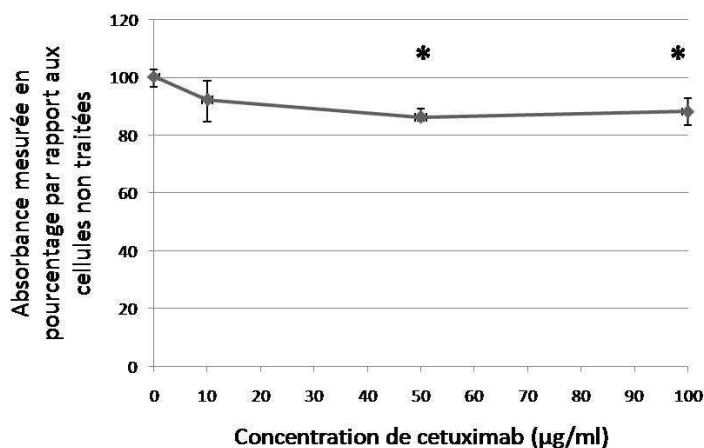


Figure 40 : Effet du cetuximab sur les cellules A549 exprimant la proKLK6.

Les cellules ont étéensemencées à raison de 2500 cellules par puits dans du milieu dépourvu de SVF comprenant différentes concentrations de cetuximab, les cellules non traitées ont été incubées avec du PBS. 30 minutes après, du milieu à 20% de SVF a été rajouté afin d'avoir une concentration finale de 10% dans les puits. Les cellules ont ensuite été laissées à proliférer pendant 24h puis un test MTS a été effectué. L'absorbance mesurée correspond à la proportion de cellules viables, les résultats obtenus sont indiqués sous forme de pourcentage avec pour 100% les cellules non traitées. (* : Statistiquement significatif, test Kruskal et Wallis, $p < 0,05$).

Comme le montre la figure n°40, un effet inhibiteur du cetuximab sur les cellules est observable dès la concentration de 10µg/ml. Cependant l'effet est plus prononcé à 50µg/ml et le résultat obtenu à cette concentration est identique à la concentration de 100µg/ml. Ces deux concentrations montrent une différence statistiquement significative par rapport aux cellules non traitées. Nous avons donc choisi la concentration de cetuximab de 50µg/ml pour la suite de l'étude.

Dans un deuxième temps, nous avons évalué la sensibilité des cellules A549 au cetuximab. Comme le montre la figure suivante, les cellules Flp-In sont insensibles au cetuximab à la concentration administrée alors que les cellules exprimant KLK6 le sont.

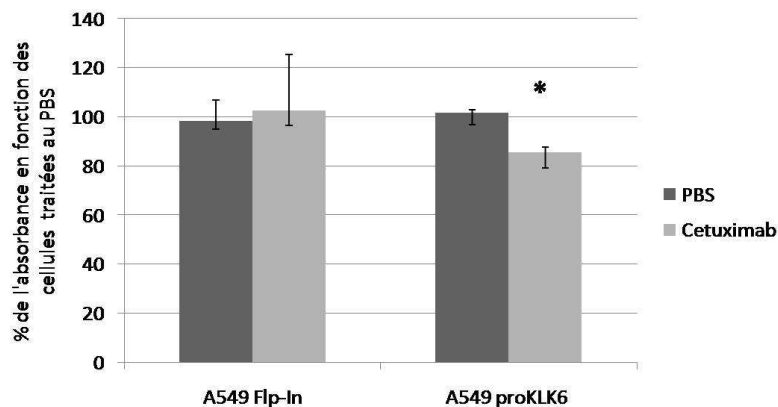


Figure 41 : Efficacité du cetuximab sur les cellules A549 exprimant ou non la proKLK6.

Les cellules ont étéensemencées à raison de 2500 cellules/puits de plaque 96 puits dans du milieu dépourvu de SVF comprenant du PBS ou du cetuximab à 50µg/ml. 30 minutes après, du milieu à 20% de SVF a été rajouté afin d'avoir une concentration finale de 10% dans les puits. Après 24h de culture un test MTS a été effectué.

L'absorbance mesurée correspond à la proportion de cellules viables, les résultats sont indiqués sous forme d'histogrammes, pour chaque condition les cellules non traitées représentent 100% (* : Test Mann et Whitney, $p < 0,05$).

b) Effet du cetuximab sur la prolifération induite par la kallibréine 6

Afin de savoir si l'effet spécifique du cetuximab sur les cellules A549 exprimant proKLK6 était lié à la prolifération de ces cellules et non à un effet cytotoxique, nous avons comparé la croissance de ces cellules en présence et absence de cetuximab. Comme le montre la figure n°42, le cetuximab ne fait que bloquer la prolifération induite par proKLK6 qui est observable en absence de cet anticorps (PBS). Il semble donc que la stimulation de la prolifération cellulaire induite par proKLK6 soit liée à la mobilisation d'un ligand de l'EGFR.

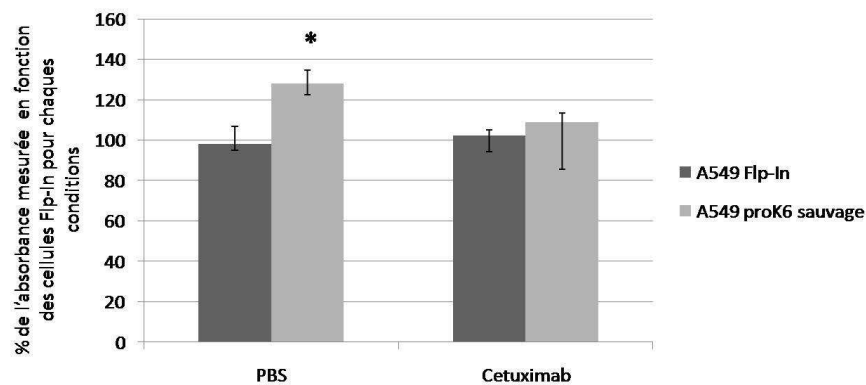


Figure 42 : Effet du cetuximab sur la prolifération induite par KLK6.

Les cellules ont étéensemencées à raison de 2500 cellules/puits de plaque 96 puits dans du milieu dépourvu de SVF comprenant du PBS ou du cetuximab à 50µg/ml. 30 minutes après, du milieu à 20% de SVF a été rajouté afin d'avoir une concentration finale de 10% dans les puits. Après 24h de culture un test MTS a été effectué. L'absorbance mesurée correspond à la proportion de cellules viables, les résultats sont indiqués sous forme d'histogramme avec pour 100% les cellules Flp-In (* : Test Mann et Whitney, $p < 0,05$).

c) Effet de l'ajout de KLK6 active sur la phosphorylation ligand-dépendante de l'EGFR

Afin de vérifier que l'effet de KLK6 sur l'EGFR est bien consécutif à une action extracellulaire de la protéase, nous avons traité des cellules A549 parentales avec de la KLK6 active en présence ou en absence de cetuximab. Classiquement, la fixation d'un ligand sur l'EGFR entraîne sa dimérisation qui induit une phosphorylation croisée de tyrosines spécifiques. Ceci stabilise l'activité kinase du récepteur et les tyrosines phosphorylées deviennent des points d'ancrage pour les acteurs de signalisation placés en aval du récepteur. Nous avons donc examiné l'état de phosphorylation de l'EGFR après ajout de KLK6 active. Ceci a été effectué à l'aide d'un test ELISA détectant toutes les tyrosines phosphorylées. Un autre dosage ELISA nous a permis de déterminer la quantité totale d'EGFR. Le ratio entre les deux formes a ensuite été calculé (figure n°43).

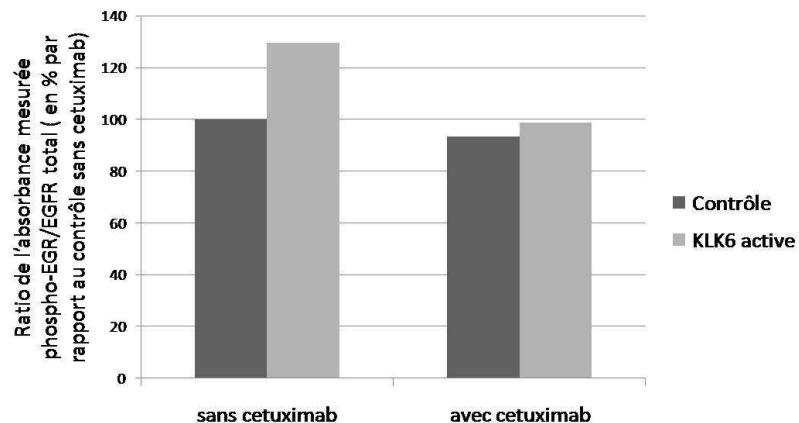


Figure 43 : Effet du rajout de KLK6 active sur l'activation de l'EGFR des cellules A549 parentales en présence ou non de cetuximab.

Les cellules A549 parentales ont étéensemencées à raison de $0,5 \cdot 10^6$ cellules par puits en plaque 6 puits dans du milieu complet. Le lendemain, les cellules ont été placées dans du milieu sans sérum avec ou sans cetuximab à $50 \mu\text{g/ml}$ (contrôle négatif : PBS) pendant 2h puis la KLK6 active a été rajoutée à une concentration de $10 \mu\text{g/ml}$ (contrôle : tampon d'éluion de la KLK6) pendant 20 minutes. Les cellules ont ensuite été lysées et la proportion d'EGFR phosphorylé par rapport à la présence d'EGFR total a été analysée par un test ELISA avec $30 \mu\text{g}$ de protéines totales des lysats.

L'ajout de KLK6 active entraîne une phosphorylation accrue du récepteur (figure n° 43). Par contre lorsque les cellules ont été incubées avec du cetuximab, la proportion d'EGFR phosphorylé en présence de KLK6 active est identique à celle observée avec des cellules non traitées par KLK6. Cette expérience démontre que l'effet observé avec la lignée cellulaire proKLK6 résulte bien d'une action extracellulaire de la protéase mobilisant un ligand de l'EGFR.

d) KLK6 active la voie Erk via le récepteur de l'EGF.

L'activation de l'EGFR conduit à l'activation d'une multitude de protéines telles que Erk (*Extracellular-Related kinase*), les MAP kinases, la PI-3 kinase (Phosphatidyl-Inositol-3') et STAT3. Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes intéressés à la protéine Erk dont l'activation se produit par phosphorylation. La protéine Erk est faiblement phosphorylée dans les cellules A549 parentales et cette phosphorylation est indépendante de l'EGFR puisqu'elle n'est pas modifiée en présence de cetuximab, comme cela peut être observé sur la figure n°44. Par contre, un traitement des cellules pendant 20 minutes avec de la KLK6 active stimule la phosphorylation de Erk. Une incubation préalable des cellules avec du cetuximab inhibe cette phosphorylation induite par KLK6.

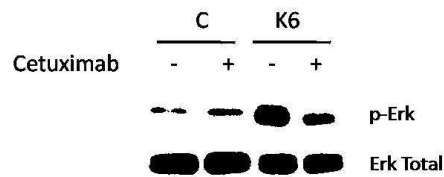


Figure 44 : Effet du rajout de KLK6 active sur la phosphorylation d'Erk.

Les cellules A549 parentales ont étéensemencées à raison de $0,5 \cdot 10^6$ cellules par puits en plaque 6 puits dans du milieu complet. Le lendemain, les cellules ont été placées dans du milieu sans sérum avec ou sans cetuximab à $50 \mu\text{g/ml}$ (contrôle négatif : PBS) pendant 2h puis la KLK6 active (K6) a été rajoutée à une concentration de $10 \mu\text{g/ml}$ (contrôle négatif (C) = tampon d'éluion de la KLK6) pendant 20 minutes. Les cellules ont ensuite été lysées et la phosphorylation d'Erk a été analysée par western-Blot avec $10 \mu\text{g}$ de protéines totales des lysats.

Ainsi, les travaux réalisés dans cette partie de l'étude ont permis de relier KLK6 à la voie de l'EGFR. La protéase présente dans le milieu extracellulaire mobiliserait un ligand du récepteur de l'EGF provoquant son activation et en cascade, celle de voies de signalisation situées en aval. Cette cascade d'évènements serait notamment responsable de l'induction de la prolifération cellulaire observée au niveau des cellules pulmonaires exprimant proKLK6.

III. Etude de la voie PAR-2

Une des questions soulevées par les observations décrites précédemment est de savoir qu'elle est la cible originelle de la protéase KLK6. La mobilisation d'un ligand de l'EGFR par KLK6 pourrait en effet résulter soit d'une action directe sur un ligand immobilisé soit d'une action indirecte sur une autre cible cellulaire.

L'hypothèse que nous avons évaluée ici est celle d'une action indirecte de KLK6 sur le récepteur membranaire PAR-2. Les PAR (*Proteinase activated Receptor*) sont des récepteurs couplés aux protéines G activés par un clivage partiel de leur domaine extracellulaire par des protéases à sérine ou des métalloprotéases matricielles. Or, il a été démontré que KLK6 est capable d'activer PAR2 (Oikonomopoulou et al. 2006a). De plus, Darmoul et collaborateurs ont démontré qu'une activation de PAR2 par un agoniste induisait une phosphorylation de l'EGFR dans des cellules tumorales de colon. Ces auteurs ont également révélé que l'utilisation d'anticorps bloquant la fixation de ligands sur l'EGFR inhibait la prolifération cellulaire et la phosphorylation de ERK induites par le peptide agoniste de PAR2 (Darmoul et al. 2004a). Pris ensemble, ces données pourraient expliquer nos observations dans les cellules pulmonaires. Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier si l'activation de PAR-2

conduisait à une stimulation de la voie de l'EGFR dans les cellules tumorales pulmonaires A549.

1. Activation de la voie de l'EGFR via PAR-2

Le traitement de cellules A549 avec un peptide agoniste de PAR-2 stimule la prolifération de celles-ci comme le montre la figure n°45.A. Cet effet s'accompagne d'une augmentation de la phosphorylation de l'EGFR (figure n°45.B) et d'une activation de ERK (figure n°45.C). L'incubation préalable des cellules avec du cetuximab inhibe à la fois la phosphorylation de l'EGFR et de ERK (figure n°45.B et D) induite par le peptide activateur de PAR-2.

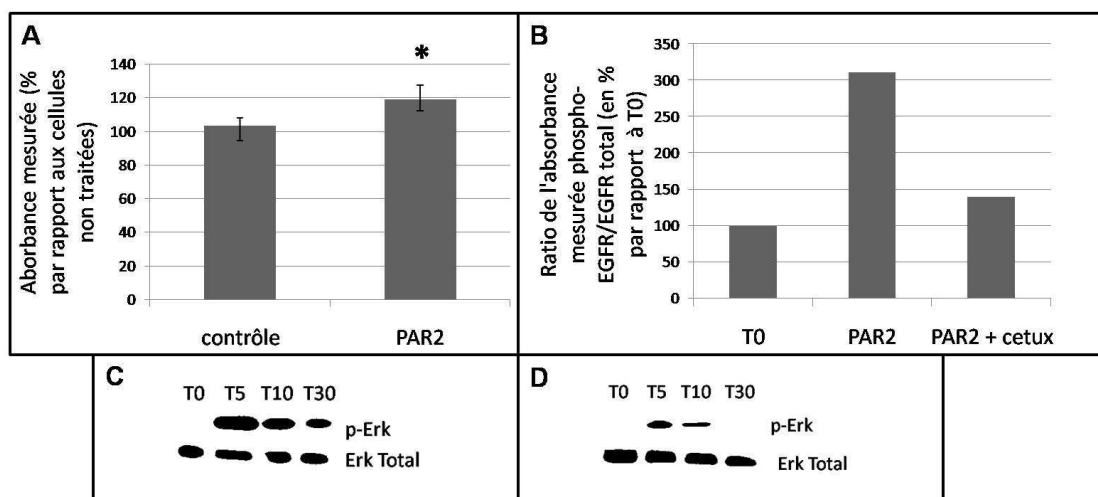


Figure 45 : Effet d'un agoniste de PAR2 sur les cellules A549 : la prolifération cellulaire (A), l'activation de l'EGFR (B), l'activation de ERK sans cetuximab (C) et avec cetuximab (D).
 (A) Les cellules ont étéensemencées à raison de 3000 cellules par puits en P96 en milieu complet. Le lendemain les cellules ont été rincées et placées dans du milieu RPMI supplémenté de 0,1% BSA avec ou sans agoniste de PAR2 à 100µM. 48h après, un test MTS a été effectué, l'absorbance mesurée est proportionnelle à la quantité de cellules viables, les données obtenues sont représentées sous forme d'histogrammes avec pour 100% les cellules non traitées. (B,C,D) Les cellules ont étéensemencées à raison de 0,5.10⁶ cellules par puits en plaque 6 puits dans du milieu complet. Le lendemain les cellules ont été sevrées pendant 2h avec ou sans cetuximab puis l'agoniste de PAR2 à 40µM a été rajouté et les cellules ont été lysées après 5, 10, 20 et 30 minutes d'incubation. La proportion d'EGFR phosphorylé par rapport à la présence d'EGFR total a été analysée par un test ELISA sur les lysats obtenus après 20 minutes d'incubation avec 30 µg de protéines totales (B). La phosphorylation de ERK a été analysée par western-blot avec 10µg de protéines totales des lysats ((C) sans cetuximab, (D) avec cetuximab).

Comme dans le cas rapporté pour les cellules tumorales de colon, l'activation de PAR-2 conduit donc à une stimulation de la voie de l'EGFR et de ERK par mobilisation d'un ligand de l'EGFR dans les cellules pulmonaires A549.

2. Inhibition de PAR-2 par des siRNA

L'observation décrite dans le paragraphe précédent crédibilisait l'hypothèse formulée plus haut selon laquelle les effets de KLK6 sur les cellules pulmonaires pourraient résulter d'une activation de PAR-2 par KLK6. Dans cette partie, nous avons donc testé si le blocage de l'expression de PAR-2 par des siRNA (*small interfering RNA*) pouvait supprimer certains effets de KLK6.

a) Validation des siRNA dirigés contre PAR2

L'administration des siRNA aux cellules a été effectuée par une méthode de transfection (voir matériel et méthode). Afin de vérifier l'inhibition de l'expression de ce récepteur dans les cellules transformées, nous avons réalisé une qRT-PCR avec la méthode comparative des Ct ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) décrite précédemment.

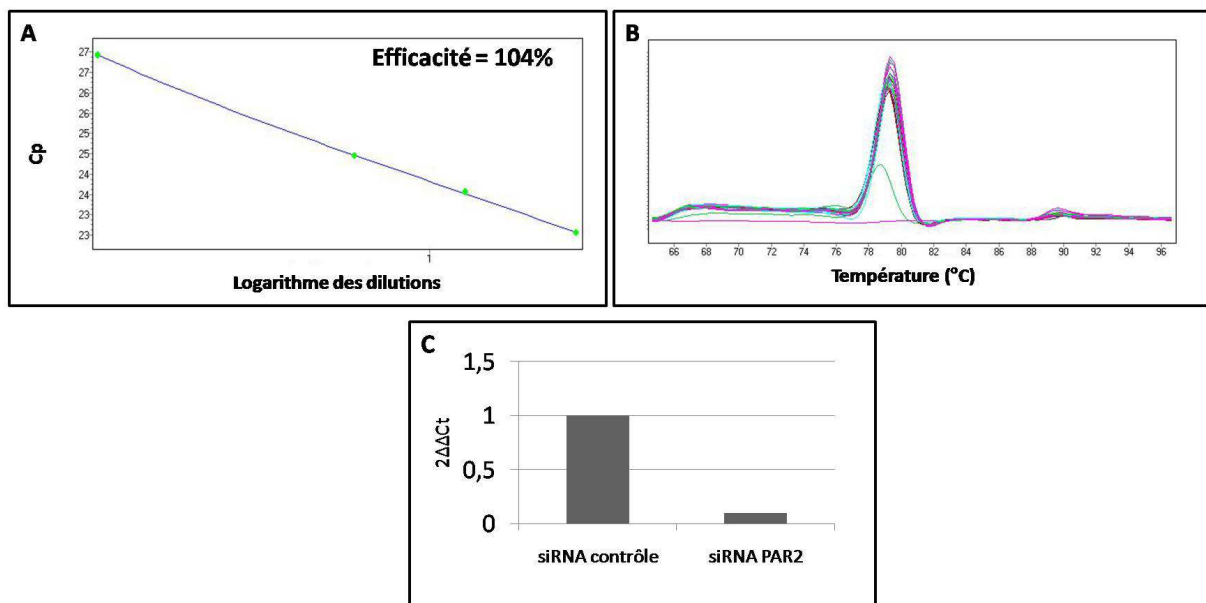


Figure 46 : PCR en temps réel de PAR2 dans les cellules A549 parentales transfectées avec des siRNA PAR2 ou contrôle.

Les ARNm ont été extraits à partir de cellules cultivées avec du milieu complet en plaque 6 puits. Les ADNc obtenus par retrotranscription ont été analysés par qPCR. Légende : (A) mesure de l'efficacité de la PCR ; (B) courbe de fusion de la qPCR ; (C) niveau d'expression des gènes.

Sur la figure n°46.A, on peut constater que l'efficacité de la réaction de PCR est satisfaisante (104%). La courbe de fusion observée sur la figure n°46.B indique qu'une seule population de produits de PCR a été obtenue. Comme le montre la figure n°46.C

l'introduction de siRNA dirigés contre les ARNm de PAR-2 fait fortement diminuer (de 90% environ) ceux-ci dans les cellules A549.

b) Effets de siRNA ciblant PAR2 sur la phosphorylation de ERK

Les siRNA ciblant PAR-2 pouvant inhiber fortement l'expression de ce récepteur, nous avons analysé leur effet sur la phosphorylation de ERK qui, comme nous l'avons vu précédemment, est activée via l'EGFR à la fois par le peptide agoniste de PAR-2 et par KLK6.

Le traitement avec le peptide agoniste de PAR-2 ou avec de la KLK6 active, de cellules A549 transfectées avec un siRNA contrôle, a résulté en une activation de la phosphorylation de ERK (figure n°47). Cette activation a été inhibée lorsque ces cellules ont été transformées avec le siRNA ciblant PAR-2 indiquant que ce récepteur est bien impliqué dans les réponses des cellules A549 à KLK6.

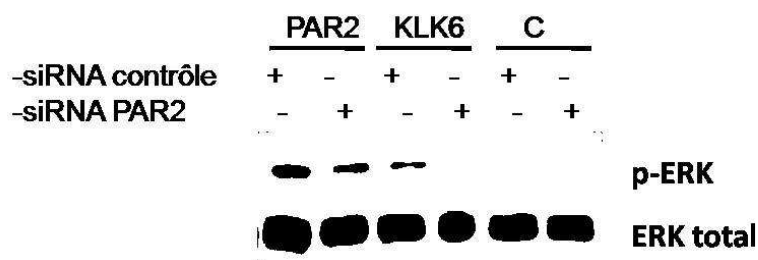


Figure 47 : Effet d'une inhibition de PAR2 sur la phosphorylation d'Erk.

Les cellules A549 parentales ont étéensemencées en plaque 6 puits avec du milieu complet à raison de $0,3 \cdot 10^6$ cellules par puits. Le lendemain, les cellules ont été transfectées à l'aide de lipofectamine avec 12,5pmol de siRNA dirigés contre PAR2 ou contrôle. 24 après, les cellules ont été placées dans du milieu sans sérum pendant 2h, puis du peptide activateur de PAR2 ou de la KLK6 active (K6) a été rajouté à une concentration de $40 \mu\text{M}$ et $10 \mu\text{g/ml}$ respectivement (contrôle négatif (C) : tampon d'éluion de la KLK6) pendant 20 minutes. Les cellules ont ensuite été lysées et la phosphorylation d'Erk a été analysée par western-Blot avec $30 \mu\text{g}$ de protéines totales des lysats.

Chapitre III : Effets de KLK6 sur la réponse aux agents chimio-thérapeutiques, études *in vitro* et *in vivo*.

Comme nous l'avons vu, un niveau élevé d'expression de *KLK6* est corrélé avec une diminution de la survie des patients (Heuzé-Vourc'h et al. 2009). Certains patients ont été traités par chimiothérapie après l'exérèse de leur tumeur notamment lors de récives. Il est envisageable que le pronostic défavorable soit dû à une moins bonne réponse des patients ayant un fort taux de *KLK6* aux agents chimio-thérapeutiques.

Le schéma de chimiothérapie le plus utilisé pour traiter un cancer bronchique est à base de platine. Administrés par perfusion intraveineuse, le cisplatine ou le carboplatine sont habituellement associés à l'un des agents chimiothérapeutiques suivants :

- étoposide
- paclitaxel
- docétaxel
- gemcitabine
- vinorelbine
- pemetrexed

A. Etude *in vitro*

Afin de voir si l'expression de *KLK6* interfère avec la réponse cellulaire aux traitements, nous avons traité des cellules exprimant ou n'exprimant pas *KLK6* avec des agents couramment utilisés en clinique. Dans un premier temps, l'IC50 a été déterminé avec les cellules Flp-In, il s'agit de la concentration à laquelle l'agent chimio-thérapeutique inhibe 50% des effets observés. La différence de réponse aux agents chimio-thérapeutiques entre les cellules Flp-In et celles exprimant la pro*KLK6* a ensuite été évaluée par un test MTS.

I. Le paclitaxel

Le paclitaxel induit un blocage de la division cellulaire en empêchant la formation du fuseau de division. Il stimule l'assemblage des dimères de tubulines en microtubules et stabilise les microtubules en empêchant leurs dépolymérisations. Cela inhibe la réorganisation

des microtubules qui se produit normalement pour la formation du fuseau de division lors de la division cellulaire.

Les essais de concentrations effectués sur les cellules A549 et HEK Flp-In sont illustrés sur la figure n°48.

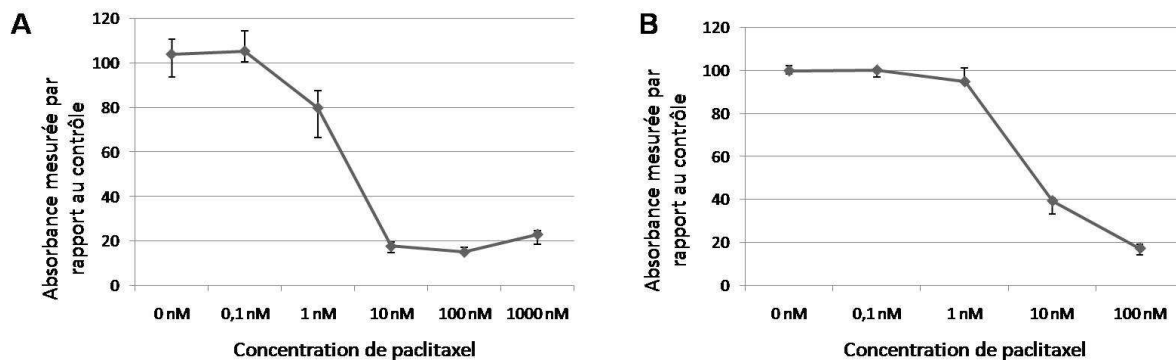


Figure 48 : Mesure de l'IC50 du paclitaxel chez les cellules A549 Flp-In (A) et HEK Flp-In (B). Les cellules ont étéensemencées à raison de 1000 et 3000 cellules respectivement dans 6 puits de plaque 96 puits. 24h après, les cellules ont été cultivées dans des milieux comprenant différentes concentrations de paclitaxel. La culture cellulaire a été effectuée pendant 72h, puis un test MTS a été effectué. L'absorbance mesurée est proportionnelle à la quantité de cellules viables et les valeurs obtenues sont indiquées sous forme de courbe avec pour 100% les cellules non traitées et en abscisse les différentes concentrations de paclitaxel.

Cette expérience a révélé que l'IC50 du paclitaxel pour les deux lignées cellulaires se situe autour de 1 et 10 nM (5,30 nM pour les cellules A549 et 8,25 nM pour les cellules HEK). Ces deux concentrations ont donc été utilisées pour rechercher des différences de réponse au paclitaxel entre les cellules Flp-In et les cellules exprimant la proKLK6. Les résultats sont illustrés dans la figure n°49.

Aucune différence significative n'a été observée entre les deux clones que ce soit pour la lignée HEK ou A549 (test Kruskal et Wallis ; $p < 0,05$). Dans ces modèles cellulaires, l'expression ectopique de KLK6 ne modifie donc pas la réponse cellulaire au paclitaxel.

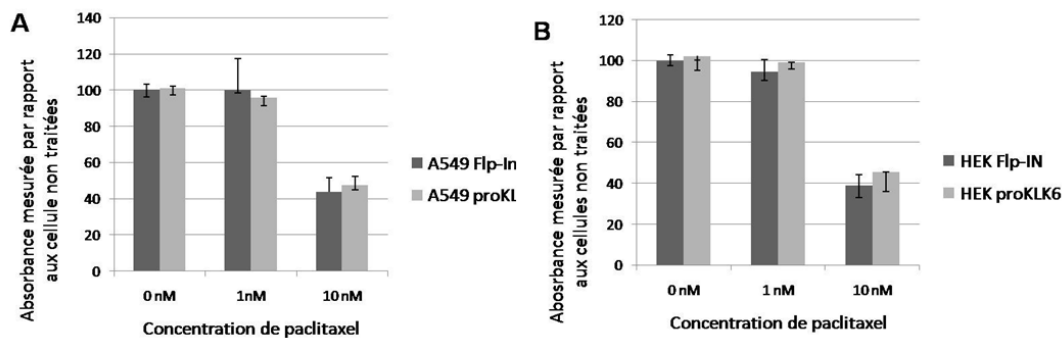


Figure 49 : Effet de KLK6 sur la réponse au paclitaxel dans les cellules A549 (A) et HEK (B). Les cellules ont étéensemencées à raison de 1000 et 3000 cellules respectivement en plaque 96 puits. 24h après, les cellules ont été cultivées dans des milieux comprenant différentes concentrations de paclitaxel. Les cellules ont ensuite été cultivées pendant 72h, puis un test MTS a été effectué. L'absorbance mesurée est proportionnelle à la quantité de cellules viables ; les valeurs obtenues sont indiquées sous formes d'histogramme avec pour 100% les cellules non traitées, les différentes concentrations de paclitaxel sont indiquées en ordonnée.

II. La gemcitabine

C'est un antimétabolite qui agit sur la biosynthèse de l'ADN. Il est métabolisé par des nucléosides kinases intracellulaires en nucléosides diphosphates et triphosphates actifs. L'inhibition de la synthèse d'ADN s'effectue par deux modes d'action. En premier, les nucléosides diphosphate actifs inhibent la ribonucléotide réductase qui catalyse les réactions produisant des désoxynucléosides triphosphate, ceci entraînant une réduction des concentrations de désoxynucléosides qui sont destinés à la synthèse de l'ADN. En deuxième, les nucléosides triphosphate actifs entrent en compétition avec les autres nucléosides triphosphate pour son incorporation dans l'ADN.

Comme précédemment l'IC50 pour chaque lignée a été déterminé avec les cellules Flp-In, les résultats sont indiqués sur la figure n°50.

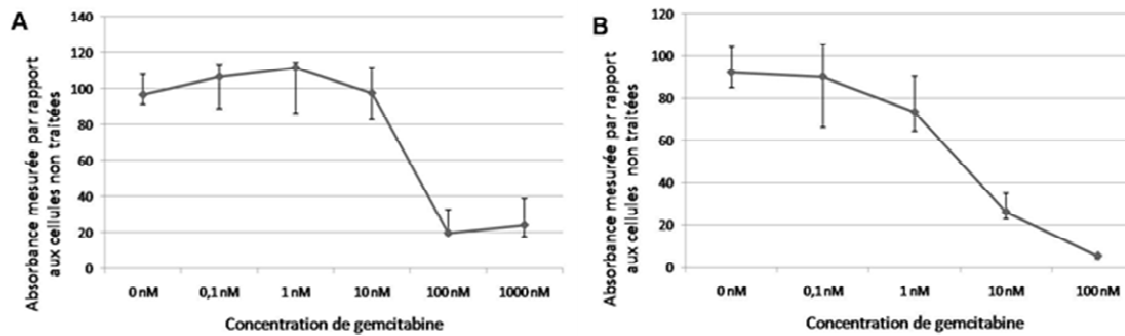


Figure 50 : Mesure de l'IC50 de la gemcitabine chez les cellules A549 Flp-In (A) et HEK Flp-In (B). Les cellules ont étéensemencées à raison de 1000 et 3000 cellules respectivement dans 6 puits de plaque 96 puits. 24h après, les cellules ont été cultivées dans des milieux comprenant différentes concentrations de gemcitabine. Les cellules ont ensuite été cultivées pendant 72h, puis un test MTS a été effectué. L'absorbance mesurée est proportionnelle à la quantité de cellules viables et les valeurs obtenues sont indiquées sous forme de courbe avec pour 100% les cellules Flp-In non traitées. Les différentes concentrations de gemcitabine sont indiquées en abscisse.

La mesure de l'IC50 indique que les concentrations optimales pour comparer l'effet de la gemcitabine entre les cellules Flp-In et proKLK6 se situent entre 10 et 100 nM pour la lignée A549 (65nM) et 1 et 10 nM pour la lignée HEK (5,45nM). La réponse cellulaire des cellules Flp-In et proKLK6 à la gemcitabine est illustrée sur la figure n°51. On peut constater que les cellules exprimant proKLK6 présentent le même profil de réponse que les cellules Flp-In ne l'exprimant pas. *In vitro*, la protéase KLK6 n'altère donc pas l'action de la gemcitabine (test Kruskal et Wallis ; $p < 0,05$).

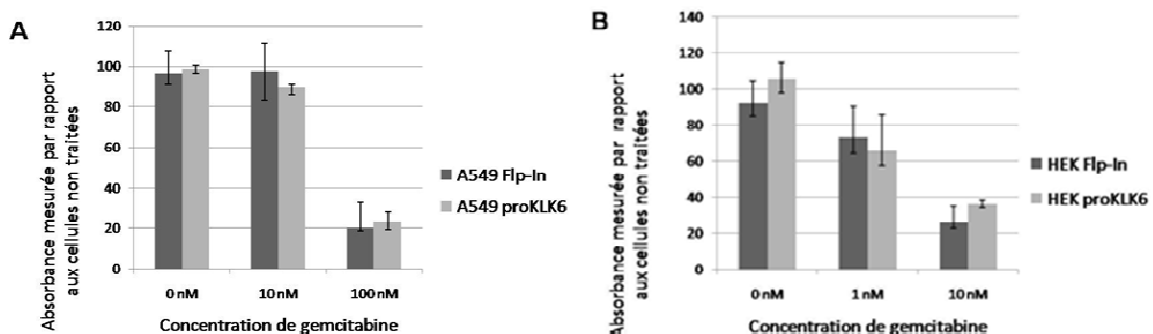


Figure 51 : Effet de la proKLK6 dans la réponse cellulaire à la gemcitabine sur les cellules A549 (A) et les cellules HEK (B).

Les cellules ont étéensemencées à raison de 1000 et 3000 cellules, respectivement, dans 6 puits de plaque 96 puits. 24h après, les cellules ont été cultivées dans des milieux comprenant différentes concentrations de gemcitabine. Les cellules ont ensuite été cultivées pendant 72h, puis un test MTS a été effectué. L'absorbance mesurée est proportionnelle à la quantité de cellules viables ; les valeurs obtenues sont indiquées sous formes d'histogramme avec pour 100% les cellules non traitées, les différentes concentrations de gemcitabine sont indiquées en ordonnée.

III. Le cisplatine

C'est un agent alkylant, c'est-à-dire qu'il induit des modifications covalentes de l'ADN. Il s'agit d'un agent chimio-thérapeutique dérivé du platine qui inhibe la synthèse de l'ADN par formation de ponts inter- et intracaténaires. Il est efficace sur un grand nombre de tumeurs, c'est donc un agent majeur de la chimiothérapie des tumeurs solides.

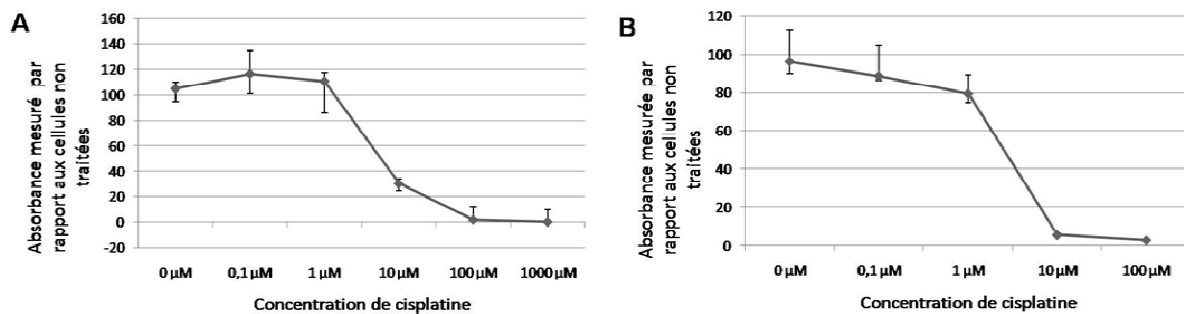


Figure 52 : Mesure de l'IC50 du cisplatine chez les cellules A549 Flp-In (A) et HEK Flp-In (B). Les cellules ont étéensemencées à raison de 1000 et 3000 cellules respectivement dans 6 puits de plaque 96 puits. 24h après, les cellules ont été cultivées dans des milieux comprenant différentes concentrations de cisplatine. Les cellules ont ensuite été cultivées pendant 72h, puis un test MTS a été effectué. L'absorbance mesurée est proportionnelle à la quantité de cellules viables et les valeurs obtenues sont indiquées sous forme de courbe avec pour 100% les cellules Flp-In non traitées. Les différentes concentrations de gemcitabine sont indiquées en abscisse.

L'IC50 mesuré sur les cellules Flp-In indique que la concentration comprise entre 1 et 10 μM de cisplatine (7,7 μM pour les cellules A549 et 4,5 μM pour les cellules HEK) est la concentration optimale pour mesurer d'éventuelles différences entre les cellules Flp-In et les cellules exprimant la proKLK6.

Comme on peut observer sur la figure n°53, les cellules Flp-In et KLK6 des deux lignées réagissent de la même manière au cisplatine (test Kruskal et Wallis ; $p < 0,05$).

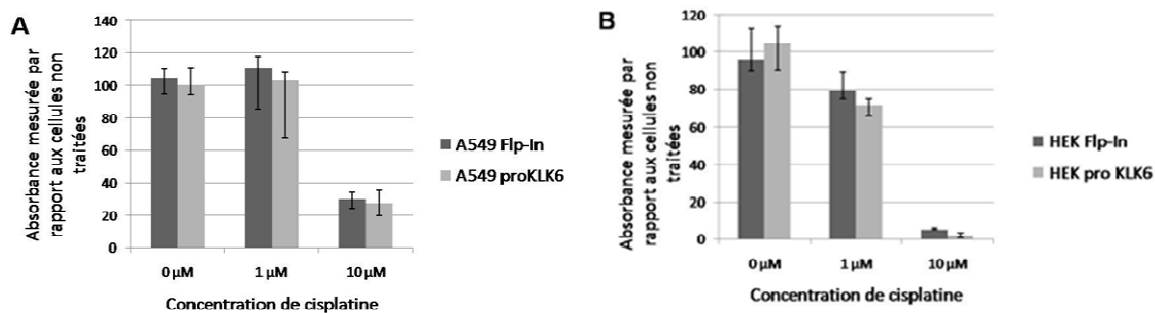


Figure 53 : Effet de la proKLK6 dans la réponse cellulaire au cisplatine sur les cellules A549 (A) et les cellules HEK (B).

Les cellules ont étéensemencées à raison de 1000 et 3000 cellules respectivement dans 6 puits de plaque 96 puits. 24h après, les cellules ont été cultivées dans des milieux comprenant différentes concentrations de cisplatine. Les cellules ont ensuite été cultivées pendant 72h, puis un test MTS a été effectué. L'absorbance mesurée est proportionnelle à la quantité de cellules viables ; les valeurs obtenues sont indiquées sous formes d'histogramme avec pour 100% les cellules non traitées, les différentes concentrations de cisplatine sont indiquées en ordonnée.

B. Etude *in vivo*

Cette partie a été menée en collaboration avec le Centre d'Imagerie du Petit Animal (CNRS-TAAM UPS44) à Orléans. Des tumeurs ont été induites chez des souris Nude par injection sous-cutanée de 1.10^6 cellules A549 Flp-In ou proKLK6. Après 18 jours d'induction tumorale, les souris ont été soumises à un traitement avec du paclitaxel ou du carboplatine, les animaux témoins ont quant à eux reçu du sérum physiologique. Le carboplatine a été substitué au cisplatine utilisé en culture de cellules en raison de sa moindre toxicité rénale et hématologique. Les effets des agents chimio-thérapeutiques ont été analysés en mesurant la croissance tumorale ainsi que le niveau d'apoptose par imagerie de l'annexine V.

I. Effet des agents chimio-thérapeutiques sur la croissance tumorale

1. Cinétique de croissance tumorale

L'injection de cellules ayant été effectuée en sous-cutanée, il a été possible de suivre l'évolution du volume tumoral au travers de la peau. En effet, à l'aide d'un pied à coulisse la longueur et la largeur d'une tumeur peuvent être mesurée et le volume peut être déterminé

grâce à la formule $(4/3)\pi\pi x(L/2)^2x(l/2)$ avec L=longueur et l= largeur. La croissance tumorale observée chez les différents lots de souris est illustrée dans la figure n°54.

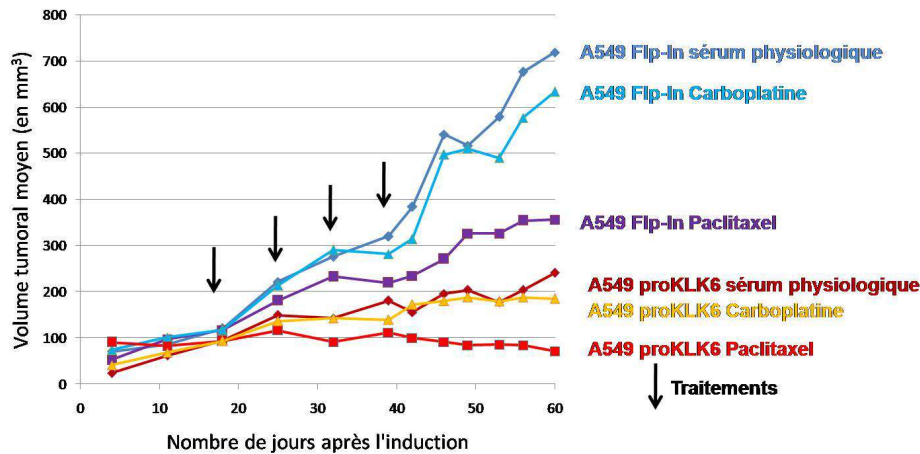


Figure 54 : Cinétique de croissance tumorale chez les souris Nude.

Les tumeurs ont été induites soit avec des cellules A549 Flp-In n'exprimant pas KLK6 soit avec des cellules A549 proKLK6. Les animaux ont ensuite reçu à différentes périodes soit du sérum physiologique, soit du paclitaxel, soit du carboplatine. Tout au long de l'expérimentation, la taille des tumeurs a été déterminée sur les animaux vivants à l'aide du pied à coulisse. La figure représente le volume moyen obtenu pour chaque lot (n=8) en fonction du temps. Les dates d'injection des traitements sont indiquées par une flèche.

Comme le montre la figure, la croissance des tumeurs induites avec des cellules A549 Flp-In et traitée avec du sérum physiologique est très supérieure à celle des tumeurs induites avec les cellules A549 exprimant KLK6. Chez la souris Nude, KLK6 aurait donc un effet inhibiteur de la croissance tumorale. Cette observation est en opposition avec les données obtenues *in vitro* montrant un effet prolifératif et anti-apoptotique de KLK6.

L'injection répétée de paclitaxel entraîne un net ralentissement de la croissance des tumeurs induites par les cellules exprimant ou n'exprimant pas proKLK6. Bien que nous ayons employé la dose de carboplatine couramment décrite dans la littérature, aucun effet sur la croissance tumorale n'a été observé avec cette molécule. Il est possible que les cellules A549 modifiées par l'intégration du site FRT soient moins sensibles à cet agent que les cellules A549 parentales classiquement utilisées.

2. Analyse des données après autopsie.

Les mesures effectuées chez l'animal vivant ne tiennent pas compte d'une des dimensions de la tumeur, son épaisseur ou hauteur. Cette dimension est par contre mesurable après autopsie sur la tumeur explantée. Le volume a alors été calculé à l'aide de la formule $(4/3)\pi x(L/2)x(l/2)x(h/2)$ avec L=longueur, l=largeur et h=hauteur. Nous avons voulu savoir si les mesures effectuées chez l'animal vivant étaient représentatives de la réalité. La figure n°55 met en parallèle les mesures effectuées *in vivo* le dernier jour de l'expérimentation et celles obtenues après autopsie.

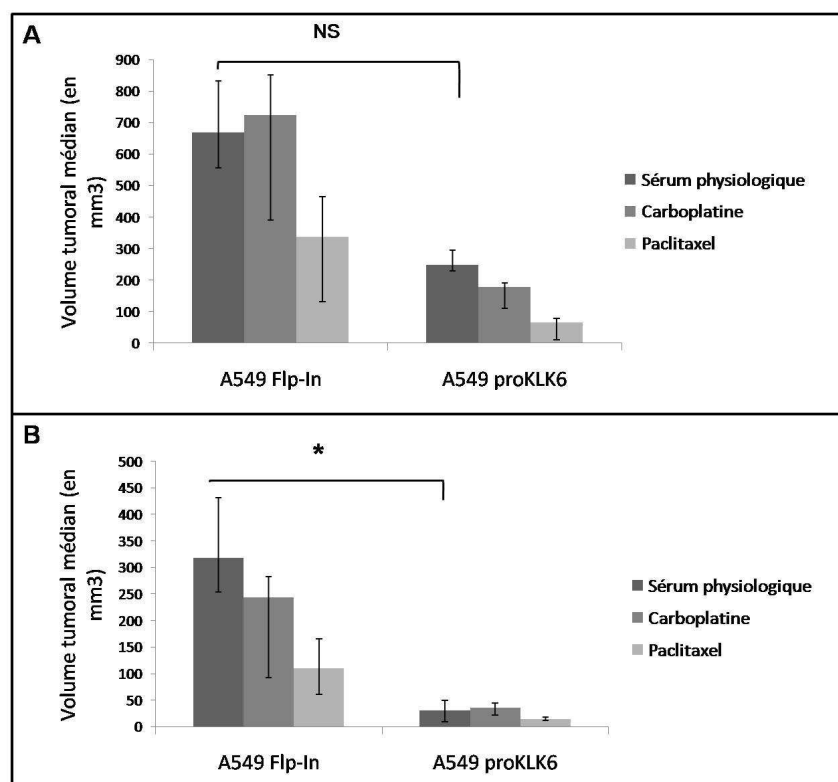


Figure 55 : Mesure du volume tumoral en fin d'expérimentation *in vivo* (A) et *ex vivo* (B).
La figure représente le volume médian final obtenu pour chaque lot (* : significatif ; test Kruskal et Wallis ($p < 0,05$)).

Bien que le volume tumoral mesuré après autopsie soit inférieur de près de moitié à celui estimé chez l'animal vivant, les proportions relatives des tumeurs de chaque lot sont semblables. Ceci valide les cinétiques de croissance basées sur l'estimation de la taille des tumeurs chez l'animal vivant. L'analyse statistique révèle, qu'en fin d'expérimentation et après autopsie, la taille des tumeurs exprimant KLK6 (A549 proKLK6) est bien significativement différente de celle des tumeurs n'exprimant pas KLK6 (A549 Flp-In).

Afin d'évaluer l'effet de KLK6 sur la réponse aux agents chimio-thérapeutiques, nous avons analysé les données obtenues après autopsie qui sont plus précises.

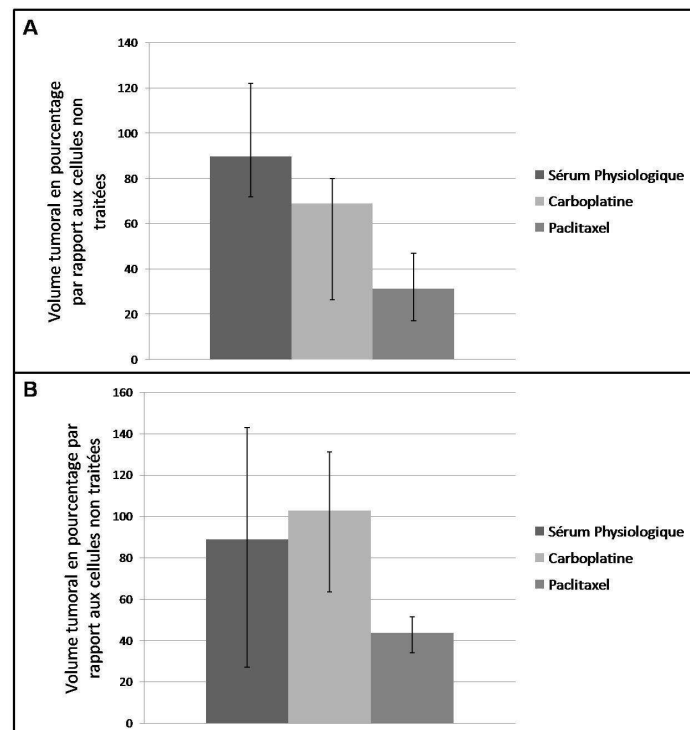


Figure 56 : Effets des agents chimio-thérapeutiques sur le volume tumoral ex vivo sur les tumeurs Flp-In (A) ou KLK6 (B).

Les volumes tumoraux médians sont présentés sous forme d'histogrammes en pourcentage par rapport aux souris traitées avec du sérum physiologique. (* statistiquement significatif, test Kruskal et Wallis ($p < 0,05$))

Comme le montre la figure n°56, aucune différence significative n'est observée dans les réponses enregistrées en présence et en absence de proKLK6. Par exemple, dans le cas du paclitaxel la taille des tumeurs avoisine les 40% par rapport aux tumeurs non traitées, et ce, en absence ou en présence de KLK6. Cette observation corrobore celles obtenues *in vitro* sur les lignées cellulaires. L'expression de KLK6 n'aurait donc pas d'impact sur la réponse des cellules tumorales pulmonaires aux agents thérapeutiques.

II. Effet de KLK6 sur l'apoptose induite par les agents chimio-thérapeutiques

Le Centre d'Imagerie du Petit Animal (CNRS-TAAM UPS44) à Orléans a développé une imagerie de l'apoptose *in vivo* basée sur l'annexine V couplé à un fluorochrome, nous avons

réalisé une étude préliminaire dans le but de voir si KLK6 pouvait réguler l'apoptose chez l'animal.

L'annexine V est une molécule capable de se lier aux phospholipides et aux phosphatidylsérines qui lors des stades précoces de l'apoptose sont exposés vers l'extérieur de la bicouche lipidique. Ce traceur injecté chez la souris vivante peut être imagé en fluorescence. Pour cette première étude, deux souris ont été traitées comme décrit ci-dessus puis ont reçu un traitement supplémentaire de sérum physiologique, de paclitaxel ou de carboplatine à J60. Un jour plus tard, une injection d'annexine V a été effectuée puis les souris ont été imagées 44 heures après l'injection.

La figure n°57 montre une image représentative de la distribution de l'annexine V marquée dans le corps de souris.

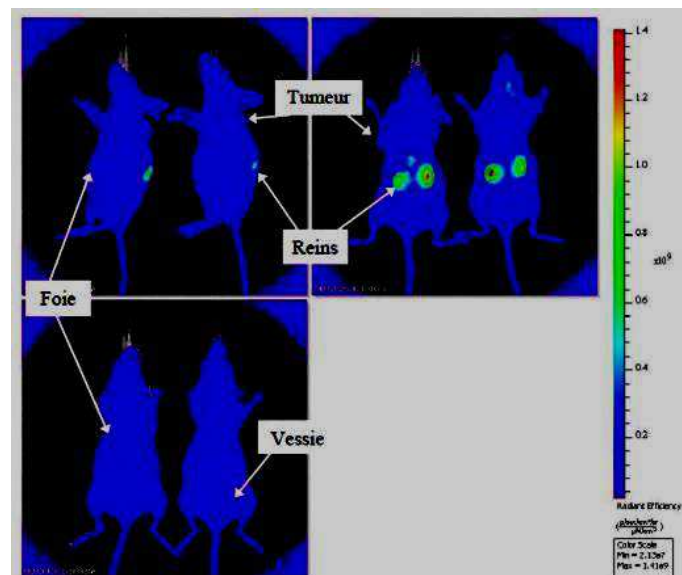


Figure 57 : Imagerie de l'annexine V sur le corps entier de souris sous trois incidences.
L'intensité de fluorescence qui est proportionnelle à la répartition de l'Annexine V est déterminée par une échelle de couleur, présentée à droite. L'imagerie a été effectuée sur les souris ayant reçu des cellules A549 Flp-In et traitées avec du carboplatine.

On constate sur la figure n°57, une forte fluorescence au niveau des reins des souris qui pourrait être due à l'élimination du fluorochrome issu de la dégradation de l'annexine V marquée. L'intensité de la fluorescence ne permet pas à la caméra de discriminer le marquage spécifique des tumeurs, du bruit de fond. Afin d'augmenter le seuil de détection au niveau des tumeurs, des caches ont été appliqués sur les souris de manière à ne garder que les zones tumorales et péri-tumorales (figure n°58).

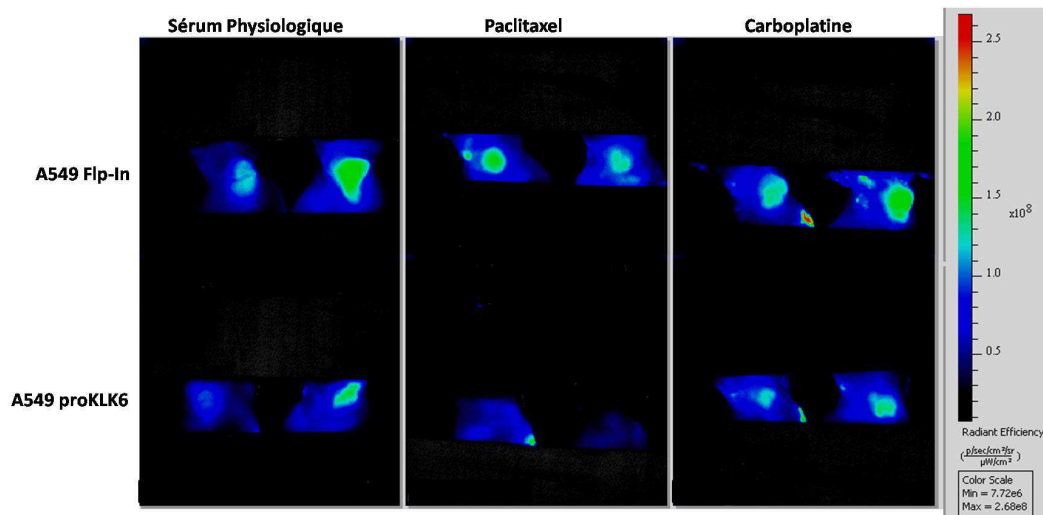


Figure 58 : Imagerie de l'annexine V au niveau des tumeurs.
 L'annexine V présente au sein des tumeurs a été mesurée par imagerie de fluorescence. L'intensité du signal est déterminée par une échelle de couleur présentée à droite.

Grâce aux caches, il a été possible de distinguer le marquage associé aux tumeurs, du bruit de fond. Cependant, il a été difficile de comparer les lots de souris du fait de la disparité de taille des tumeurs. Pour cette étude préliminaire, il a donc été décidé de faire la mesure de fluorescence sur les tumeurs explantées après autopsie (Figure n°59).

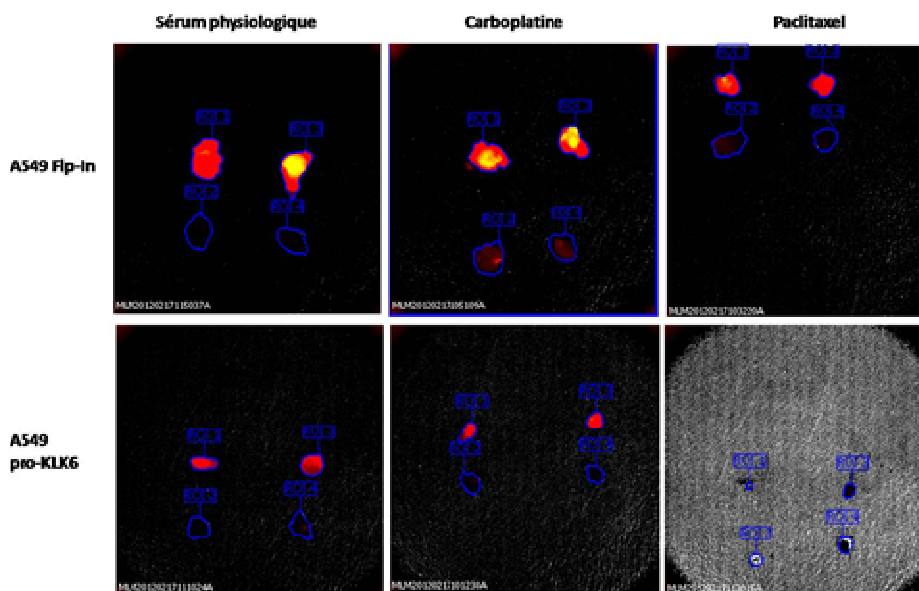


Figure 59 : Imagerie de fluorescence des tumeurs excisées (haut) et du muscle (bas).
 Après la mesure de fluorescence in vivo, une autopsie a été effectuée et les tumeurs ainsi que du muscle d'une taille équivalente à la tumeur ont été prélevés. Une imagerie de fluorescence a été effectuée sur les tumeurs ainsi que les muscles afin d'obtenir le bruit de fond.

L'intensité du signal a été calculée en traçant une région d'intérêt suivant le plus possible les contours des tumeurs. L'unité de mesure appliquée en fluorescence est la suivante : Avg Radiant Efficiency [$p/s/cm^2/sr$]/ $[\mu W/cm^2]$ ou p représente les photons, s les secondes, cm^2 les centimètres carré, μW les microwatts et sr les stéradians. Cela correspond à l'intensité moyenne détectée ramenée à $1 cm^2$ et corrigeant l'angle de mesure. Enfin, les valeurs obtenues ont été rapportées au bruit de fond mesuré par le signal présent dans un muscle. L'intensité de fluorescence au cm^2 et le volume tumoral obtenu après autopsie sont donnés dans la figure n°60.

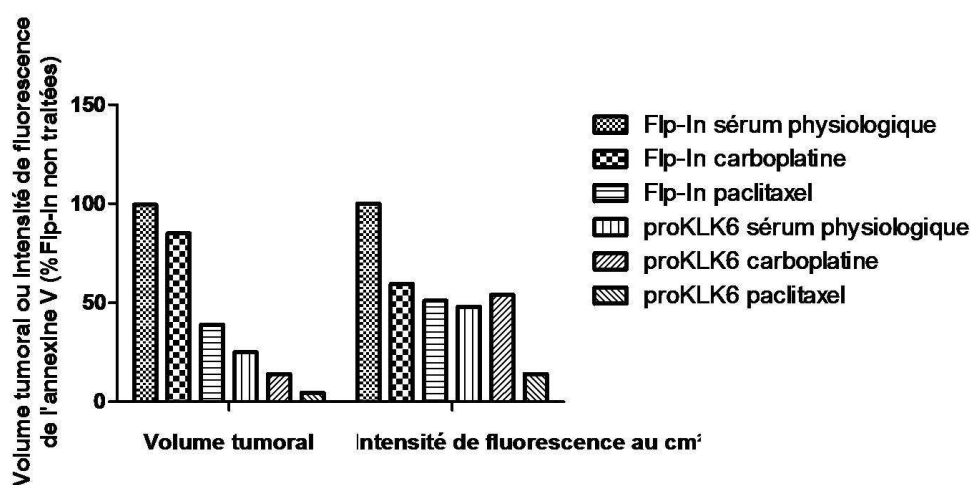


Figure 60 : Analyse des tumeurs explantées de souris ayant reçu de l'annexine V.

L'intensité de fluorescence et le volume tumoral de chaque lot sont indiqués sous forme d'histogrammes en pourcentage par rapport aux souris ayant reçu les cellules A549 FIp-In et traitées avec du sérum physiologique. Pour chaque lot, les résultats représentent la moyenne des deux souris analysées.

Comme le montre les mesures du volume tumoral, les souris soumises à l'imagerie de l'annexine V étaient bien représentatives des souris analysées dans cette étude. Ainsi, les tumeurs issues de cellules exprimant KLK6 étaient inférieures en taille à celles issues de cellules n'exprimant pas KLK6. De même, les plus petites tailles tumorales de chaque groupe correspondaient aux souris ayant été traitées avec du paclitaxel.

Les mesures d'intensité de fluorescence posent quant à elles des interrogations sur la correspondance pouvant exister entre le marquage de l'annexine V et l'apoptose, lors de ce type d'expérimentation. En effet, d'une manière globale, les marquages par cm^2 sont les plus intenses dans les tumeurs ayant le plus grossi ; là, où au contraire, on s'attendrait à avoir le moins de mort cellulaire par cm^2 . Il est donc probable qu'un autre facteur que la densité des cibles de l'annexine V ait modulé sa capture ou sa rétention.

Une explication pourrait résider dans des différences de vascularisation entre les tumeurs. Il est en effet connu que le degré de vascularisation d'une tumeur est étroitement lié à sa croissance. Il est donc envisageable que les plus grandes tumeurs aient été les plus vascularisées. A volume égal, ces grandes tumeurs auraient pu capter beaucoup plus d'annexine V injectée en intraveineuse que les petites, biaisant ainsi la correspondance entre quantité d'annexine V capturée et quantité de cibles présentes.

D'autres études sont donc nécessaires pour valider cette approche d'imagerie dans notre contexte. En travaillant dans les conditions présentes (hétérogénéité de taille tumorale), il faudrait réaliser une imagerie à des temps variable après injection de l'annexine V afin d'être sûr que les cibles de l'annexine V soient bien saturées dans les tumeurs les moins « perméables » et qu'une éventuelle rétention passive du traceur dans les tumeurs les plus « perméables » soit éliminée. La présence d'un fort marquage dans les reins, 44 heures après l'injection, soulève en effet la question de la vitesse d'élimination corporelle et tissulaire du marqueur en excès de cibles. Une alternative pourrait être d'imager des tumeurs de même taille. Cependant cette approche ne résoudrait pas d'éventuels problèmes liés à la densité de vascularisation ; elle présenterait également l'inconvénient d'avoir à imager des tumeurs d'âges différents et donc de temps de traitement différents.

Chapitre IV : Impact de la kallibréine 12 sur une famille de protéines matri-cellulaires : les CCN

La kallibréine 12 (KLK12) est un autre membre de la famille des kallibréines tissulaires. L'expression des transcrits de *KLK12* a été démontré dans une large variété de tissus tels que les glandes salivaires, l'estomac, le colon, le cerveau, le sein, la trachée, l'utérus, le poumon, le thymus, la thyroïde et la prostate (Yousef et al. 2000c). Ce gène est sous-exprimé dans le cancer du sein et sur-exprimé dans le cancer gastrique (Zhao et al. 2012). Il est sous le contrôle des hormones stéroïdiennes dans des lignées cellulaires du cancer du sein et de la prostate (Yousef et al. 2000c). Au moins quatre transcrits alternatifs sont connus (Kurlender et al. 2005). Tous ces variants sont prédits pour coder des protéines sécrétées, cependant seule la forme « classique » de KLK12 (Identification pour GenBank : NM_145894) est prédite pour avoir une activité enzymatique de type kallibréine avec une activité de type protéase à sérine. Au niveau protéique, la forme classique de KLK12 est synthétisée comme préproenzyme contenant un peptide signal en N-terminal de 17 acides aminés et un site de clivage pour l'activation entre les résidus 21 et 22. La forme mature de KLK12 consiste en 227 acides aminés avec un poids moléculaire estimé à 24,5 kDa. L'activité de KLK12 peut être régulée par une auto-dégradation, une inhibition par les ions Zn et par la formation d'un complexe covalent avec l' α 2-antiplasmine (Memari et al. 2007). La protéine KLK12 a été détectée dans les cellules endothéliales microvasculaires (Giusti et al. 2005), ainsi que dans le colon de fœtus et le fluide cervico-vaginal (Shaw and Diamandis 2007).

Très peu d'études ont été menées pour comprendre le rôle biologique de KLK12 *in vivo*. Ainsi, dans cette étude nous avons cherché à identifier des substrats de KLK12. La modification des protéines de la surface cellulaire par des protéases solubles peut être importante pour les processus physiologiques et pathologiques. C'est pour cela que notre étude a recherché une action de KLK12 au niveau de la membrane cellulaire. Pour cela nous avons utilisé une analyse du dégradome. Des cellules MDA-MB-231 ont été traitées avec ou sans KLK12, puis l'analyse des surnageants a été effectuée par spectrométrie de masse. Deux protéines ont été identifiées uniquement dans les surnageants des cellules traitées avec de la KLK12 parmi elles, la protéine CCN1 (voir l'article joint).

La famille des CCNs, nommée ainsi à partir de la découverte de ses trois premiers membres Cyr61 (Cystein rich 61, CCN1), CTGF (Connective Tissue Growth Factor, CCN2) et Nov (Néphroblastoma overexpressed, CCN3), comporte six membres : Cyr61, CTGF, Nov, WISP-1 (Wnt-1- induced secreted protein 1, CCN4), WISP-2 (CCN5) et WISP-3 (CCN6). Ce sont des protéines associées à la membrane plasmique et à la matrice extracellulaire. Les CCNs sont composées de quatre domaines modulaires riches en cystéine. La séquence signal située à l'extrémité N-terminale est suivie par un domaine de type domaine de liaison aux IGF (IGFBP), un domaine similaire à la répétition de type C du facteur « von Willebrand » (VWC), un domaine similaire à la répétition de type 1 de la thrombospondine (TSP) et un domaine CT correspondant à « un nœud » de cystéine à l'extrémité C-terminale. CCN5 se distingue des autres par l'absence de ce domaine CT (Figure n°61) (Holbourn et al. 2009).

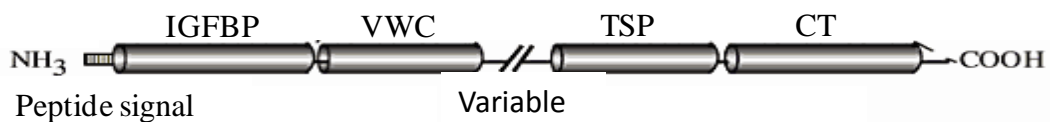


Figure 61 : Représentation générale de la structure des CCNs

Ces différentes protéines sont capables d'établir des interactions avec des récepteurs membranaires comme des intégrines, des constituants matriciels et des facteurs solubles (VEGF, TGF, FGF notamment). Elles jouent ainsi un rôle d'intégrateurs de signalisation et ont été impliquées dans la régulation de nombreux processus cellulaires comme l'adhésion, la migration, la prolifération, la différenciation et la survie (Chen and Lau 2009). Elles interviennent dans l'angiogenèse (Kubota and Takigawa 2007), l'inflammation (Kular et al. 2010), le développement cardio-vasculaire et squelettique (Kubota et al. 2007), dans des maladies fibrosantes (Daniels et al. 2009; Leask et al. 2009) et le cancer (Dhar and Ray 2010; Zuo et al. 2010).

Du fait de l'importance des CCNs dans de nombreux processus dont la tumorigenèse et l'angiogenèse, nous avons focalisé notre étude sur cette classe de substrats non encore identifiée pour une kallikréine. Les résultats obtenus sont résumés dans les paragraphes suivants et ont fait l'objet de la publication figurant dans ce chapitre.

En bref, nos travaux ont montré que KLK12 est capable de cliver *in vitro* tous les membres de la famille des CCN, mais avec une efficacité variable et en générant des profils différents (figure n°62).

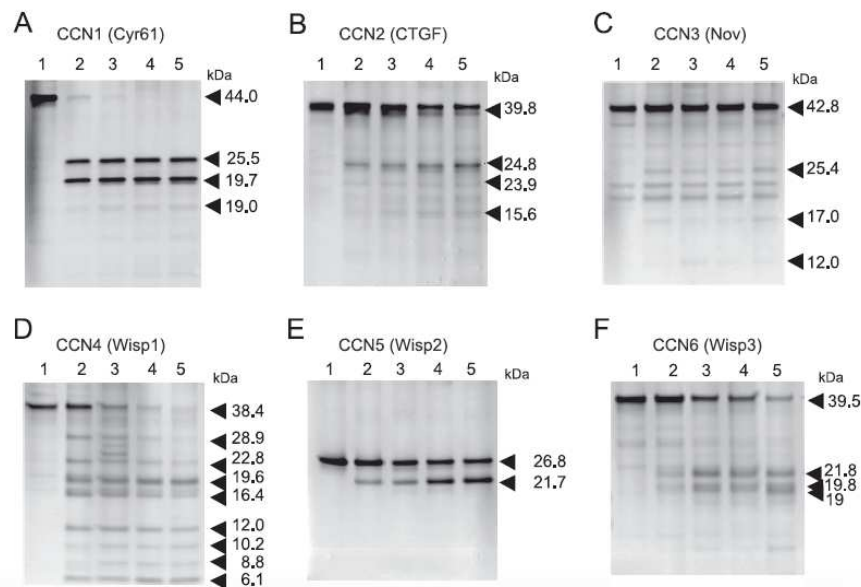


Figure 62 : Profil d'électrophorèse des fragments générés par le clivage des CCN par KLK12.
 Les protéines CCN recombinantes (A) CCN1, (B) CCN2, (C) CCN3, (D) CCN4, (E) CCN5, (F) CCN6 ont été incubées pendant 0 (ligne 1), 15 (ligne 2), 30 (ligne 3), 60 (ligne 4) et 120 (ligne 5) minutes avec de la KLK12 a un ratio enzyme/substrat de 1 :100. Après une électrophorèse en gel de polyacrylamide, les protéines ont été colorées au nitrate d'argent. Les flèches indiquent les CCN sous forme complètes et clivées par KLK12 avec la masse moléculaire apparente.

Nous avons consacré le reste de l'étude aux CCN1 et CCN5 car ces deux membres présentent un profil protéolytique simple. Le séquençage en N-terminal des fragments protéolytiques obtenus a permis d'identifier plusieurs sites de clivage. Cependant, les sites majeurs sont pour CCN1 entre les domaines VWC et TSP et pour CCN5 au niveau du domaine TSP (figure n°63).

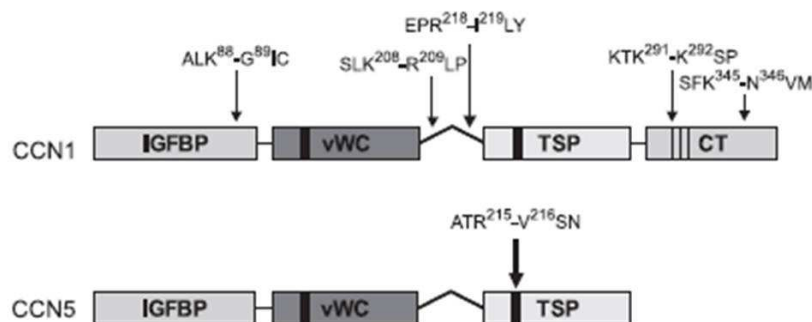


Figure 63 : Localisation des sites de clivage par KLK12.
 Le principal site de clivage est indiqué par une flèche en gras.

La capacité d'autres kallicroïnes (KLK1, 5, 6, 11, 13 et 14) à cliver les CCN a également été testée. On a pu observer que KLK14 pouvait cliver toutes les CCN, KLK5 clive CCN3, CCN4 et CCN6 tandis que KLK1 clive uniquement CCN1. Les autres kallicroïnes testées (6, 11 et 13) ne clivent pas les CCN *in vitro*.

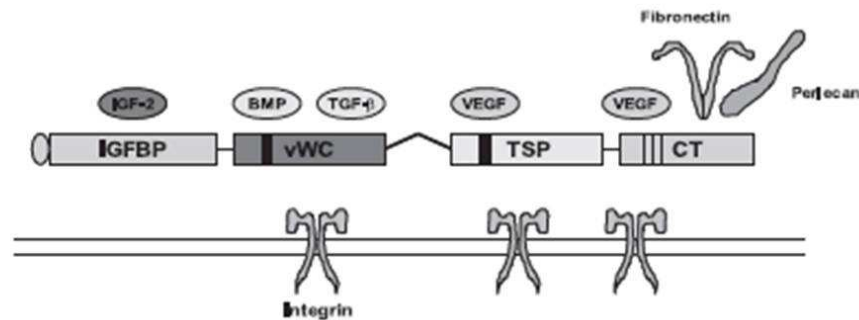


Figure 64 : Représentation schématique des sites de liaisons des CCN avec d'autres molécules.

Comme cela est schématisé sur la figure n°64, les CCNs sont capables de lier plusieurs facteurs solubles au niveau de différents domaines. Nous avons donc voulu connaître l'impact des clivages sur la fixation de ces facteurs. Par des méthodes de liaison en phase solide et d'analyses électrophorétiques, nous avons pu montrer:

- 1) que la fragmentation de CCN1 et de CCN5 pouvait empêcher la fixation du VEGF₁₆₅ sur ces molécules,
- 2) que les complexes déjà formés avec le VEGF₁₆₅, BMP2 et le TGF-β1 étaient dissociés suite au clivage de CCN1 ou CCN5 par KLK12. Alors que le VEGF et BMP2 sont libérés intacts, l'hydrolyse des complexes CCN-TGF-β1 peut conduire à une fragmentation à la fois de la CCN et du TGF-β1.
- 3) que le clivage des complexes CCN5-FGF2 libère FGF2 tandis que ce facteur reste associé à un domaine de CCN1 même après fragmentation de cette dernière.

Ces données ont révélé que le clivage des CCNs par KLK12 provoque la mobilisation de la plupart des facteurs solubles associés alors même que les sites de clivage sont situés à distance des sites de fixation. La fragmentation des CCNs induirait donc des changements conformationnels dans des domaines non affectés directement par l'hydrolyse altérant leurs propriétés de liaison.

Les protéines CCN sont également connues pour réguler différents processus cellulaires (migration, survie) via leur interaction directe avec des intégrines. Nous avons

donc testé l'impact d'une fragmentation par *KLK12* sur de tels processus. La migration cellulaire a été étudiée sur les cellules pulmonaires A549. On a observé que la migration de ces cellules est diminuée en présence de CCN1 intacte mais pas en présence de CCN1 clivée. La CCN5 intacte ou clivée ne modifie pas le comportement des cellules A549. La survie a été étudiée sur des cellules endothéliales HUVEC en induisant l'apoptose par une privation de sérum. On a pu observer que le rajout de CCN1 ou de CCN5 ne produisait aucun effet sur la survie cellulaire, tandis qu'une incubation avec leurs formes clivées diminuait significativement la survie cellulaire.

Enfin, nous avons analysé par RT-qPCR l'expression des transcrits de *KLK12*, CCN1 et CCN5 dans les tissus sains et tumoraux de patients atteints de cancer du poumon afin de vérifier leur coexistence au niveau pulmonaire. Nous avons constaté une augmentation significative de *KLK12* dans les tissus tumoraux alors que l'expression des gènes codant CCN1 et CCN5 chute dans les même tissus.

En résumé, notre étude suggère que l'hydrolyse des CCN par *KLK12* serait impliquée dans la biodisponibilité et/ou l'activité de plusieurs facteurs de croissance incluant le VEGF₁₆₅, BMP2, TGF- β 1 et FGF-2. Puisque *KLK1*, 5, 12 et 14, les CCN et les facteurs de croissance cités précédemment coexistent dans diverses situations, la fragmentation des CCN par les *KLK* pourrait jouer un rôle dans divers processus physiologiques et pathologiques incluant l'angiogenèse et la tumorigenèse.

Supplemental Material can be found at:
<http://www.jbc.org/content/suppl/2011/05/31/M110.213231.DC1.html>

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 286, NO. 29, PP. 25505–25518, JULY 22, 2011
 © 2011 BY THE AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, INC. PRINTED IN THE U.S.A.

Kallikrein-related Peptidase 12 Hydrolyzes Matricellular Proteins of the CCN Family and Modifies Interactions of CCN1 and CCN5 with Growth Factors^{*S1}

Received for publication, December 16, 2010, and in revised form, May 24, 2011. Published, JBC Papers in Press, May 31, 2011, DOI 10.1074/jbc.M110.213231

Audrey Guillon-Munos[‡], Katerina Oikonomopoulou[§], Noémie Michel[‡], Christopher R. Smith[¶], Agnès Petit-Courty[‡], Sylvie Canepa^{||}, Pascale Reverdiau[‡], Nathalie Heuzé-Vourc'h[‡], Eleftherios P. Diamandis[¶], and Yves Courty^{†1}

From the [‡]INSERM U618-Université François Rabelais, Faculté de Médecine, 2 bis bd Tonnellé, 37032 Tours, France, the [§]Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Pennsylvania, School of Medicine, Philadelphia, Pennsylvania 19104-6100, the [¶]Department of Pathology and Laboratory Medicine, Mount Sinai Hospital, Toronto, Ontario M5G 1X5, Canada, and the ^{||}Biacore Laboratory, UMR INRA-CNRS-Université de Tours-Haras Nationaux, 37380 Nouzilly, France

Kallikrein-related peptidases (KLKs) are an emerging group of secreted serine proteases involved in several physiological and pathological processes. We used a degradomic approach to identify potential substrates of KLK12. MDA-MB-231 cells were treated either with KLK12 or vehicle control, and the proteome of the overlying medium was analyzed by mass spectrometry. CCN1 (cyr61, ctgf, nov) was among the proteins released by the KLK12-treated cells, suggesting that KLK12 might be responsible for the shedding of this protein from the cell surface. Fragmentation of CCN1 by KLK12 was further confirmed *in vitro*, and the main cleavage site was localized in the hinge region between the first and second half of the recombinant protein. KLK12 can target all six members of the CCN family at different proteolytic sites. Limited proteolysis of CCNs (cyr61, ctgf, nov) was also observed in the presence of other members of the KLK family, such as KLK1, KLK5, and KLK14, whereas KLK6, KLK11, and KLK13 were unable to fragment CCNs. Because KLK12 seems to have a role in angiogenesis, we investigated the relations between KLK12, CCNs, and several factors known to be involved in angiogenesis. Solid phase binding assays showed that fragmentation of CCN1 or CCN5 by KLK12 prevents VEGF₁₆₅ binding, whereas it also triggers the release of intact VEGF and BMP2 from the CCN complexes. The KLK12-mediated release of TGF- β 1 and FGF-2, either as intact or truncated forms, was found to be concentration-dependent. These findings suggest that KLK12 may indirectly regulate the bioavailability and activity of several growth factors through processing of their CCN binding partners.

Human tissue kallikrein-related peptidases (KLKs)² belong to a subgroup of secreted serine proteases within the S1 family

of clan SA. So far, 15 members of the family (KLK1–15) have been identified and found expressed in a large number of tissues and cell populations (1). KLKs play important roles in different pathophysiological processes (2) such as skin desquamation (3), innate immunity (4), semen liquefaction (5), dental enamel formation (6), neuro-degeneration (7), cervicovaginal physiology (8), and angiogenesis (9). Furthermore, dysregulated kallikrein-related peptidase gene and protein expression has been implicated in cancer (10). In particular, numerous clinical studies have linked the differential expression signatures of *KLK* genes and proteins to their potential roles as cancer biomarkers (11). Kallikrein-related peptidases may be involved in different stages of cancer growth and progression including cell growth and survival, differentiation, remodeling of extracellular matrix, invasion, angiogenesis, and metastasis (4, 10, 12).

Elucidation of each protease substrate repertoire is crucial to understand the biological roles of KLKs. Potential substrates for these proteases have been identified both in the extracellular space and at the plasma membrane. Members of the KLK family have been reported to hydrolyze components of the extracellular matrix such as collagens, laminin, fibronectin, and vitronectin (13, 14). Depending on the cellular context, this hydrolysis may promote or inhibit cell migration and invasion. Several lines of data indicate that KLKs may also regulate the bioavailability of hormones and growth factors. For instance, several KLKs (KLKs 4–6, 8, 13, and 14) were shown to cleave human growth hormone yielding to various inactive isoforms (15). Conversely, KLK3 was reported to activate latent TGF- β (16), and KLKs 1, 2, 3, 4, 11, and 14 were proposed to modify the bioavailability of insulin-like growth factors (IGFs) by fragmentation of IGF-binding proteins (IGFBP) (13, 14). Moreover, KLKs have been involved in regulation of cell-cell interactions through hydrolysis of desmosomal cadherins (17) and shedding of E-cadherin (18). Finally, it is currently known that KLKs regulate cell signaling via the protease-activated receptors (19).

KLK12 was originally cloned using the positional candidate gene approach (20). This gene has five coding exons and one 5'-untranslated exon with at least four alternatively spliced forms known to date (21). All spliced forms are predicted to

* This work was supported by INCa Grant MATRIGO, Région Centre Grant KalliCap, and Association pour la Recherche sur le Cancer Grant 7935.

^{S1} The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Table S1.

¹ To whom correspondence should be addressed: INSERM U618-Faculté de Médecine, 10 Boulevard Tonnellé, F-37032 Tours cedex 1, France. Tel.: 33-2-47-36-60-50; Fax: 33-2-47-36-60-46; E-mail: courty@univ-tours.fr.

² The abbreviations used are: KLK, kallikrein-related peptidase; CCN, cyr61, ctgf, nov; IGF, insulin-like growth factor; IGFBP, IGF-binding protein domain; VWC, von Willebrand type C domain; TSP, thrombospondin; CT, cysteine knot; HUVEC, human umbilical vein endothelial cell; ACN, aceto-

nitrile; BMP, bone morphogenetic protein; ECM, extracellular matrix; NSCLC, nonsmall cell lung carcinoma; DTA, data tuning advisor; MMP, matrix metalloproteinase.

KLK12 Hydrolysis of CCN Proteins

produce secreted proteins; however, the “classical” form of KLK12 (GenBank accession number NM_145894) is the only protein product that represents a typical kallikrein-like enzyme with expected serine protease activity. The classical KLK12 in its mature form consists of 227 amino acids with a predicted mass of 24.5 kDa. Active KLK12 possesses trypsin-like activity, targeting peptide bonds featuring either arginine or lysine at their P1 position. The activity of KLK12 can be tightly regulated by autodegradation, by interaction with zinc ions, and by covalent complex formation with α 2-antiplasmin (22). RT-PCR and ELISA analyses has shown that *KLK12* is highly expressed in a variety of human tissues, such as bone and bone marrow, colon, lung and trachea, prostate, salivary glands, and stomach (1, 20).

Despite substantial progress in the understanding of the pathophysiological functions of KLKs, examination of the *in vivo* role of KLK12 has been minimal, and no biological substrate for this protease is known to date. We acknowledge that modification of cell surface proteins by plasma membrane and soluble proteases can be important for physiological and pathological processes. We therefore recruited a degradomic approach to identify substrates of KLK12 using a cell culture model system. Biochemical analysis of the potential substrates pointed to the matricellular proteins of the CCN family as targets of KLK12 and revealed that proteolytic processing of CCN1 and CCN5 mobilizes several growth factors bound to these proteins. Our findings suggest an involvement of KLK12 in different homeostatic and disease pathways through modulation of growth factor availability and/or activity.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Clinical Samples—Matched samples of tumor and nontumor tissue were obtained from 45 patients who had undergone lung cancer resection as their primary therapy without preoperative radiation or chemotherapy. Tumor and nontumor tissue samples were selected by a pathologist from each fresh surgical specimen, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C . The control nonmalignant tissue samples were taken from sites at least 3 cm away from the edge of the tumor. Histological diagnosis was performed, and tumor grade was determined in accordance with the WHO classification of lung tumors. The tissue specimens were banked with informed consent in compliance with the Helsinki Accord and French bioethical regulations.

Reagents—ProKLK12, proKLK1, and IGF-2 were from R & D Systems (Minneapolis, MN); CTGF (CCN2) and anti-TGF were from BioVendor GmbH (Heidelberg, Germany) and Clinisciences (Montrouge, France), respectively; whereas all other CCNs, the cytokines, and biotinylated antibodies were purchased from Pepro Tech Ec Ltd. (London, UK). Polyclonal antibody to pTyr996 VEGFR-2 was from Acris Antibodies (Herdorf, Germany). Recombinant proKLKs 5, 6, 11, 13, and 14 were obtained as described previously (23, 24). Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), endothelial cell growth medium, endothelial cell basal medium, and VEGF were purchased from PromoCell GmbH (Heidelberg, Germany). MDA-MB-231 (from breast cancer; ATCC number HTB-26) and A549 (from lung cancer; ATCC number CCL-185) cells were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS. RPMI

1640, Invitrogen™ CD CHO medium, and FBS were from Invitrogen.

Proteome Analysis of Cell Culture Media—MDA-MB-231 cells were grown in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS in culture flasks (surface area, 175 cm^2) until 80% confluency. The cells were extensively washed with PBS to remove extracellular proteins and incubated in 40 ml of CD CHO serum-free medium supplemented with $400\ \mu\text{l}$ of KLK12 activation buffer containing $0.1\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ active KLK12 for 30 min at 37°C . Untreated control cells were similarly incubated in the absence of KLK12. Overlaying media were collected, and cell debris was removed by centrifugation. The media were freeze-dried, and the powdered samples were resuspended in 8 M urea. Protein disulfide bonds were reduced in the presence of 30 mM DTT and 150 mM NH_4HCO_3 at 50°C for 30 min and then alkylated with 125 mM iodoacetamide for 1 h in the dark at room temperature. The samples were then desalted using a NAP-5 column (GE Healthcare Life Sciences) and lyophilized to dryness. The proteins were digested overnight with sequence grade modified trypsin (Promega) (1:50) at 37°C and lyophilized. The peptides were reconstituted in $120\ \mu\text{l}$ of mobile phase (0.26 M formic acid in 10% acetonitrile) and loaded directly onto a Poly-SULFOETHYL A™ column with a $2.0\text{-}\mu\text{m}$ pore size and a $5\text{-}\mu\text{m}$ diameter (The Nest Group Inc.). A 1-h fractionation was performed using HPLC with an Agilent 1100 system. A linear gradient was used with 0.26 M formic acid in 10% acetonitrile (ACN) as running buffer and 1 M ammonium formate as elution buffer. Forty fractions ($200\ \mu\text{l}$) were collected and pooled into eight groups. Each of the eight fraction groups was concentrated to $100\ \mu\text{l}$ using a SpeedVac system. The peptides in each fraction were purified with a ZipTip C_{18} pipette tip (Millipore) and eluted in $4\ \mu\text{l}$ buffer B (90% ACN, 0.1% formic acid, 10% H_2O , 0.02% TFA). The peptides were initially bound to a 2-cm C_{18} precolumn with a $200\text{-}\mu\text{m}$ diameter and eluted onto a resolving 5-cm analytical C_{18} column ($75\text{-}\mu\text{m}$ diameter) with a 15-mm tip (New Objective). The liquid chromatography setup was connected to a Thermo LTQ Orbitrap XL mass spectrometer with a nanoelectrospray ionization source (Proxeon). Analysis of the eluted peptides was done by tandem mass spectrometry in positive-ion mode. A two-buffer system was utilized where Buffer A (running) contained 0.1% formic acid, 5% ACN, and 0.02% trifluoroacetic acid in water and Buffer B (elution) contained 90% ACN, 0.1% formic acid, and 0.02% trifluoroacetic acid in water. The MS1 scans were acquired in the Orbitrap at a resolution of 60,000; the MS2 scans were acquired in the Orbitrap at a resolution of 7,500. The Orbitrap was tuned and calibrated according to manufacturer's instructions. All data-dependent scan events had an isolation width set to 3.0. Data analysis DTAs were created using the Mascot Daemon v2.16 and extract_msn (Matrix Science, London, UK). The parameters for DTA creation were as follows: minimum mass, 300 Da; maximum mass, 4,000 Da; automatic precursor charge selection; minimum peaks, 10 per MS/MS scan for acquisition; and minimum scans per group, 1. Mascot (Matrix Science; version 2.1.03) was used to analyze the resulting Mascot Generic Files with a forward and reverse concatenated International Protein Index human database (version 3.62; ~ 167894 entries). No enzyme was selected for the digestion enzyme to accommo-

KLK12 Hydrolysis of CCN Proteins

date different proteolytic specificities, and searches were performed with fixed carbamidomethylation of cysteines and variable oxidation of methionine residues. A fragment tolerance of 0.1 Da and a parent tolerance of 7 ppm were considered. This operation resulted in eight DAT files for each enzyme-treated and control sample. Scaffold (version Scaffold-2_00_00, Proteome Software Inc., Portland, OR) was utilized to validate MS/MS-based peptide and protein identifications. Peptide thresholds of ion minus identity scores of greater than -7 and ion scores of greater than 10 for 2+ and 3+ ions were utilized. These settings provided one match to the reverse database and 71 matches to the forward database, resulting in a false positive rate of 1.4%. Each protein was assigned a cellular localization based on information from Swiss-Prot and Genome Ontology databases.

Substrate Cleavage Validation—proKLK12 (100 ng/ μ l) was autoactivated by incubation in TCNT buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 0.05% Tween 20) overnight at 37 °C. Substrate cleavages were performed in TCNT at 37 °C, and the reaction products were analyzed by 4–12% gradient SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (NuPAGE; Invitrogen) and silver-stained using the Silver Xpress Silver staining kit (Invitrogen). The mass of cleavage fragments was determined by MALDI-TOF MS on a Voyager-DE STR biospectrometry work station. N-terminal Edman sequencing was used to identify the neo-N termini of cleavage products.

Surface Plasmon Resonance Spectroscopy—Surface plasmon resonance experiments were performed on BIAcore T100 (GE Healthcare). VEGF₁₆₅ was immobilized at 100–300 resonance units on a CM4 sensor chip (GE Healthcare), using standard amine coupling protocol according to the manufacturer's instructions. Insulin was used for control surface and was immobilized at similar levels. Binding analyses were carried out at a flow rate of 30 μ l min⁻¹ at 25 °C. Intact or KLK12-fragmented CCN1 and CCN5 that were diluted into the running buffer (10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20) were injected over the control and VEGF surfaces for 180 s. Dissociation was studied for 300 s. Regeneration of the surfaces was performed with 100 mM H₃PO₄ for 40 s followed by two washes with 2 M NaCl for 60 s. The response of the control surface was subtracted from the responses obtained on the VEGF surfaces.

Solid Phase Binding Assays—96-well microtiter plates (black, MaxiSorp; Nunc) were coated overnight at 4 °C with 10 pmol of CCN1 (400 ng) or CCN5 (250 ng) or with blocking solution (casein 0.1% or Pierce superblock reagent) control diluted in TBS. The plates were then washed three times with TBS containing 0.1% Tween 20, blocked for 4 h at room temperature, and washed three times with TBS-Tween 20. To form the complexes with VEGF, BMP2, TGF- β , or FGF-2, the coated plates were incubated overnight at 4 °C with 100 ng of the protein diluted in the blocking solution and then washed three times with TBS-Tween 20. The immobilized complexes were incubated 3 h at 37 °C with activated KLK12 (using an enzyme/CCN ratio of 1/100 or 1/25) diluted in 100 μ l TCNT. After digestion, the wells were washed three times with TBS-Tween 20, and bound ligands were quantified by ELISA. Biotinylated antibodies were diluted in TBS-Tween 20 and detected with alkaline phosphatase-conjugated streptavidin (Jackson Immuno-

Research Laboratories) and developed with 100 μ l of 4-Methylumbelliferyl phosphate solution (Sigma-Aldrich) according to standard procedures. Substrate formation corresponding to bound ligands was determined by measuring fluorescence at 440 nm using a fluorimeter (WALLAC Victor 2; PerkinElmer Life Sciences).

HUVEC Cell Proliferation—HUVECs (1×10^5 cells/well; third to fifth cell passage) were seeded in 96-well plates and grown for 72 h in endothelial cell growth medium supplemented with VEGF (20 ng/ml) alone or with VEGF preincubated overnight at 4 °C with intact or KLK12-fragmented CCN1 and CCN5 (0.5 μ g/ml). Endothelial cell proliferation was evaluated by MTS assay (Promega; France) as per the manufacturer's instructions.

Western Blotting—HUVECs (1×10^5 cells/ml) in endothelial cell growth medium were seeded on six-well plates. At 70% confluency, HUVECs were serum-deprived for 18 h. Subsequently, the addition of VEGF (10 or 40 ng/ml) alone or VEGF preincubated for 16 h at 4 °C with intact or KLK12-fragmented CCN1 and CCN5 (VEGF: CCN molar ratio of 1:3; 1:10; or 1:40) was performed. After 10 min of incubation at 37 °C, 5% CO₂, in basal medium, the cells were lysed in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 1 mM orthovanadate, 1 \times protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). The cell lysates were boiled for 7–10 min, electrophoretically separated on 4–12% Bis-Tris NuPAGE gels (Invitrogen) for 1.5 h at 150 V, and transferred to Immobilon-P polyvinylidene difluoride membranes (Millipore) for 3 h at 70 V. The membranes were blocked in 5% BSA, 0.1% Tween 20, PBS and incubated overnight at 4 °C with primary antibody against phosphor-VEGFR2 (1:500). SuperSignal® West Dura extended duration chemiluminescent substrate (Pierce) was used for detection. The stripped membranes were reprobed with monoclonal β -actin antibody (1:2,000; Sigma-Aldrich) as an indicator of protein integrity and loading control.

Expression Analysis in Lung Cancer Patient of the CCN1, CCN5, and KLK12 Genes—Total RNA was extracted using the RNeasy kit (Qiagen) and used for cDNA synthesis as described previously (25). The *KLK12* (forward primer, 5'-CCCCTGCC-CAATGACTGTG-3'; reverse primer, 5'-ATGTTGCTCGTG-ATTCTCCCG-3'; PrimerBank identifier 22208987a3*), *CCN1* (forward primer, 5'-GTG ACGAGGATAGTATCAAGGACC-3'; reverse primer, 5'-ATTTCTGGCCTTGTAAGGGTTG-3'), and *CCN5* (forward primer, 5'-CACGCTGCCTGGTCTGTCTGGATC-3'; reverse primer, 5'-CACGCATAGGCTTGT-ATTCAGGAAC-3') primer sets were designed to target two exons. For the quantitative RT-PCR studies, 1 μ l of cDNA was used in a 19- μ l PCR mix containing 1 \times SYBR Premix Ex Taq (Takara) and 0.2 μ M of each primer. Each assay included three no-template controls, cDNA samples in duplicate and calibrator (pool of cDNAs from tumor and nontumor lung tissue samples) in triplicate. Amplification was performed in a Light Cycler 480 (Roche Applied Science) with denaturation for 30 s at 95 °C followed by 45 PCR cycles of denaturation at 95 °C for 5 s and annealing or extension at 60 °C for 20 s. The Light Cycler 480 system software was used to monitor the changes in fluorescence of SYBR Green I dye in every cycle; fluorescent KLK12 product was measured by a single acquisition mode for 15 s at

KLK12 Hydrolysis of CCN Proteins

84 °C after each cycle. The specificity of the PCR reactions was established through both melting curve and electrophoresis gel analyses. *18 S rRNA* was used for the normalization of the quantity of RNA used. Its C_T value was subtracted from that of the target gene to obtain a ΔC_T value. The difference ($\Delta\Delta C_T$) between the ΔC_T values of the samples and the ΔC_T value of the calibrator was determined. The relative quantitative value was expressed as $2^{-\Delta\Delta C_T}$, representing the amount of target gene expression (normalized to *18 S rRNA*) relatively to the calibrator.

Wound Healing—A549 cells were seeded in 6-well plates and grown in complete medium to 80% confluency before disrupting the cell monolayer by scratching with a 100- μ l sterile tip. Floating cells were washed twice with serum-free medium, and the cells were grown for 24 h in 0.5% FBS medium containing intact or KLK12-fragmented CCNs (1 μ g/ml) prior to migration analysis. The pictures were obtained from the scratching sites, and cell migration analysis was performed with Image J NIH free software.

Endothelial Cell Viability Assay—HUVECs (10,000 cells/well; third to fifth cell passage) were seeded in 96-well plates and grown for 24 h in endothelial cell growth medium. The cells were washed once in endothelial basal medium and cultured for 24 h in 100 μ l of basal medium supplemented with intact or KLK12-fragmented CCNs (0.5, 1, or 2 μ g/ml) or with VEGF (20 ng/ml) pretreated or not with KLK12. Endothelial cell survival was evaluated by MTS assay (Promega, France).

Statistical Analysis—The measured values are expressed as medians \pm quartiles. In the mobilization assay, the difference between KLK12-treated or untreated complexes was analyzed by the Wilcoxon-Mann Whitney test used for unpaired samples. The wound healing and viability assays were analyzed using the Kruskal and Wallis test. The difference between the amounts of transcripts in noncancerous and cancerous tissues was determined using a Wilcoxon matched pairs test. *p* values less than or equal to 0.05 were considered significant.

RESULTS

Identification of CCN1 in Overlying Medium of Cells Treated with KLK12—To screen for KLK12 substrates located at the cell surface, MDA-MB-231 cells were treated either with KLK12 or vehicle control in serum-free medium. After 30 min of treatment, the overlying media were collected, and the protein content was analyzed by mass spectrometry. Seventy different proteins (supplementary data) were identified in the overlying media using high stringency peptide confidence levels (>99%). Among them, 34 proteins were unique to the medium from KLK12-treated cells. Each protein was assigned a cellular localization based on information available from Swiss-Prot, Genome Ontology, or Human Protein Reference database. The largest number of protein identities (32 of 34) corresponded to cytoplasmic and nuclear proteins, indicating that cell death/lysis had occurred during the incubation time. This high proportion of intracellular proteins may be explained by the fact that even small numbers of lysed cells can contribute to a large proportion of proteins in the conditioned medium, whereas the short incubation time is at the same time restrictive for high secreted protein expression. These intracellular proteins do not constitute substrates of a secreted/extracellular protease like

KLK12 and were thus excluded from further analysis. The remaining identities were assigned to two plasma membrane-associated proteins, Annexin A2 (Swiss-Prot P07355) and Cyr61 (CCN1, Swiss-Prot Q00622).

Annexin A2 is one of a dozen annexin family members expressed in humans. The annexins are mainly intracellular, and most play important roles in membrane trafficking, plasma membrane reorganization during signaling, and calcium regulation. Annexin A2 can be directed to membrane surfaces where it binds viruses, bacteria, and several proteins like plasminogen, tissue plasminogen activator, and factor Xa (26).

Cyr61 (CCN1) is a cysteine-rich protein belonging to the CCN family of six related members designated CCN1–CCN6. These members have emerged as extracellular plasma membrane- and matrix-associated proteins that play critical roles in cardiovascular and skeletal development, fibrotic diseases, and cancer. CCNs are typically comprised of four conserved cysteine-rich modular domains that directly interact with integrin receptors, growth factors, and cytokines. The archetypal structure of a CCN protein (see Fig. 2A) consists of an N-terminal secretory signal peptide followed by an IGFBP, a von Willibrand factor type C repeat module (VWC), a thrombospondin type 1 repeat module (TSP), and a cysteine knot-containing module (CT) (27). CCN5 is devoid of the CT module. The N- and C-terminal halves of the proteins are connected by a hinge region varying greatly in length and sequence.

Validation of CCN Proteins as Substrates for KLK12—Because of the well known extracellular localization of CCNs and their emerging role in human diseases, we elected to focus our further analyses on this family. To confirm the cleavage of CCN1 by KLK12, a time course digestion of the recombinant form was carried out and monitored by SDS-PAGE and silver staining. A nearly complete digestion of CCN1 was observed after a 30-min incubation at an enzyme:substrate ratio of 1:100 (w/w) (Fig. 1A). Fragmentation of CCN1 by KLK12 was still visible at a lower enzyme:substrate ratio of 1:1,000 (w/w) (data not shown). Two main fragments were generated and further identified by mass spectrometry (MALDI-TOF): the longer fragment (20,495 Da) corresponded to the N-terminal part, and the shorter fragment (19,378 Da) corresponded to the C-terminal part of CCN1. It should be noted that the apparent masses (Fig. 1A) are greater than those determined by mass spectrometry, possibly indicating aberrant migration of the peptides in gel. Next, we investigated whether KLK12 can cleave other members of the CCN family. As shown in Fig. 1, all of the recombinant CCNs were fragmented following incubation with KLK12. Among the six recombinant CCNs examined, CCN1 was hydrolyzed most efficiently. Interestingly, the fragmentation pattern was unique for each member with a complexity varying from one visible product for CCN5 (Fig. 1E) to nine for CCN4 (Fig. 1D).

N-terminal sequencing analyses of the CCN1 and CCN5 proteolytic fragments generated by KLK12 identified several cleavage sites (Fig. 2B). The major cleavage site in CCN1 was found in the hinge region between the VWC and TSP domains, whereas the major cleavage site identified in CCN5 is located in the TSP domain (Fig. 2B). This domain corresponds to the binding site of integrin $\alpha 6\beta 1$ (28). In CCN1, the Lys⁸⁸–Gly⁸⁹

KLK12 Hydrolysis of CCN Proteins

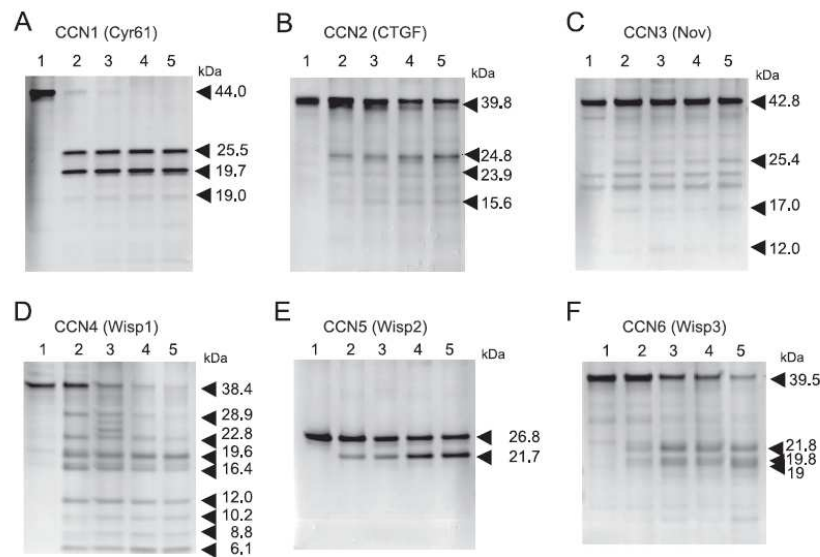


FIGURE 1. KLK12 proteolytic processing of the six members of the CCN family. Time course analysis of KLK12 hydrolysis of recombinant CCNs on silver-stained 4–12% SDS-PAGE gels is shown. CCNs were incubated with KLK12 (enzyme:substrate ratio of 1:100, w/w) for 0 (lanes 1), 15 (lanes 2), 30 (lanes 3), 60 (lanes 4), and 120 (lanes 5) min. The arrows indicate full-length CCNs and KLK12-cleaved protein fragments and their apparent molecular masses. A, CCN1. B, CCN2. C, CCN3. D, CCN4. E, CCN5. F, CCN6.

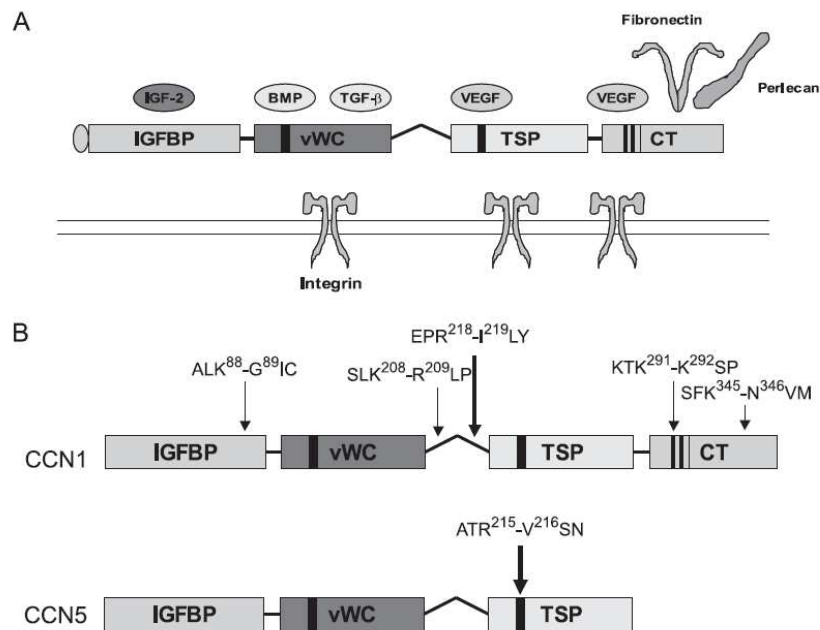


FIGURE 2. Interaction of CCN proteins with other molecules and localization of the cleavage sites by KLK12. A, schematics of CCN protein structure and localization of interactions with other molecules. B, localization of the cleavage sites by KLK12. The main cleavage site is indicated in bold arrows.

bond, which was secondarily hydrolyzed by KLK12, is located at the end of the IGFBP domain in a flexible region separating this area from the VWC domain (29). This site is absent in CCN5. A secondary cleavage also occurred at the Lys²⁹¹–Lys²⁹² bond in the α6β1 binding site contained in the CT domain of CCN1 (28).

Processing of CCN Proteins by other KLKs in Vitro—To screen for potential processing of all CCNs by representative KLKs, recombinant KLKs 1, 5, 6, 11, 13, and 14 were incubated *in vitro* with CCN1–CCN6 at an enzyme:substrate ratio of 1:100 (w/w). Of these KLKs, KLK14 had the broadest activity, either cleaving or degrading all CCNs (Fig. 3). KLK14 appeared to almost

KLK12 Hydrolysis of CCN Proteins

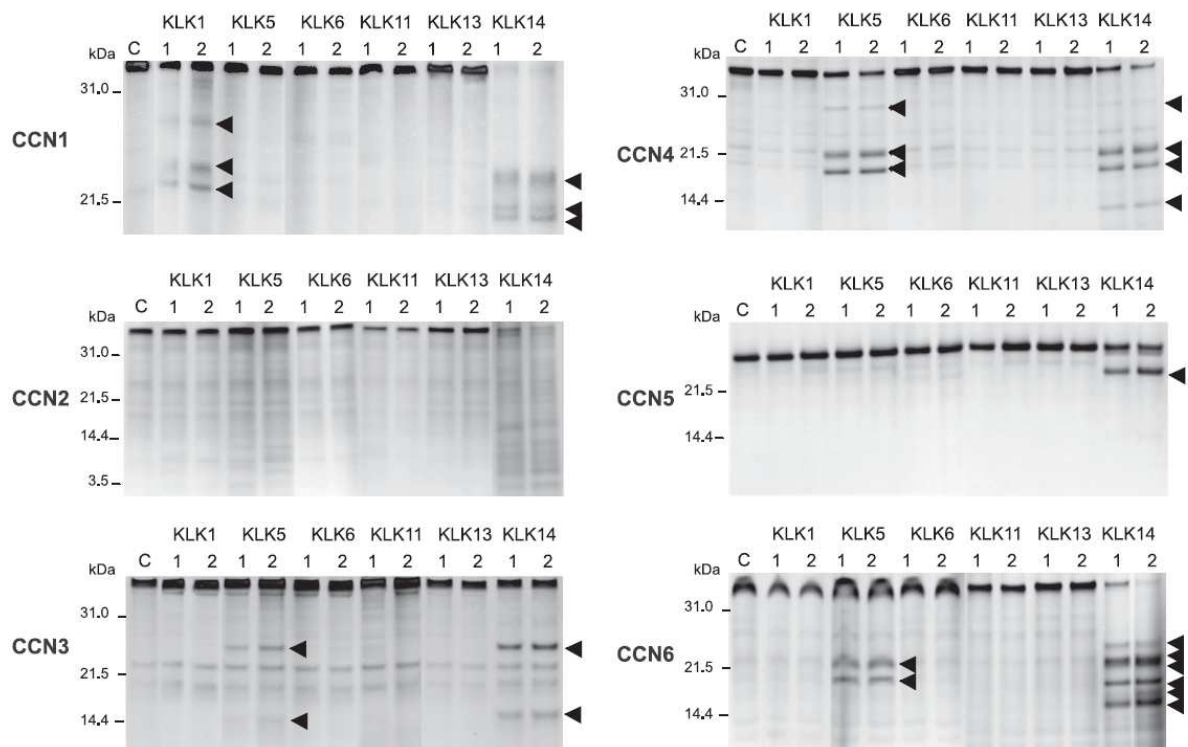


FIGURE 3. Proteolytic processing of CCNs by different KLKs. Analysis of KLKs 1, 5, 6, 11, 13, and 14 hydrolysis of recombinant CCNs on silver-stained 4–12% SDS-PAGE gels is shown. CCNs were incubated with the KLKs (enzyme:substrate ratio of 1:100, w/w) for 1 (lanes 1) and 2 h (lanes 2). The arrows indicate KLK-generated protein fragments.

entirely degrade CCN2 in small fragments ranging from 3 to 14 kDa. Except from CCN5, the CCN fragmentation patterns generated by KLK14 were substantially different from those generated by KLK12. KLK5 processed CCN3, CCN4, and CCN6, whereas KLK1 only cleaved CCN1 in a manner different from that of KLK12 and KLK14. Under our assay conditions, we did not detect cleavage of CCNs by KLKs 6, 11, and 13. This points to a distinct specificity of each KLK for CCN cleavage regardless of their common preference for proteolytic targeting of sites following basic residues.

Cleavage of CCN1 or CCN5 Complexes Mobilizes Functional VEGF—Previous studies have showed that CCN proteins have physical interactions with growth factors and modulate their bioavailability and/or their activity. We therefore examined the impact of KLK12 proteolytic activity on the CCN-growth factor interactions. Using both the technique of surface plasmon resonance (Fig. 4, A and B) and a solid phase assay (Fig. 4E), we observed a VEGF₁₆₅ binding to intact CCN1 and CCN5, whereas this interaction was inhibited when CCNs were previously fragmented by KLK12 (Fig. 4, A and B).

Growth factors that bind to CCNs might either mask or stabilize the cleavage sites of CCN1 or CCN5, thus preventing their proteolytic degradation. Therefore, we investigated whether the VEGF-complexed CCNs can be equally fragmented by KLK12. SDS-PAGE analysis showed that identical patterns of cleavage were observed for CCN1 and CCN5 regardless of being coupled with VEGF₁₆₅ (Fig. 4, C and D).

VEGF₁₆₅ is known to be susceptible to degradation by several serine proteases including plasmin, trypsin, chymotrypsin, and elastase (30, 31). However, this growth factor was resistant to the proteolytic action of KLK12 in our settings (Fig. 4, C and D) and was released from CCN1 or CCN5 complexes immobilized to solid matrices upon incubation with the protease (Fig. 4E). Furthermore, VEGF₁₆₅ retained its bioactivity on HUVECs after treatment with KLK12 (Fig. 4F). Subsequently, we examined whether VEGF activity was modified in the presence of intact or KLK12-fragmented CCN1 and CCN5. Treatment of HUVEC with soluble VEGF-CCN1 complexes stimulated both VEGF receptor phosphorylation (Fig. 5A) and cell proliferation (Fig. 5C), as did free VEGF alone or VEGF plus fragmented CCN1. Similar results were obtained with CCN5 (Fig. 5, B and D). Phosphorylation of VEGFR2 was observed even with a large excess of intact CCN (VEGF:CCN ratio, 1:40; data not shown), suggesting that residual-free VEGF is not responsible for stimulation of VEGFR2.

KLK12 Processing of CCN1 or CCN5 Complexes Mobilizes Intact BMP2—It has been shown that CCN2, CCN3, and CCN6 can physically interact with bone morphogenetic proteins (BMP) and inhibit their activity, likely by preventing their binding to BMP receptors (32–34). By contrast, BMP2 binding to CCN4 was reported to enhance BMP2 signaling (35). In this study, we examined whether CCN1 and CCN5 can interact with BMP2 and whether the hydrolysis of these proteins by KLK12 can alter their interactions. Using a solid

KLK12 Hydrolysis of CCN Proteins

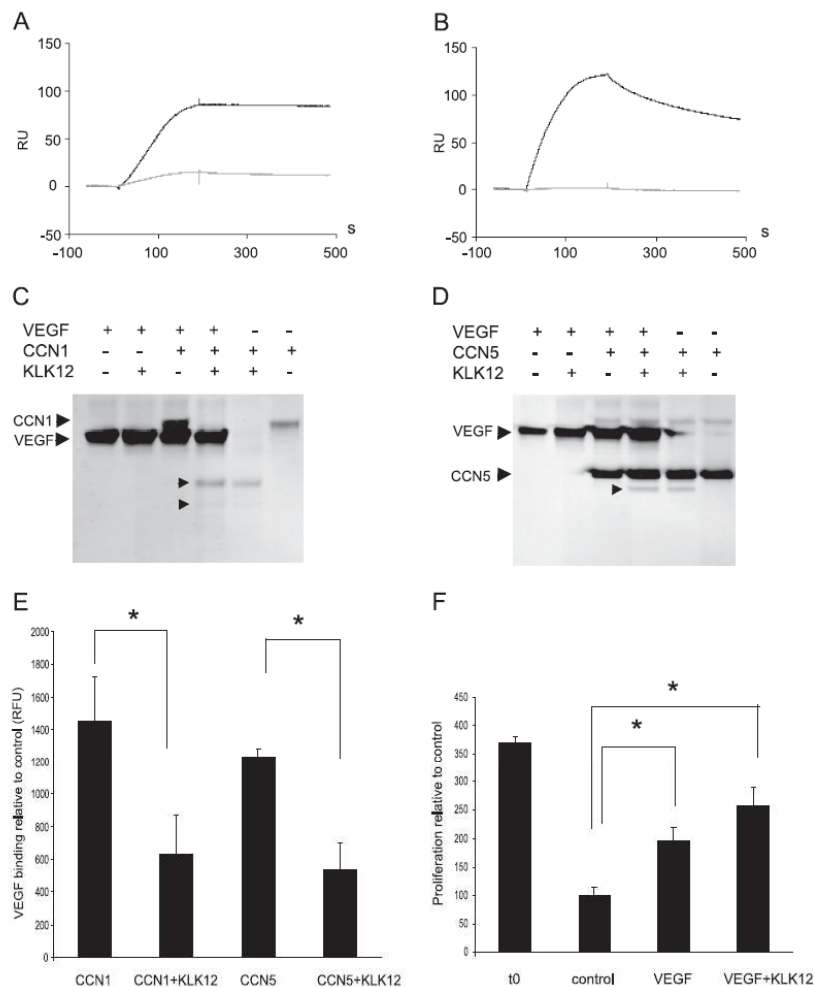


FIGURE 4. KLK12 prevents VEGF₁₆₅ binding to CCN5 and mobilizes intact VEGF from VEGF-CCN complexes. A and B, sensorgrams of surface plasmon resonance analysis showing the binding of 12.5 nM intact (black curve) or fragmented (gray curve) CCN1 (A) or CCN5 (B) with immobilized VEGF. RU, resonance units. C and D, CCN1 or CCN5 complexes with VEGF were formed by incubation for 12 h at 4 °C and then incubated with KLK12 for 3 h at 37 °C. VEGF, CCN1, and CCN5 were also incubated with KLK12 for 3 h at 37 °C. The resulting proteolytic fragments were analyzed by 4–12% SDS-PAGE and silver-stained. The arrows indicate full-length and cleaved protein fragments. E, CCN1 or CCN5 was complexed with VEGF on a microtiter plate for 12 h at 4 °C and prior to a 3-h incubation at 37 °C with activated KLK12 (KLK12:CCN ratio of 1:100, w/w). VEGF ELISA was used to quantify the residual VEGF bound to CCN1 or CCN5 after KLK12 cleavage. RFU, relative fluorescence units. F, HUVECs were adhered on tissue culture dishes in complete medium (supplemented with serum) and then cultured with VEGF or KLK12-processed VEGF (20 ng/ml) in basal medium (in the absence of serum). Cell viability was measured at the time of medium change (t0) and after 24 h of treatment using a MTS assay. *, Kruskal and Wallis test values (p < 0.05, four independent experiments).

phase assay, we observed binding of BMP2 to CCN1 but not to CCN5 (Fig. 6A). Treatment of either soluble or immobilized CCN1-BMP complexes resulted in the release of intact BMP2 (Fig. 6, A and B).

TGF-β and FGF-2 Are Relatively Sensitive to KLK12 Hydrolysis—CCN2 has been reported to bind TGF-β1 through the VWC domain and subsequently enhances the binding of TGF-β1 to all three TGF-β receptors (32). In the current study, we observed a binding of TGF-β1 to intact CCN1 and CCN5 that were immobilized to solid matrices (Fig. 6C). In the case of both CCNs, treatment of the CCN-TGF-β complexes with KLK12 resulted in a reduction of the amount of immobilized TGF-β1 (Fig. 6C). As shown in Fig. 6D, soluble TGF-β was

susceptible to proteolysis by KLK12 at a low enzyme:substrate ratio (1:25 w/w) but appeared resistant to hydrolysis at a higher ratio (1:100 w/w). This was also the case when TGF-β was engaged in complexes with CCN proteins (Fig. 6, E and F). Interestingly, at high enzyme concentration, bound TGF-β was more sensitive to KLK12 hydrolysis than free TGF-β1 (Fig. 6F). Interaction of TGF-β1 with either CCN1 or CCN5 did not protect these proteins from KLK12 hydrolysis because identical patterns of cleavage were observed for CCN1 and CCN5 regardless of their binding to TGF-β1 (Fig. 6, E and F).

It has been previously shown that CCN1 enhances FGF-2-induced DNA synthesis in HUVECs likely because of FGF-2 displacement from extracellular matrix (36). To determine

KLK12 Hydrolysis of CCN Proteins

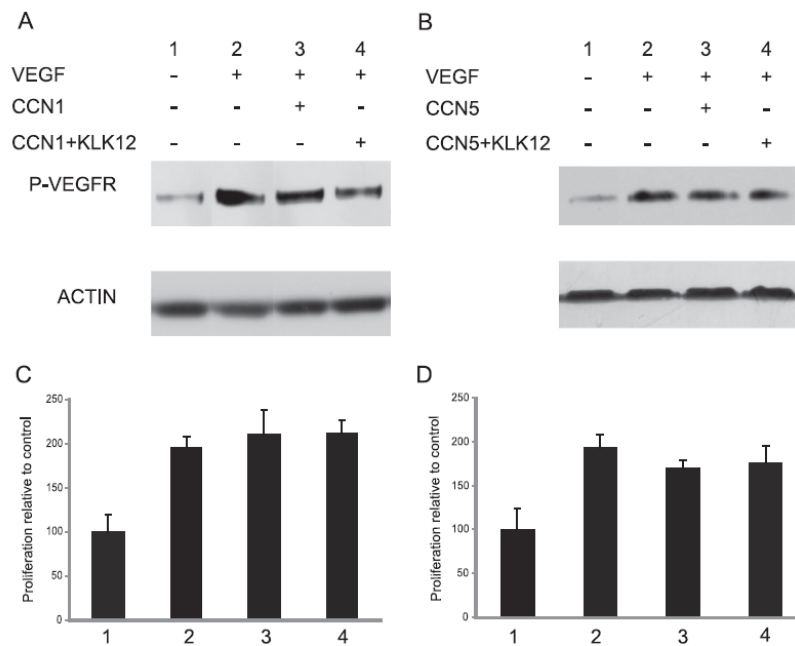


FIGURE 5. Effects of intact or fragmented soluble CCNs on the VEGF-induced responses of endothelial cells. A and B, phosphorylation of VEGFR2 in response to VEGF. A representative Western blot is shown for untreated HUVEC, HUVEC treated with VEGF₁₆₅ alone, or HUVEC treated with VEGF₁₆₅ preincubated with intact or KLK12-fragmented CCN1 (A) and CCN5 (B) (VEGF:CCN molar ratio 1:3). Stripped membranes were reprobed with monoclonal β -actin antibody to confirm protein loading levels and integrity. C and D, proliferation of HUVECs in response to VEGF. HUVECs were cultured for 72 h in endothelial cell growth medium without additive (lanes 1), with VEGF₁₆₅ alone (20 ng/ml; lanes 2), with VEGF₁₆₅ preincubated with intact (lanes 3), or with KLK12-fragmented (lanes 4) CCN1 (C) or CCN5 (D) (VEGF:CCN molar ratio of 1:3). The data were obtained from three independent experiments.

whether CCN1 and CCN5 can directly interact with FGF-2, CCN proteins were immobilized to solid matrices and incubated with soluble FGF-2. Formation of FGF-CCN complexes was observed in the presence of immobilized CCN1 and CCN5 (Fig. 7A). FGF-2 was shown to be sensitive to trypsin (37); therefore, we analyzed the effects of KLK12 on the integrity of FGF. As shown in Fig. 7B, soluble FGF-2 was processed by KLK12 at a low enzyme:substrate ratio (1:25 w/w) but appeared relatively resistant to hydrolysis at a higher ratio (1:100, w/w) (Fig. 7B). FGF-2 is often associated with heparan-sulfate proteoglycans in the extracellular matrix and binding to heparin protects FGF-2 from tryptic cleavage (37). We therefore examined the impact of heparin on the FGF-2 hydrolysis by KLK12. We observed that heparin can protect FGF-2 from KLK12 cleavage (Fig. 7C). This protective effect was fully abolished when the interaction of FGF-2 with heparin was prevented by heat denaturation of the FGF molecule (Fig. 7D). These observations indicate that the protective effect of heparin depends on its interaction with FGF-2 and not with the protease. Next, we investigated whether FGF-2 binding to CCN1 or CCN5 protects the growth factor from degradation by KLK12. FGF-2 was cleaved by KLK12 using an enzyme:substrate ratio of 1:25 (w/w) either when it was incubated alone with KLK12 or when it was coupled with CCN1 (not shown) or CCN5 (Fig. 7E). KLK12 treatment of FGF-CCN complexes using an enzyme:substrate ratio of 1:100 (w/w), which leaves FGF-2 intact, reduced the amount of FGF-2 bound to CCN5, whereas FGF-2 binding to CCN1 remained unchanged (Fig. 7A). However, as observed in Fig. 7F, FGF-2-

complexed CCN1 was fragmented by KLK12. At the same time, we detected a binding of FGF-2 to CCN1 previously fragmented by KLK12 (Fig. 7A). Taken together, these findings indicate that CCN1 fragments conserve the binding capacity to FGF-2 regardless of proteolysis by KLK12. Further experiments are required to identify the FGF-2 binding site(s) of the CCN proteins.

Gene Expression of KLK12, CCN1, and CCN5 in Paired Normal and Cancerous Tissue Samples from Patients with Lung Cancer—In a preliminary effort to assess the relevance of the newly identified enzyme-substrate pair (KLK12-CCNs), we determined the expression patterns of the genes encoding KLK12, CCN1, and CCN5 in the lung, a tissue known to express KLK12 (1). We applied the comparative CT quantification ($\Delta\Delta C_T$ method) of quantitative RT-PCR for comparing changes in expression of the three genes between nontumor and tumor lung specimens. Relative quantification was performed using *18 S rRNA* as an endogenous control gene. Our analysis revealed significant down-regulation of both *CCN1* and *CCN5* in tumor compared with nontumor tissue samples (Fig. 8A). Conversely, *KLK12* expression was increased in lung tumor.

Biological Role of KLK12-derived CCN Fragments in Cell Culture Models—CCN proteins regulate diverse cellular behavior through integrins, heparan sulfate proteoglycans, and lipoprotein receptor-related proteins (Fig. 2) pathways (27, 38). In the present study, we examined the effects of CCN1 and CCN5 fragmentation by KLK12 on cells of the tumor microenviron-

KLK12 Hydrolysis of CCN Proteins

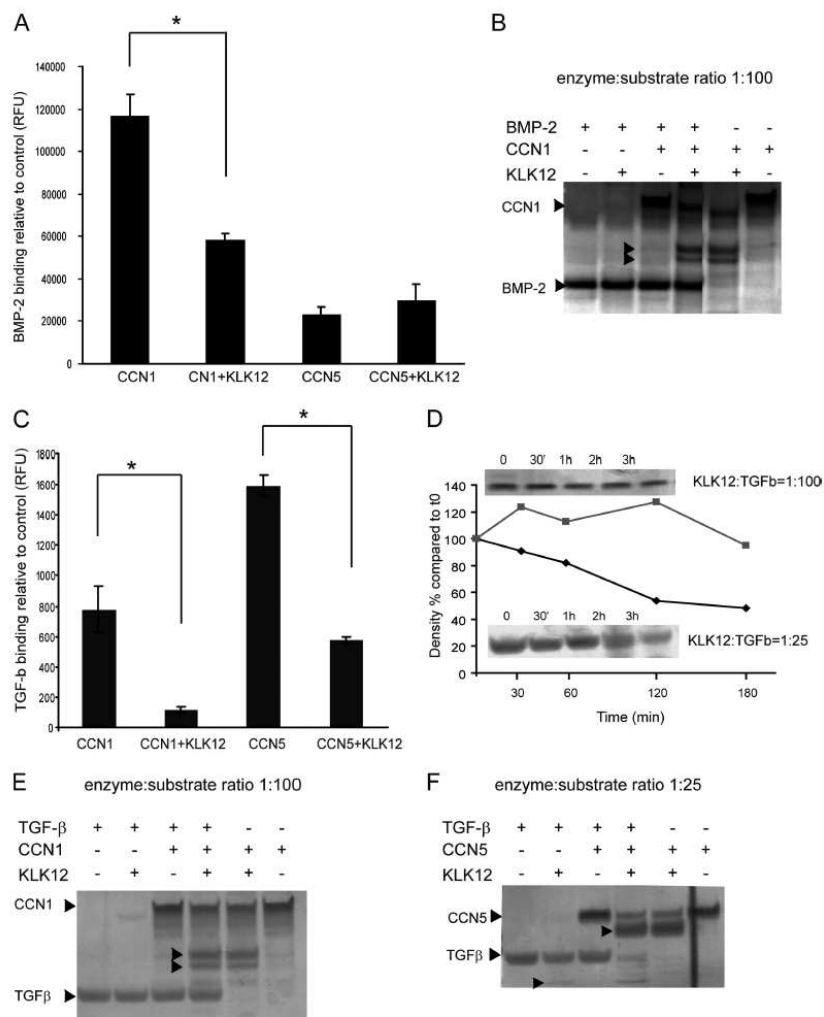


FIGURE 6. Cleavage of BMP2 or TGF-β1-CCN complexes by KLK12. *A*, CCN1 or CCN5 was complexed with BMP2 on a microtiter plate for 12 h at 4 °C and prior to a 3-h incubation at 37 °C with activated KLK12 (KLK2:CCN ratio of 1:100, w/w). BMP2 ELISA was used to quantify the residual BMP2 bound to CCN1 or CCN5 after KLK12 cleavage. *RFU*, relative fluorescence units. *B*, CCN1 was complexed with BMP2 for 12 h at 4 °C and then incubated with KLK12 for 3 h at 37 °C. BMP2 and CCN1 were also incubated with KLK12 for 3 h at 37 °C. The resulting cleavage fragments were analyzed by 4–12% SDS-PAGE and silver-stained. The *arrows* indicate proteolytically generated CCN1 fragments. *C*, CCN1 or CCN5 was complexed with TGF-β1 on a microtiter plate for 12 h at 4 °C and prior to a 3-h incubation at 37 °C with activated KLK12 (KLK2:CCN ratio of 1:100, w/w). TGF-β1 ELISA was used to quantify the residual TGF-β1 bound to CCN1 or CCN5 after KLK12 cleavage. *D*, TGF-β1 was incubated with KLK12 (enzyme:substrate ratios of 1:25 and 1:100, w/w) for 0, 30, 60, 120, and 180 min at 37 °C. The residual TGF-β1 was analyzed by 4–12% SDS-PAGE and quantified by densitometry after silver staining. *E* and *F*, CCN1 or CCN5 complexes with TGF-β1 were formed by incubation for 12 h at 4 °C and then incubated with KLK12 for 3 h at 37 °C. TGF-β1, CCN1, and CCN5 were also incubated with KLK12 for 3 h at 37 °C (enzyme:substrate ratio of 1:100 w/w for *E* and 1:25 w/w for *F*). The resulting proteolytic fragments were analyzed by 4–12% SDS-PAGE and silver-stained. The *arrows* indicate molecular species corresponding to fragmented proteins.

ment, including neoplastic and endothelial cells (Fig. 8). First, we investigated the impact of CCN hydrolysis on migration of lung cancer cells using a wound healing assay. Intact CCN1 significantly decreased A549 cell migration, whereas KLK12-fragmented CCN1 was inefficient to do so (Fig. 8*B*). Intact or KLK12-fragmented CCN5 did not affect migration of A549 cells in our experimental conditions (Fig. 8*C*).

Subsequently, we analyzed the effects of CCN fragmentation on endothelial cell survival. Unstimulated, early passage HUVECs were adhered on tissue culture dishes before the addition of solu-

ble intact or KLK12-cleaved CCNs. Cell viability was measured after 24 h of serum withdrawal. As shown in Fig. 8 (*E* and *F*), cells were partially protected from death upon serum withdrawal in the presence of VEGF but not in the presence of intact CCN1 or CCN5. This observation is consistent with previous data showing that integrin $\alpha v \beta 3$ is required for CCN1-mediated endothelial cell survival and that this integrin is poorly expressed in unstimulated HUVECs (39). By contrast KLK12-fragmented CCN1 and CCN5 significantly reduced HUVEC survival (Fig. 8, *E* and *F*). All of these data suggest that KLK12 fragmentation of CCNs may modify the

KLK12 Hydrolysis of CCN Proteins

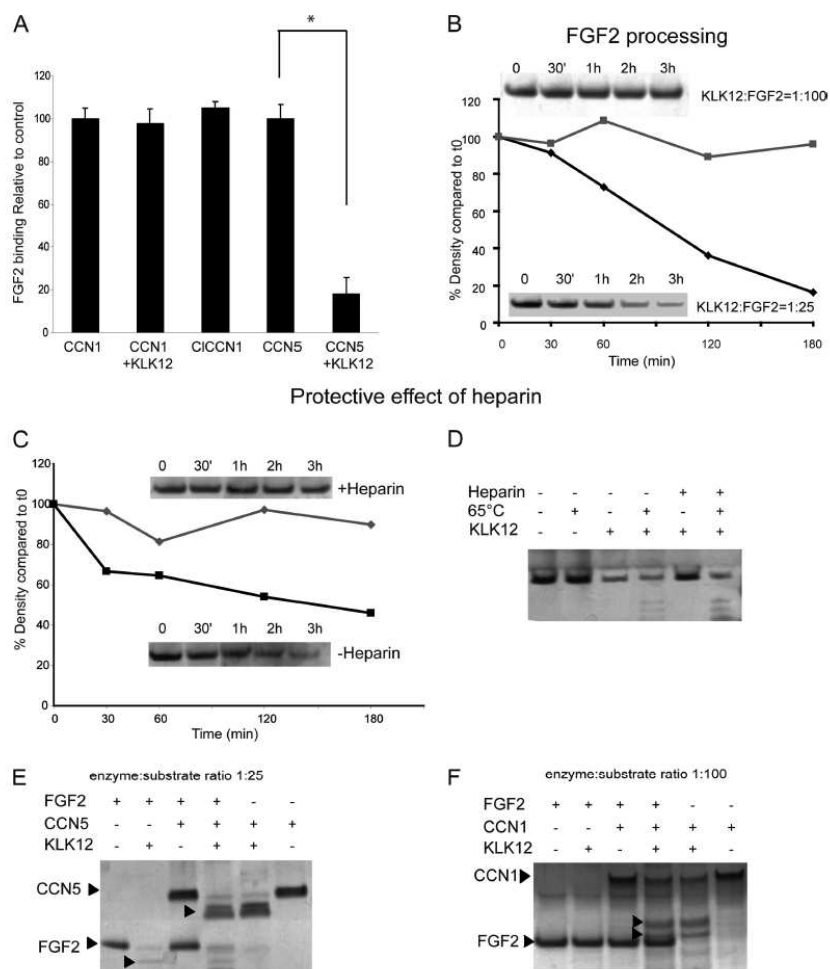


FIGURE 7. KLK12 effects on free FGF-2 or on FGF-2 complexed with CCN1 and CCN5. *A*, intact CCN1 or CCN5 was complexed with FGF-2 on a microtiter plate for 12 h at 4 °C and prior to a 3-h incubation at 37 °C with activated KLK12 (KLK2:CCN ratio of 1:100, w/w). CCN1 cleaved in solution (*CICC1*) was also coated on the plate and complexed with FGF-2 in the same conditions. FGF-2 ELISA was used to quantify the residual FGF-2 bound to CCN1 or CCN5 after KLK12 cleavage. *RFU*, relative fluorescence units. *B*, FGF-2 was incubated with KLK12 (enzyme:substrate ratios of 1:25 and 1:100, w/w) for 0, 30, 60, 120, and 180 min at 37 °C. The residual FGF-2 was analyzed by 4–12% SDS-PAGE and quantified by densitometry after silver staining. *C*, FGF-2 was incubated with KLK12 at an enzyme:substrate ratio of 1:25, w/w for 0, 30, 60, 120, and 180 min at 37 °C in the presence or absence of heparin. The residual FGF-2 was analyzed by 4–12% SDS-PAGE and quantified by densitometry after silver staining. *D*, free FGF-2 was treated or not at 65 °C for 5 min prior to a 3-h incubation with activated KLK12 in the presence of heparin. *E* and *F*, CCN1 or CCN5 complexes with FGF-2 were formed by incubation for 12 h at 4 °C and then incubated with KLK12 for 3 h at 37 °C. FGF-2, CCN1, and CCN5 were also incubated with KLK12 for 3 h at 37 °C. The resulting proteolytic fragments were analyzed by 4–12% SDS-PAGE and silver-stained. The *arrows* indicate molecular mass species corresponding to fragmented proteins.

cellular functions of these matricellular proteins in a cell type- and context-specific fashion.

DISCUSSION

This study suggests that the matricellular proteins belonging to the CCN family are novel substrates of kallikrein-related peptidases. Fragmentation of CCN1 by KLK12 was demonstrated both *in vitro* and in functional assays using cultured cells. Interestingly, the fragmentation pattern was unique for each CCN member and varied according to the KLK used. This could be explained by the extended but unique substrate specificity of the KLKs (23, 40) associated with the sequence and structural variability of the CCN proteins (27, 29). For example, the hinge region of CCN5 was not

targeted by KLK12 because of the absence of the arginine and lysine residues that are required at the P1 position for hydrolysis by KLK12 (22). The R-V scissile bond cleaved by KLK12 in CCN5 is conserved in the TSP domain of all CCN proteins; however, the corresponding Arg²⁵⁰-Val²⁵¹ bond in CCN1 did not consist a target of KLK12. This indicates that the efficiency of cleavage primarily depends on the accessibility of the scissile bond and the residues that surround the cleavage site regardless of the presence of conserved basic residues at the P1 position. Our findings also demonstrate that proteolysis of CCNs can potentially affect both flexible linkers connecting structural domains and exposed functional sites in these domains.

KLK12 Hydrolysis of CCN Proteins

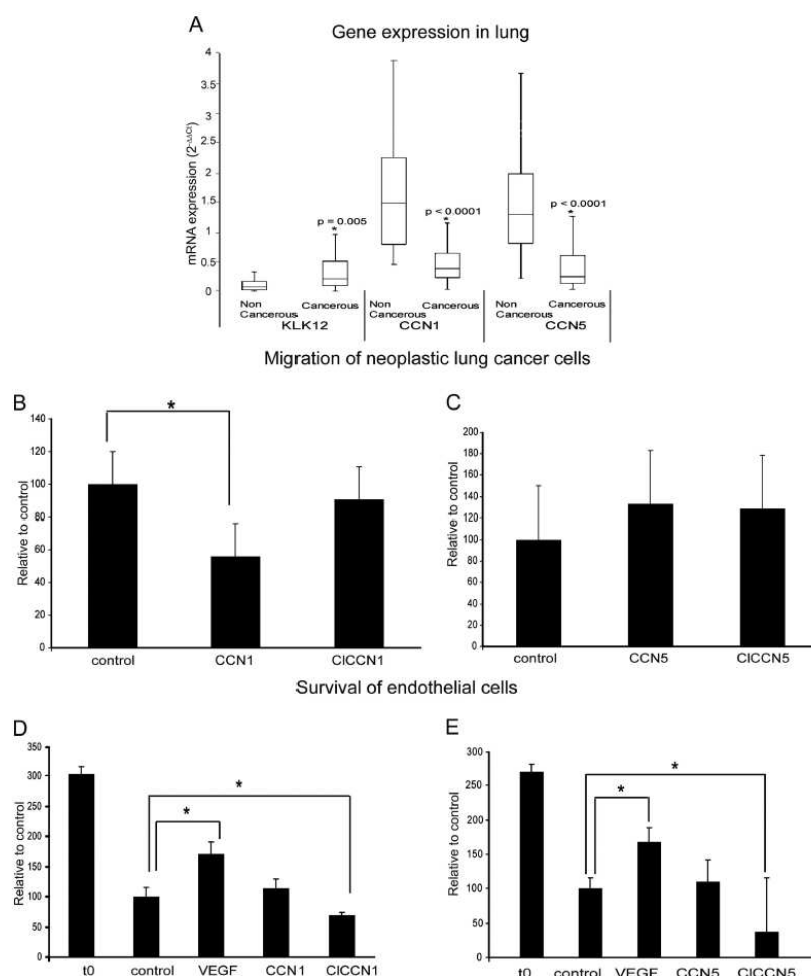


FIGURE 8. Gene expression in patients with lung cancer and biological role of KLK12-derived CCN fragments in cell culture models. *A*, box and whisker plots of quantitative real time RT-PCR assays of KLK2, CCN1, and CCN5 transcripts in 43 noncancerous and matched cancerous samples from patients with primary NSCLC. The relative quantitative value was expressed as $2^{-\Delta\Delta CT}$, representing the amount of target gene expression (normalized to *18S rRNA*) relatively to the calibrator. The box refers to the range defined by the first and third quartile. The thick line refers to the range defined by the 10th and 90th percentile. The difference between the amounts of transcripts in noncancerous and cancerous tissues was determined using a Wilcoxon matched pairs test. *B*, wound healing analysis of A549 cells migration in the presence of 1 μ g/ml intact CCN1 or CCN5 alone or previously treated with KLK12. The bars represent the means \pm S.D. of three independent experiments. *, relative to control, $p < 0.05$, Kruskal and Wallis test. *D* and *E*, MTS analysis of HUVEC survival after serum withdrawal. HUVECs were adhered on tissue culture dishes in complete medium (supplemented with serum) and then cultured in basal medium (in the absence of serum) containing 20 ng/ml intact VEGF or 2 μ g/ml intact or KLK12-cleaved CCN1 (*D*) or CCN5 (*E*). Cell viability was measured at the time of medium change (*t*₀) and after 24 h of treatment using a MTS assay. control, basal medium without additive; CICCN, KLK12-cleaved CCN. The bars represent the mean \pm S.D. of five independent experiments. *, $p < 0.05$, Kruskal and Wallis test.

Although not studied thus far in detail, several lines of evidence indicate that proteolysis of CCNs is a common physiological phenomenon. Various forms of CCN2 were detected in pig uterine flushings resulting from *in utero* proteolytic digestion of the full-length protein (41–43). In rats, an N-terminally truncated CCN3 form predominates in brain tissue and in cerebrospinal fluid (44). Proteolytic processing of CCN2 and CCN3 is also evidenced by observations showing that fragmented forms were present in the culture medium of cells overexpressing the recombinant full-length protein (43, 45). In humans, CCN2 fragments were detected in several fluids such as normal sera, pregnancy sera, cerebrospinal, amniotic, follic-

ular, and peritoneal fluids (46), and CCN3 fragments were observed in cerebrospinal fluid, amniotic fluid, and prepubertal and pubertal urine samples (47). Finally, N-terminal CCN2 fragments have been found in the plasma of patients with diabetic nephropathy (48) and multiple myeloma (49) and in the interstitial fluid and plasma of patients with scleroderma (50). Because CCNs are sensitive to various secreted proteases (trypsin; chymotrypsin; elastase; plasmin; plasma kallikrein; kallikrein-related peptidases 1, 5, 12, and 14; and matrix metalloproteinases-1, -2, -3, -7, -9, and -13) (Refs. 31, 51, and 52 and this paper), the proteolysis of CCNs can potentially occur within a wide variety of tissues and in diverse physiological and

KLK12 Hydrolysis of CCN Proteins

pathological settings. In particular, KLKs 1, 5, 12, and 14 have been found in various fetal and adult normal tissues (1), and dysregulation of their expression has been reported in several malignant diseases (ovarian, prostate, breast, and lung cancer) (11). The presence of CCNs in tissues characterized by high expression of KLKs coupled with the high proteolytic efficiency of some of these proteases for these substrates point to a potential role for KLK enzymes in CCN fragmentation *in vivo*.

Both CCNs and KLK12 have been involved in angiogenesis. Blockage of KLK12 activity with specific anti-KLK12 antibodies was reported to reduce proliferation, migration, and formation of branching cords of microvascular endothelial cell *in vitro*. Furthermore, its expression is down-regulated in endothelial cells from patients with systemic sclerosis displaying defective angiogenesis compared with endothelial cells from normal subjects (9). Because KLK12 seems to play a critical role in controlling normal angiogenesis, we sought to investigate the relations between KLK12, CCNs, and factors regulating angiogenesis. Using different approaches, we identified or confirmed direct interactions between VEGF₁₆₅, BMP2, TGF- β 1, FGF-2, and CCN1. With the exception of BMP2, all of these factors can also form complexes with CCN5 in solution or when immobilized on solid matrices. We report for the first time that KLK12-mediated proteolysis of CCN1 and CCN5 can reduce or abolish the binding of VEGF, BMP2, and TGF- β 1. Because cleavage sites were not related to the domains proposed to be responsible for binding of these growth factors, we suggest that the observed changes in function may reflect conformational changes of CCN1 or CCN5 because of proteolysis. This study also provides evidence that binding of VEGF₁₆₅, BMP2, TGF- β 1, and FGF-2 to CCN1 or CCN5 does not mask the proteolytic sites targeted by KLK12, thus allowing the KLK12-mediated CCN fragmentation. VEGF₁₆₅ and BMP2 alone were resistant to the proteolytic action of KLK12, whereas this protease was able to cleave TGF- β 1 and FGF-2 in a concentration-dependent manner. We also observed a change in the hydrolytic sensitivity when TGF- β 1 was complexed with CCN proteins. This suggests that binding of TGF- β 1 would modify its conformation appropriately, further exposing potential sites that are sensitive to hydrolysis by KLK12. Such a change in the conformation of TGF- β 1 following binding to CCN2 was previously reported by Abreu *et al.* (32).

Complex formation of VEGF₁₆₅ with CCN2 was shown to inhibit VEGF₁₆₅-induced tube formation of endothelial cells *in vitro* and angiogenesis *in vivo* (53). Unexpectedly, our study indicated that free VEGF₁₆₅ and VEGF complexed with CCN1 or CCN5 equally trigger VEGFR2 phosphorylation and HUVEC proliferation. At first sight, our data seem to contradict the observations of Inoki *et al.* (53). An explanation for that may lie in the ability of the CCN proteins to bind to extracellular matrix (ECM) components like fibronectin, collagen, vitronectin, and aggrecan (54–57). When functional studies are performed in the presence of ECM, as in the tube formation assay or *in vivo*, a large fraction of CCNs is likely immobilized in ECM sequestering the VEGF₁₆₅ away from its receptors. Conversely, complexes would remain predominantly in a form accessible to receptors when cells are grown directly on plastic as herein. Our results indicate that addition of VEGF₁₆₅-CCN complexes

in the culture medium do not prevent VEGFR2 stimulation by VEGF₁₆₅. One explanation would be that VEGFR2 competes with the soluble CCNs for VEGF binding and becomes activated by VEGF dissociated from the VEGF-CCN complexes. This hypothesis is consistent with data showing that VEGFR2 binds VEGF₁₆₅ with an affinity approximately 3 orders of magnitude greater than those of CCNs (picomolar range *versus* nanomolar range) (53, 58). Therefore, the mode of action of CCNs is expected to be different from that of related proteins: the IGFs. Indeed, IGFs bind IGF-I and IGF-II with affinities that are equal to or greater than those of the IGF receptor and sequester the factor away from the receptor, resulting in a blockage of the IGF signaling. Signaling is restored following proteolytic processing of IGFs, which decreases IGFs binding affinities by 2 orders of magnitude. An alternative explanation of our findings would be that intact CCN1 and CCN5 act as cofactors to potentiate VEGF₁₆₅ effects on VEGFR2 signaling. As a proof of principle, CCNs have already been described to potentiate the activities of TGF- β 1, FGF-2, and BMP2 (32, 35–36).

In our conditions, KLK12-induced fragmentation of CCN1 and CCN5 did not modify the response of HUVEC to VEGF₁₆₅. Functional consequences of proteolysis of VEGF-CCNs complexes appear different when endothelial cells are surrounded with ECM. Hashimoto *et al.* (31) demonstrated that angiogenic activity of VEGF₁₆₅ blocked in the VEGF₁₆₅-CCN2 complex is reactivated to original levels after CCN2 digestion of the complex by MMPs both *in vitro* using a tube formation assay and *in vivo* using a Matrigel injection model in mice. Taken together with our findings, these observations suggest that the CCN proteins may regulate VEGF signaling mostly by sequestering VEGF₁₆₅ in ECM and that proteolysis of the CCNs engaged in immobilized VEGF-CCN complexes may release VEGF in the soluble compartment, allowing interaction with its receptor. We also revealed that BMP2 and TGF- β 1 immobilized in complexes with CCNs are released in the soluble phase after KLK12-induced proteolysis of the CCNs. Thus, KLK12 could regulate the CCN-dependent distribution of these growth factors between the soluble and insoluble compartments of the cellular microenvironment. The case of FGF-2 is more complex, because the CCN1 fragments appear to conserve the binding capacity to FGF-2 regardless of proteolysis. Only a few studies have addressed the impact of CCNs on the biological functions of BMPs, TGF- β 1, and FGF-2. Binding of these growth factors to CCN2, CCN3, or CCN4 were reported to either inhibit or enhance their activities depending on the partners under consideration and the models studied (32, 35, 53, 59, 60). Further studies are required to determine the functional impact of complexes interaction with the substratum and the subsequent biological consequences of this regulation in the proteolysis of CCNs.

KLK12 is expressed in numerous organs including (but not limited to) colon, esophagus, lung, prostate, and stomach, where aberrant expression of CCNs is observed in cancerous tissues. Thus, it is tempting to speculate that KLK12 modulates the promoting or inhibiting effects of CCNs on the tumorigenesis of these organs. In particular in nonsmall cell lung carcinoma (NSCLC), this idea is supported by our findings showing

KLK12 Hydrolysis of CCN Proteins

that: (a) KLK12 is coexpressed with several CCNs in the cancerous tissue of patients and (b) full-length CCN1 and KLK12-released CCN1 fragments have different effects on the migration of the A549 lung cancer cell line *in vitro*. Previous data have indicated that CCN1 may act as a tumor suppressor in NSCLC *in vitro* and *in vivo* (61, 62). Collectively, these findings suggest that two mechanisms affecting CCN1 could act simultaneously to facilitate NSCLC development. The first one corresponds to the decreased expression of CCN1 in the tumor site, and the second one refers to the suppression of the tumor inhibitory effects of the residual CCN1 activity through KLK-mediated proteolysis. In addition to *CCN1*, *CCN2* (62) and *CCN5* (present study) are down-regulated, whereas *CCN4* (62) is up-regulated in NSCLC. These findings indicate that members of the CCN family may play important but contrasting roles in NSCLC progression. Because KLK12 was found to fragment all CCNs *in vitro*, an extensive investigation is needed to determine the final outcome of KLK12-mediated hydrolysis of several members of the CCN family on the NSCLC progression *in vivo*.

We present evidence that a great variety of CCN fragments can be generated by the proteolytic action of KLKs; some of these fragments exhibit intact domains, whereas others display truncated domains. Functional studies of naturally occurring CCN fragments and recombinant truncated forms revealed that they can act as agonists or antagonists of the full-length CCN proteins depending on the involvement of each domain in mediating a specific function (45, 54–56, 63–65). Taken together with these findings, our data support the hypothesis that limited proteolysis has a major role in modulation of the biological functions of these multi-modular proteins. Because activity of proteases is tightly regulated, as is the expression of CCNs and their binding partners, a detailed understanding of the functions of CCNs requires taking into account the tightly controlled spatiotemporal regulation of proteolysis and the impact of the distinct CCN fragments. In summary, our findings suggest that the KLK12-mediated hydrolysis of CCNs may be involved in the modulation of the bioavailability and/or activity of several growth factors including VEGF₁₆₅, BMP2, TGF- β 1, and FGF-2. Because KLKs 1, 5, 12, and 14; CCNs; and the aforementioned growth factors coexist in several situations, fragmentation of CCNs by KLKs can be expected to play a role in diverse physiological and pathological processes including angiogenesis, bone and bone marrow homeostasis, and tumorigenesis.

Acknowledgments—We thank Dr. Marie-Christine Maurel and Dr. Laure Rittié for helpful suggestions.

REFERENCES

1. Shaw, J. L., and Diamandis, E. P. (2007) *Clin. Chem.* 53, 1423–1432
2. Lundwall, A., and Brattsand, M. (2008) *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 2019–2038
3. Eissa, A., and Diamandis, E. P. (2008) *Biol. Chem.* 389, 669–680
4. Sotiropoulou, G., Pampalakis, G., and Diamandis, E. P. (2009) *J. Biol. Chem.* 284, 32989–32994
5. Veveris-Lowe, T. L., Kruger, S. J., Walsh, T., Gardiner, R. A., and Clements, J. A. (2007) *Semin. Thromb. Hemost.* 33, 87–99
6. Lu, Y., Papagerakis, P., Yamakoshi, Y., Hu, J. C., Bartlett, J. D., and Simmer,

- J. P. (2008) *Biol. Chem.* 389, 695–700
7. Scarisbrick, I. A., Linbo, R., Vandell, A. G., Keegan, M., Blaber, S. I., Blaber, M., Sneve, D., Lucchinetti, C. F., Rodriguez, M., and Diamandis, E. P. (2008) *Biol. Chem.* 389, 739–745
8. Shaw, J. L., and Diamandis, E. P. (2008) *Biol. Chem.* 389, 681–688
9. Giusti, B., Serrati, S., Margheri, F., Papucci, L., Rossi, L., Poggi, F., Magi, A., Del Rosso, A., Cinelli, M., Guiducci, S., Kahaleh, B., Matucci-Cerinic, M., Abbate, R., Fibbi, G., and Del Rosso, M. (2005) *Arthritis Rheum.* 52, 3618–3628
10. Borgoño, C. A., and Diamandis, E. P. (2004) *Nat. Rev. Cancer* 4, 876–890
11. Emami, N., and Diamandis, E. P. (2008) *Clin. Chem.* 54, 1600–1607
12. Oikonomopoulou, K., Diamandis, E. P., and Hollenberg, M. D. (2010) *Biol. Chem.* 391, 299–310
13. Emami, N., and Diamandis, E. P. (2007) *Mol. Oncol.* 1, 269–287
14. Sano, A., Sangai, T., Maeda, H., Nakamura, M., Hasebe, T., and Ochiai, A. (2007) *Int. J. Oncol.* 30, 1493–1498
15. Komatsu, N., Saijoh, K., Otsuki, N., Kishi, T., Micheal, I. P., Obiezu, C. V., Borgono, C. A., Takehara, K., Jayakumar, A., Wu, H. K., Clayman, G. L., and Diamandis, E. P. (2007) *Clin. Chim. Acta* 377, 228–236
16. Killian, C. S., Corral, D. A., Kawinski, E., and Constantine, R. I. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192, 940–947
17. Caubet, C., Jonca, N., Brattsand, M., Guerrin, M., Bernard, D., Schmidt, R., Egelrud, T., Simon, M., and Serre, G. (2004) *J. Invest. Dermatol.* 122, 1235–1244
18. Johnson, S. K., Ramani, V. C., Hennings, L., and Haun, R. S. (2007) *Cancer* 109, 1811–1820
19. Oikonomopoulou, K., Hansen, K. K., Saifeddine, M., Vergnolle, N., Tea, I., Blaber, M., Blaber, S. I., Scarisbrick, I., Diamandis, E. P., and Hollenberg, M. D. (2006) *Biol. Chem.* 387, 817–824
20. Yousef, G. M., Magklara, A., and Diamandis, E. P. (2000) *Genomics* 69, 331–341
21. Kurlender, L., Borgono, C., Michael, I. P., Obiezu, C., Elliott, M. B., Yousef, G. M., and Diamandis, E. P. (2005) *Biochim. Biophys. Acta* 1755, 1–14
22. Memari, N., Jiang, W., Diamandis, E. P., and Luo, L. Y. (2007) *Biol. Chem.* 388, 427–435
23. Borgoño, C. A., Gavigan, J. A., Alves, J., Bowles, B., Harris, J. L., Sotiropoulou, G., and Diamandis, E. P. (2007) *Biol. Chem.* 388, 1215–1225
24. Oikonomopoulou, K., Hansen, K. K., Baruch, A., Hollenberg, M. D., and Diamandis, E. P. (2008) *Biol. Chem.* 389, 747–756
25. Planque, C., de Monte, M., Guyetant, S., Rollin, J., Desmazes, C., Panel, V., Lemarié, E., and Courty, Y. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329, 1260–1266
26. Singh, P. (2007) *Cancer Lett.* 252, 19–35
27. Holbourn, K. P., Perbal, B., and Ravi Acharya, K. (2009) *J. Cell Commun. Signal.* 3, 25–41
28. Perbal, B. (2009) *J. Cell Commun. Signal.* 3, 153–157
29. Holbourn, K. P., Acharya, K. R., and Perbal, B. (2008) *Trends Biochem. Sci.* 33, 461–473
30. Keyt, B. A., Berleau, L. T., Nguyen, H. V., Chen, H., Heinsohn, H., Vandlen, R., and Ferrara, N. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 7788–7795
31. Hashimoto, G., Inoki, I., Fujii, Y., Aoki, T., Ikeda, E., and Okada, Y. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 36288–36295
32. Abreu, J. G., Ketpura, N. I., Reversade, B., and De Robertis, E. M. (2002) *Nat. Cell Biol.* 4, 599–604
33. Minamizato, T., Sakamoto, K., Liu, T., Kokubo, H., Katsube, K., Perbal, B., Nakamura, S., and Yamaguchi, A. (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354, 567–573
34. Nakamura, Y., Cui, Y., Fernando, C., Kutz, W. E., and Warman, M. L. (2009) *J. Cell. Commun. Signal.* 3, 105–113
35. Ono, M., Inkson, C. A., Kilts, T. M., and Young, M. F. (2011) *J. Bone Miner. Res.* 26, 193–208
36. Kolesnikova, T. V., and Lau, L. F. (1998) *Oncogene* 16, 747–754
37. Coltrini, D., Rusnati, M., Zoppetti, G., Oreste, P., Isacchi, A., Caccia, P., Bergonzoni, L., and Presta, M. (1993) *Eur. J. Biochem.* 214, 51–58
38. Chen, C. C., and Lau, L. F. (2009) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 771–783
39. Leu, S. J., Lam, S. C., and Lau, L. F. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 46248–46255
40. Debelo, M., Beaufort, N., Magdolen, V., Schechter, N. M., Craik, C. S., Schmitt, M., Bode, W., and Goettig, P. (2008) *Biol. Chem.* 389, 623–632

KLK12 Hydrolysis of CCN Proteins

41. Brigstock, D. R., Steffen, C. L., Kim, G. Y., Vegunta, R. K., Diehl, J. R., and Harding, P. A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 20275–20282
42. Ball, D. K., Surveyor, G. A., Diehl, J. R., Steffen, C. L., Uzumcu, M., Miranda, M. A., and Brigstock, D. R. (1998) *Biol. Reprod.* **59**, 828–835
43. Ball, D. K., Moussad, E. E., Rageh, M. A., Kemper, S. A., and Brigstock, D. R. (2003) *Reproduction* **125**, 271–284
44. Su, B. Y., Cai, W. Q., Zhang, C. G., Martinez, V., Lombet, A., and Perbal, B. (2001) *Mol. Pathol.* **54**, 184–191
45. Perbal, B., Martinierie, C., Sainson, R., Werner, M., He, B., and Roizman, B. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 869–874
46. Yang, D. H., Kim, H. S., Wilson, E. M., Rosenfeld, R. G., and Oh, Y. (1998) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**, 2593–2596
47. Burren, C. P., Wilson, E. M., Hwa, V., Oh, Y., and Rosenfeld, R. G. (1999) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84**, 1096–1103
48. Roestenberg, P., van Nieuwenhoven, F. A., Wieten, L., Boer, P., Diekman, T., Tiller, A. M., Wiersinga, W. M., Oliver, N., Usinger, W., Weitz, S., Schlingemann, R. O., and Goldschmeding, R. (2004) *Diabetes Care* **27**, 1164–1170
49. Munemasa, S., Sakai, A., Kuroda, Y., Okikawa, Y., Katayama, Y., Asaoku, H., Kubo, T., Miyakawa, Y., Serikawa, M., Sasaki, T., and Kimura, A. (2007) *Br. J. Haematol.* **139**, 41–50
50. Dziadzio, M., Usinger, W., Leask, A., Abraham, D., Black, C. M., Denton, C., and Stratton, R. (2005) *QJM* **98**, 485–492
51. Kireeva, M. L., Mo, F. E., Yang, G. P., and Lau, L. F. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**, 1326–1334
52. Dean, R. A., Butler, G. S., Hamma-Kourbali, Y., Delbé, J., Brigstock, D. R., Courty, J., and Overall, C. M. (2007) *Mol. Cell. Biol.* **27**, 8454–8465
53. Inoki, I., Shiomi, T., Hashimoto, G., Enomoto, H., Nakamura, H., Makino, K., Ikeda, E., Takata, S., Kobayashi, K., and Okada, Y. (2002) *FASEB J.* **16**, 219–221
54. Hoshijima, M., Hattori, T., Inoue, M., Araki, D., Hanagata, H., Miyauchi, A., and Takigawa, M. (2006) *FEBS Lett.* **580**, 1376–1382
55. Yoshida, K., and Munakata, H. (2007) *Biochim. Biophys. Acta* **1770**, 672–680
56. Aoyama, E., Hattori, T., Hoshijima, M., Araki, D., Nishida, T., Kubota, S., and Takigawa, M. (2009) *Biochem. J.* **420**, 413–420
57. Francischetti, I. M., Kotsyfakis, M., Andersen, J. F., and Lukszo, J. (2010) *PLoS One* **5**, e9356
58. Soker, S., Fidler, H., Neufeld, G., and Klagsbrun, M. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 5761–5767
59. Canalis, E. (2007) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1116**, 50–58
60. Maeda, A., Nishida, T., Aoyama, E., Kubota, S., Lyons, K. M., Kuboki, T., and Takigawa, M. (2009) *J. Biochem.* **145**, 207–216
61. Tong, X., Xie, D., O'Kelly, J., Miller, C. W., Muller-Tidow, C., and Koeffler, H. P. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 47709–47714
62. Chen, P. P., Li, W. J., Wang, Y., Zhao, S., Li, D. Y., Feng, L. Y., Shi, X. L., Koeffler, H. P., Tong, X. J., and Xie, D. (2007) *PLoS One* **2**, e534
63. Tong, Z. Y., and Brigstock, D. R. (2006) *J. Endocrinol.* **188**, R1–R8
64. Shi, Y., Wang, W., Tu, Z., Zhang, L., Qiu, J., Li, Q., Ye, F., Li, S., Bu, H., and Li, Y. (2006) *Transplant. Proc.* **38**, 2187–2189
65. Bleau, A. M., Planque, N., Lazar, N., Zambelli, D., Ori, A., Quan, T., Fisher, G., Scotlandi, K., and Perbal, B. (2007) *J. Cell. Biochem.* **101**, 1475–1491

Discussion

Expression de KLK6 - impact sur des processus cellulaires

Plusieurs approches ont été utilisées pour explorer le rôle de KLK6 sur des cellules pulmonaires cancéreuses. L'une d'entre-elles a consisté à exprimer stablement KLK6 dans des cellules humaines ne l'exprimant pas. L'obtention de clones stables a mis en jeu le système Flp-In. L'intérêt de ce système par rapport à l'approche classique est qu'il minimise l'impact de la mutation liée à l'intégration du transgène sur le comportement cellulaire. Dans le cas de l'approche classique, l'intégration du transgène s'effectue de manière aléatoire. Or le fait qu'un transgène s'exprime prouve qu'il s'est intégré dans un site transcriptionnellement actif. Cette intégration n'est probablement pas sans conséquences sur les gènes initialement présents à ce locus et dont l'altération pourrait affecter les mécanismes étudiés. Dans le cas de l'approche par intégration aléatoire, il est donc difficile d'interpréter rigoureusement les résultats observés ; d'autant plus qu'il n'existe pas de témoin de la mutation génomique provoquée, puisque cette mutation est par définition aléatoire. L'usage de clones témoins ayant intégré un vecteur vide ne constitue pas un bon contrôle puisque dans ce cas, aussi, la mutation génomique est aléatoire et a une très faible probabilité d'affecter un locus identique aux locus touchés dans les clones exprimant la protéine d'intérêt. Dans le système Flp-In, l'intégration ciblée du transgène permet d'éviter cet écueil. En effet, la mutation génomique est déjà présente dans la lignée parentale Flp-In puisqu'elle intervient lors de l'intégration aléatoire du vecteur portant le site FRT et non pas au moment de l'introduction du transgène d'intérêt. Ainsi, la lignée parentale Flp-In constitue un parfait témoin pour l'étude d'un transgène d'intérêt. Lorsque nous avons comparé les cellules Flp-In avec la lignée d'origine, nous avons d'ailleurs constaté des différences significatives de comportement bien qu'aucun gène fonctionnellement actif sur les cellules n'ait été introduit. Cette observation démontre bien qu'une intégration aléatoire n'est pas aussi neutre qu'on pourrait le penser.

L'analyse de la KLK6 recombinante produite en cellules HEK-293 Flp-In a révélé la présence de deux fractions se distinguant sur les plans chromatographiques et fonctionnels. Ce type d'hétérogénéité n'est pas liée à la lignée Flp-In puisque Kuzmanov et collaborateurs l'ont également observé pour de la KLK6 produite en cellules HEK-293 transformées stablement par une approche aléatoire (Kuzmanov et al. 2012). Ils ont montré que cette hétérogénéité était notamment due à une différence dans la teneur en acide sialique de la structure N-glycanique ajoutée post-traductionnellement. La teneur en acide sialique n'est pas sans impact sur la chromatographie échangeuse d'ion. En effet, une teneur importante se traduit par une

augmentation des charges négatives favorisant une élution plus rapide de la protéine lors d'une chromatographie échangeuse de cation. Ainsi, la fraction d'élution précoce serait plus riche en acide sialique que la fraction éluee plus tardivement. Comme beaucoup de kallistéines, KLK6 possède en effet un site de N-glycosylation au niveau de l'asparagine 134 et elle a été rapportée comme étant glycosylée dans d'autres contextes : lors d'une expression en cellules d'insecte (Bernett et al. 2002) mais aussi dans des fluides biologiques humains (Kuzmanov et al. 2009 ; Kuzmanov et al. 2012). Kuzmanov et collaborateurs ont révélé que la KLK6 se trouvant dans des fluides (sérum, fluide d'ascites) prélevés chez des patientes atteintes d'un cancer ovarien possède plus d'acide sialique que la KLK6 rencontrée dans un sérum de sujet normal ou dans du liquide céphalo-rachidien (Kuzmanov et al. 2012).

Par ailleurs, nous avons constaté que la fraction éluee rapidement en FPLC était moins active sur le plan enzymatique que la seconde fraction. Cette activité plus faible n'est pas forcément liée au taux de glycosylation et pour l'instant, il n'existe pas de donnée dans la littérature permettant d'établir un tel lien. Il est important de noter que cette fraction présente une bande immuno-réactive de masse moléculaire inférieure à la KLK6 intacte. KLK6 est sensible à des phénomènes protéolytiques, elle est notamment capable de s'autocliner après l'arginine 76 (Bernett et al. 2002; Blaber et al. 2007; Magklara et al. 2003). Ce type de monoclivage a pour conséquence de générer une enzyme bicaténaire inactive. Ce phénomène est bien connu dans le cas de KLK3/PSA chez qui on a rapporté la présence de plusieurs sites de clivage situés au niveau de résidus basiques exposés à la surface de la molécule (Mattsson et al. 2008; Mikolajczyk et al. 2000). De tels clivages altèrent la charge globale de la molécule, probablement en raison de changements conformationnels modifiant l'exposition de certains résidus, et les formes bicaténaires de KLK3/PSA se distinguent de la forme intacte en chromatographie échangeuse d'ion (Mattsson et al. 2008). Dans des conditions réductrices comme en SDS-PAGE, les deux chaînes se séparent conduisant à l'observation de fragments tronqués de la molécule. Prises ensemble, ces données suggèrent que la forme courte de KLK6 observée après réduction dans la première fraction d'élution correspond à un fragment de clivage de KLK6. Ainsi, cette fraction contiendrait un mélange d'isoformes hautement glycosylées et de formes clivées inactives tandis que la seconde fraction contiendrait essentiellement une forme intacte plus faiblement glycosylée.

Lors de ce travail, nous avons montré que KLK6 avait la capacité de stimuler la prolifération et d'inhiber l'apoptose de cellules tumorales pulmonaires A549. De telles actions

ont été décrites pour d'autres types cellulaires. Ainsi, l'utilisation de siRNA dirigés contre KLK6 a révélé une diminution de la prolifération de cellules tumorales gastriques (Nagahara et al. 2005) et de cellules issues de cancer du colon (Kim et al. 2011b). De manière inverse, une sur-expression de KLK6 a provoqué une stimulation de la prolifération de kératinocytes de souris (Klucky et al. 2007). Un rôle anti-apoptotique a également été observé dans des lignées du cancer du colon, l'inhibition de KLK6 permet l'activation de la voie des caspases suggérant un rôle anti-apoptotique de cette kallibréine (Kim et al. 2011b). De plus, Scarisbrick et collaborateurs ont montré qu'une sur-expression de KLK6 dans des splénocytes de souris entraînait une diminution dose-dépendante de marqueurs de mort cellulaire (Scarisbrick et al. 2011). Cependant d'autres données de la littérature indiquent que KLK6 pourrait avoir des effets inverses dans d'autres tissus. Pampalakis et collaborateurs ont démontré que KLK6 était inhibée par méthylation dans une lignée cellulaire de métastase du cancer du sein (MDA-MB-231) et que sa réexpression entraînait une inhibition de la prolifération cellulaire. L'introduction chez la souris de cette lignée modifiée inhibe la formation de tumeurs du sein (Pampalakis et al. 2009). Cette ambivalence de KLK6 observée *in vitro* ou avec des modèles animaux pourrait refléter la situation rencontrée *in vivo*. Dans le cas du cancer du poumon, une expression élevée de KLK6 est un indicateur de mauvais pronostic (Heuzé-Vourc'h et al. 2009) tandis que les formes métastasées du cancer du sein n'expriment pas cette kallibréine (Anisowicz et al. 1996). Ce double comportement a également été constaté pour d'autres kallibréines. En effet, bien que la majorité des études ait montré qu'une expression élevée de kallibréines était reliée à un mauvais pronostic de cancer, quelques études ont révélées une situation inverse. Par exemple, la kallibréine 5 a été proposée comme marqueur de pronostic défavorable dans les cancers du sein (Yousef et al. 2002b) et de l'ovaire (Kim et al. 2001) mais de pronostic favorable dans le cancer de la prostate (Yousef et al. 2002a). Ce paradoxe pourrait être attribué à des actions autocrines ou paracrines dépendantes du type tissulaire et du microenvironnement considérés.

L'influence de l'environnement dans lequel baigne KLK6 sur son action cellulaire est attestée par nos études concernant l'usage de différents sérums. En effet, nous avons constaté que pour deux sérums, une expression ectopique de KLK6 permettait une stimulation de la prolifération cellulaire ; tandis que pour le troisième sérum, KLK6 inhibait la prolifération des cellules A549 bien que la prolifération des cellules HEK restait stimulée. Des agents environnementaux contenus notamment dans le sérum seraient donc capables de moduler l'action proliférative de KLK6. Comme l'a révélé l'usage d'une forme mutée de KLK6, cette

action est dépendante de l'activité enzymatique de la kallibréine. Une première hypothèse serait que des inhibiteurs de protéases contenus en quantité différente dans les sérums impactent l'action de KLK6 en contrôlant la proportion d'enzyme réellement active. En effet, différents inhibiteurs naturels ou synthétiques sont connus pour moduler l'activité protéolytique de KLK6 (Chai et al. 1993 ; Hutchinson et al. 2003; Luo and Jiang 2006 ; Magklara et al. 2003 ; Matsui et al. 2000). Cette hypothèse ne rend cependant pas compte de la différence de réponse observée pour un même sérum avec les cellules HEK-293 et A549. Il paraît plus vraisemblable que le sérum module la capacité des cellules à répondre à KLK6 en régulant directement ou indirectement certaines cibles de cette enzyme. L'impact du microenvironnement sur l'action de KLK6 pourrait être à l'origine de la divergence entre nos observations *in vitro* et les études chez l'animal.

Mécanisme d'action de KLK6 : voie de l'E-cadhérine/ β -caténine

Comme nous l'avons vu, la kallibréine 6 est capable de stimuler la prolifération cellulaire, la migration et l'invasion de keratinocytes de souris. Ces effets de la kallibréine 6 seraient liés à un clivage de l'E-cadhérine membranaire suivie d'une délocalisation de la β -caténine dans le noyau (Klucky et al. 2007). Nous avons examiné cette hypothèse dans notre modèle cellulaire A549 Flp-In surexprimant proKLK6. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de clivage membranaire de l'E-cadhérine chez les cellules exprimant KLK6. Cependant, l'expression ectopique de KLK6 a induit une diminution de la β -caténine membranaire au profit d'une localisation nucléaire. La β -caténine repositionnée au niveau nucléaire semble fonctionnelle puisque nous avons constaté une augmentation, dans les cellules proKLK6, de l'activité du gène rapporteur placé sous la gouvernance du promoteur TCF/LEF.

Plusieurs mécanismes sont capables de réguler la distribution et la fonction de β -caténine. Dans des cellules non stimulées et engagées dans des liaisons intercellulaires, l'intégrité structurelle du complexe de l'E-cadhérine/ β -caténine est assurée via la phosphorylation de l'E-cadhérine ou de la β -caténine par la Ser/Thr kinase SKII (Bek and Kemler 2002; Lickert et al. 2000). Ce complexe peut cependant être rompu soit après clivage de l'E-cadhérine, comme rapporté par Klucky et collaborateurs, soit suite à des événements de phosphorylation de la β -caténine (Behrens et al. 1993; Taddei et al. 2002). Il existe deux types de phosphorylation de cette protéine. L'un concerne un résidu sérine situé en position N-terminale ; la phosphorylation de ce résidu entraîne l'ubiquitination de la β -caténine puis sa

destruction (Luo and Lin 2004). L'autre phosphorylation concerne le résidu tyrosine 654, elle conduit à l'activation de la β -caténine et à sa translocation dans le noyau où cette protéine régule l'activité du promoteur TCF/LEF (Tian et al. 2011). Une des voies contrôlant l'activation de la β -caténine est la voie Wnt (figure n°65).

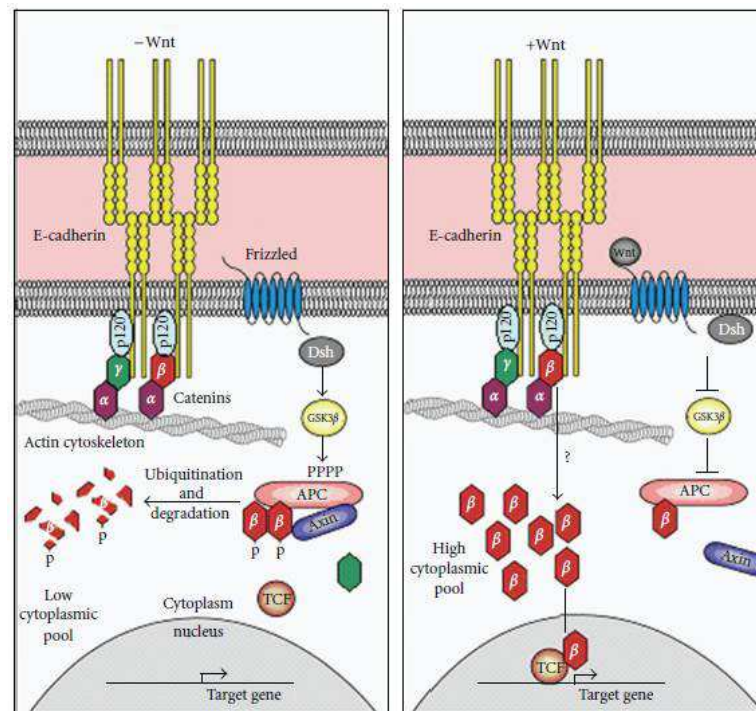


Figure 65 : Le complexe de la E-cadhérine/ β -caténine dans l'adhésion cellulaire et la voie Wnt.
(D'après Tian et collaborateurs (Tian et al. 2011)).

La fixation d'un ligand sur le récepteur transmembranaire Frizzle induit une cascade de transduction de signal impliquant les corécepteurs LRP5 ou 6 (*LDL-receptor Related Protein 5/6*) qui permettent l'activation de Dsh/Dvl (*Dishevelled*). Cette action inhibe le complexe GSK3 (*Glycogène Synthase Kinase-3*), et CK1 α responsable de la phosphorylation N-terminale de la β -caténine impliquée dans sa dégradation. L'inhibition conduit à l'accumulation cytoplasmique de la β -caténine puis à sa translocation dans le noyau (Amit et al. 2002; Dixelius et al. 2002; Yanagawa et al. 2002).

Une autre voie impliquée dans le contrôle de la β -caténine serait la voie de l'EGFR. Lee et collaborateur ont révélé qu'une activation de l'EGFR dans des lignées de cellules de cancers buccaux diminuait la quantité de β -caténine membranaire au profit d'une

augmentation dans le noyau. Ces effets seraient les conséquences à la fois d'une phosphorylation du résidu tyrosine de la β -caténine permettant sa libération du complexe de l'E-cadhérine et d'une phosphorylation de GSK-3 β (Ser-9) inhibant son rôle dans la dégradation de la β -caténine. Par une approche similaire à la nôtre, ils ont montré que la translocation nucléaire de la β -caténine s'accompagnait d'une élévation de son activité transcriptionnelle (Lee et al. 2010). La voie de l'EGFR viendrait en quelque sorte se substituer à la voie Wnt dans certaines circonstances. Nous avons examiné cette éventualité dans le cas de KLK6.

Mécanisme d'action de KLK6 : voie du récepteur de l'EGF.

L'EGFR est le premier récepteur transmembranaire de la famille des récepteurs à tyrosine kinase HER à avoir été identifié. On retrouve dans cette famille quatre membres : EGFR ou HER1/erbB1, HER2 ou erbB2/neu, HER3 ou erbB3 et HER4 ou erbB4. Ils sont composés d'un domaine extracellulaire contenant le site de fixation au ligand, d'un segment transmembranaire et d'un segment intracellulaire pourvu de domaines tyrosines kinases (Baselga 2001; Mendelsohn and Baselga 2003). Les ligands de l'EGFR sont des facteurs de croissance: l'EGF (*Epidermal Growth Factor*), le TGF- α (*Transforming Growth Factor- α*) et l'amphireguline (Ciardiello and Tortora 2008; Dutta and Maity 2007). La fixation du ligand sur le récepteur induit la formation d'homodimères ou d'hétérodimères (le plus souvent avec ErbB2). La dimérisation des récepteurs entraîne l'autophosphorylation des domaines intracytoplasmiques adjacents et l'activation des tyrosines kinases intrinsèques présentes sur chaque récepteur. Plusieurs voies de transduction du signal peuvent alors être activées (Figure n°66) (Nyati et al. 2006). La voie Ras/Raf-MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) aboutit à l'activation de facteurs de transcription via ERK (*Extracellular Signal Regulated Kinase*) à l'origine de la motilité cellulaire (Nishinaka and Yabe-Nishimura 2001). L'EGFR phosphorylé peut également activer la PI3K (phosphatidyl inositol-3-kinase) via la protéine Gab1. La PI3K mène à un signal antiapoptotique via Akt puis NF κ B (Vivanco and Sawyers 2002). L'EGFR possède également un rôle dans la prolifération et la survie cellulaire via JAK2 (*Janus Kinase2*) / STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription3*) (Bowman et al. 2000). D'autres voies de signalisation sont impliquées dans l'adhésion cellulaire et l'angiogénèse.

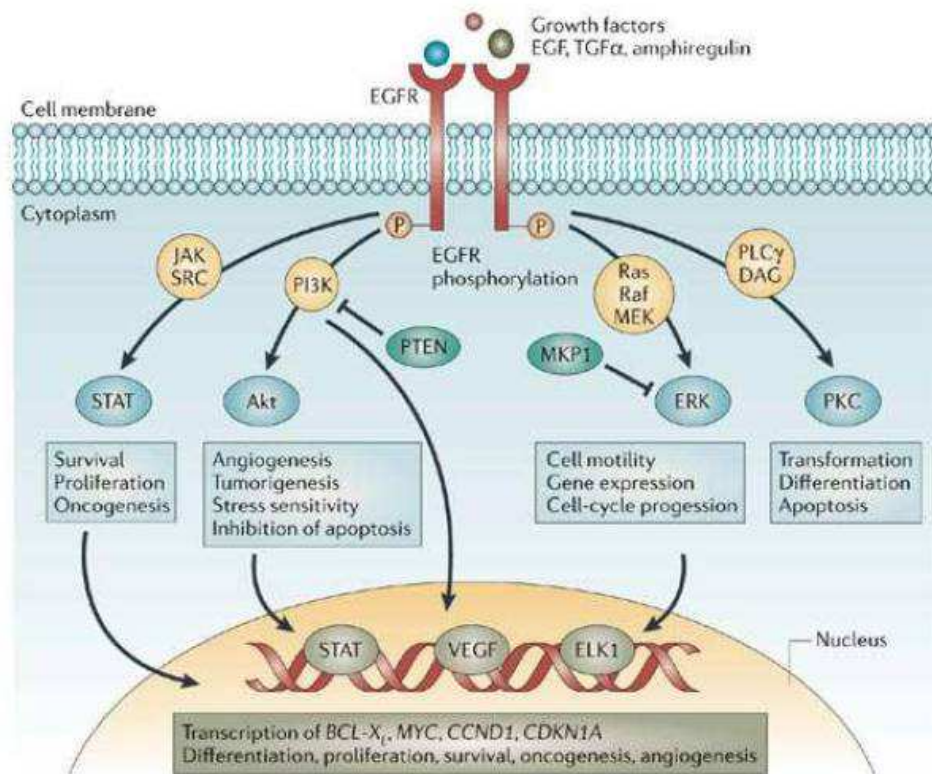


Figure 66 : Transduction du signal après activation de l'EGFR d'après Nyati et collaborateurs (Nyati et al. 2006).

La voie JAK/STAT est impliquée dans la prolifération et la survie cellulaire, la voie PI3K-Akt dans l'inhibition de l'apoptose et Ras/Raf-MAPK dans la motilité cellulaire.

Nous avons démontré que le récepteur de l'EGF est impliqué dans la réponse des cellules A549 à KLK6 grâce à l'utilisation d'un anticorps (cetuximab) bloquant la fixation de ligand sur l'EGFR. En effet, cet anticorps inhibe la prolifération cellulaire induite par KLK6 dans des cellules l'exprimant stablement. De plus l'ajout de KLK6 dans le milieu de culture de cellules ne l'exprimant pas a provoqué une phosphorylation du récepteur et une activation de la voie ERK1/2. Ces résultats sont en accord avec une observation précédente du laboratoire ayant montré que l'induction de la prolifération de cellules stimulées par KLK6 s'accompagnait d'une augmentation de l'expression de c-Myc (Heuzé-Vourc'h et al. 2009). Comme le montre la figure n°66 l'oncogène c-Myc est un gène cible de la voie de l'EGFR. Cependant la kallistéine 6 n'est pas un activateur direct de l'EGFR et il nous fallait identifier une cible de l'enzyme pouvant impacter indirectement la voie de l'EGFR. Parmi les substrats connus de KLK6, notre attention s'est portée sur les PAR (*Protease Activated Receptor*). En effet KLK6 est connue pour activer PAR2 (Oikonomopoulou et al. 2006a) et il a été démontré

que l'activation de PAR2 par un agoniste induisait la transactivation de l'EGFR (Caruso et al. 2006; Darmoul et al. 2004a; Hirota et al. 2012; Jarry et al. 2007; Kawao et al. 2005).

Mécanisme d'action de KLK6 : voie du récepteur PAR-2.

La famille des PAR regroupe 4 membres nommés PAR1 à 4, ces sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G activés par des protéases à sérine et les metalloprotéases matricielles. L'activation se produit par un mécanisme protéolytique irréversible, les protéases se fixent et clivent le domaine extracellulaire N-terminal à des sites spécifiques pour générer une nouvelle extrémité N-terminale qui va agir comme ligand pour déclencher la signalisation intracellulaire (figure n°67).

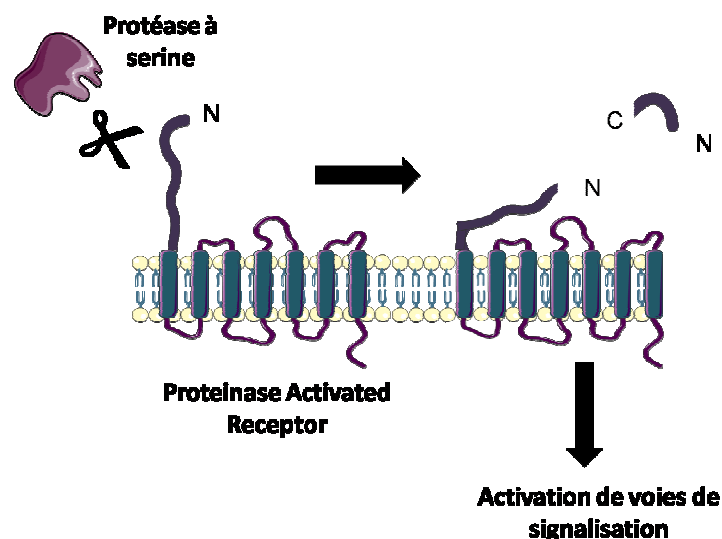


Figure 67 : Mode d'activation des PAR par les kallibréines.

Les KLK clivent l'extrémité N-terminale générant un ligand fixé au récepteur qui va se lier aux boucles extracellulaires du récepteur.

De plus, il est possible d'activer *in vitro* ces récepteurs grâce à des peptides synthétiques dérivés des séquences du ligand générées à l'extrémité N-terminale (Soh et al. 2011). Plusieurs études expérimentales montrent une implication de PAR2 dans le développement et la progression tumorale. Par exemple, PAR2 est surexprimée dans les cancers gastrique, de la prostate ainsi que dans les mélanomes (Black et al. 2007; Caruso et al. 2006; Massi et al. 2005). L'activation de PAR2 stimule la prolifération cellulaire dans divers types cellulaires de cancer incluant les cellules cancéreuses du colon, gastrique, du col

de l'utérus et les mélanomes (Caruso et al. 2006; Darmoul et al. 2004a; Nishibori et al. 2005; Sanchez-Hernandez et al. 2008; Yada et al. 2005).

Comme évoqué précédemment, nous avons donc examiné l'hypothèse d'une activation indirecte de l'EGFR suite à une action de KLK6 sur PAR2. Dans un premier temps, nous avons examiné si la connexion PAR-2/EGFR existait dans les cellules analysées. La stimulation de PAR-2 par un agoniste a induit une prolifération des cellules A549 associée à une phosphorylation du récepteur à l'EGF ainsi que de ERK1/2. Ces phosphorylations ont été inhibées par le cetuximab indiquant que la signalisation passe par la libération d'un ligand de l'EGFR. De plus, le blocage de la voie PAR-2 à l'aide d'un siRNA spécifique a entraîné l'inhibition de la phosphorylation de ERK induite à la fois par l'agoniste et par KLK6.

Il a été montré précédemment que PAR1 et PAR2 jouent un rôle pivot dans l'activité de ERK dans le cancer du colon (Darmoul et al. 2004a; Darmoul et al. 2003; Darmoul et al. 2004b). De plus, PAR1 et PAR4 induisent la prolifération des cellules cancéreuses du colon par une série d'événements qui amène à l'activation de ERK (Darmoul et al. 2003; Gratio et al. 2009). Dans les cellules A549 nous avons montré d'une part, que la phosphorylation de ERK induite par le rajout de KLK6 active passait par la fixation d'un ligand sur l'EGFR, et d'autre part, que l'activation de PAR2 permettait l'activation ERK via la fixation d'un ligand de l'EGFR. Ceci nous laisse donc penser que la kallistéine 6 en activant PAR2 permettrait la libération de ligand(s) de l'EGFR qui entrainerait ensuite l'activation des voies de signalisation sous-jacentes et la stimulation de la prolifération cellulaire.

Des cascades de signalisation impliquant les kallistéines, les membres de la famille des PAR et l'EGFR ont été décrites précédemment. Ainsi Gao et collaborateurs ont montré que KLK1 pouvait induire la migration et la prolifération de la lignée cellulaire de keratinocyte HaCat via PAR-1 et l'EGFR. Dans ce contexte, le clivage de PAR-1 par KLK1 entrainerait une activation de la voie PKC-Src puis celle d'une métalloprotéase membranaire (Figure n°68). La protéase membranaire activée mobiliserait des ligands de l'EGFR liés à la membrane comme l'HB-EGF (heparin-binding EGF-like growth factor) ou l'amphéréguline qui en se fixant sur l'EGFR activeraient les voies sous-jacentes (Gao et al. 2009).

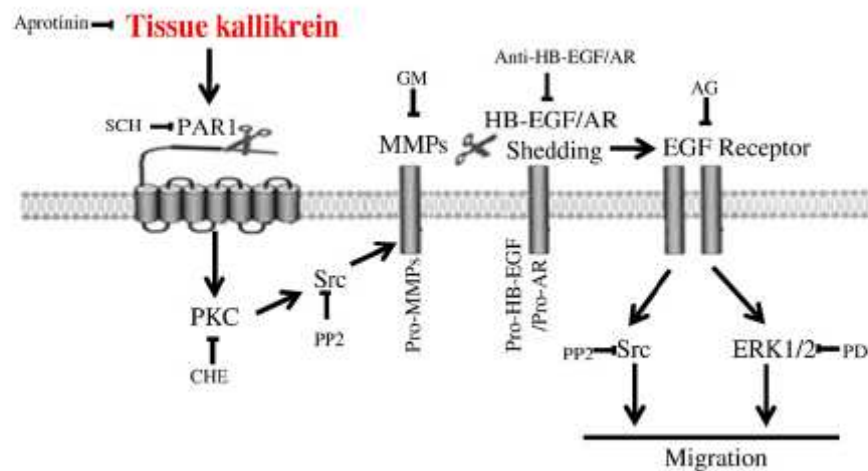


Figure 68 : Représentation schématique de la voie de signalisation activée par KLK1 induisant la migration des keratinocytes HaCat.

D'après Gao et collaborateurs (Gao et al. 2009)

Un mécanisme similaire a été rapporté pour la kallibréine plasmatique au niveau de cellules musculaires lisses. Dans ce cas, la métalloprotéase évoquée correspond à ADAM 17 (*A Disintegrin And Metalloprotease*) (Abdallah et al. 2010). L'activation de ADAM17 pourrait être consécutive à une phosphorylation de son domaine cytoplasmique comme cela a été décrit par Xu et collaborateurs (Xu and Derynck 2010). De telles cascades sont compatibles avec les données accumulées sur KLK6.

Conclusion et perspectives

Nous avons précédemment montré au laboratoire que KLK6 était un indicateur de pronostic défavorable pour des patients atteints d'un cancer broncho-pulmonaire non-à-petites cellules (Heuzé-Vourc'h et al. 2009). Cette corrélation entre niveau d'expression de KLK6 et devenir du cancer pouvait être la résultante de 2 actions potentielles de KLK6 : une diminution de la réponse aux agents thérapeutiques et/ou une action pro-tumorale. Ces deux aspects ont été explorés lors de ce travail. Par des approches *in vitro* et *in vivo*, nous avons montré que la KLK6 n'avait aucun effet sur la réponse aux agents chimio-thérapeutiques classiquement utilisés en clinique pour traiter le cancer du poumon. A l'inverse, KLK6 est capable de promouvoir des effets pro-tumoraux (prolifération, résistance à l'apoptose) chez des cellules cancéreuses pulmonaires humaines. Le fait que KLK6 soit un indicateur de pronostic défavorable chez l'homme pourrait donc être dû à une contribution de cette protéase

à la progression tumorale. Cette interprétation n'a pas pu être soutenue par les travaux effectués chez l'animal. Dans le modèle utilisé, nous avons observé au contraire un effet anti-tumoral. Cette discordance est probablement liée à un impact particulier de la KLK6 humaine sur un microenvironnement non représentatif du microenvironnement pulmonaire humain. Afin de se rapprocher d'une situation physiopathologique, une première solution pourrait consister à utiliser un modèle orthotopique de cancer mettant en jeu une implantation directe des cellules humaines dans les bronches des souris. Cependant, un problème important persisterait, à savoir l'usage d'un système chimérique composé de cellules tumorales et de KLK6 humaines dans un contexte environnemental de souris. Ce problème est particulièrement critique dans le cas d'une protéase puisque son action dépend de sa capacité ou non à hydrolyser des substrats. Différentes études ont démontré des différences significatives entre la spécificité de protéases de souris et leurs homologues humaines avec comme corollaires la capacité ou l'incapacité à cliver des substrats différents ou du même type, respectivement. Dans l'idéal, il faudrait donc travailler dans un contexte homogène, cellules tumorales de souris et protéase de souris. Mais la souris apparaît comme un mauvais modèle pour explorer le rôle de la KLK6 endogène sur le développement d'un cancer du poumon puisque contrairement à la situation prévalant chez l'homme, le gène codant la KLK6 n'est pas exprimé dans le poumon de cette espèce.

Quoiqu'il en soit, nos travaux cellulaires suggèrent que KLK6 régulerait la prolifération et la survie de cellules tumorales humaines via une cascade de signalisation impliquant PAR-2, l'EGFR et des voies situées en aval de ce récepteur : la voie de la β -caténine et de ERK (figure n°69).

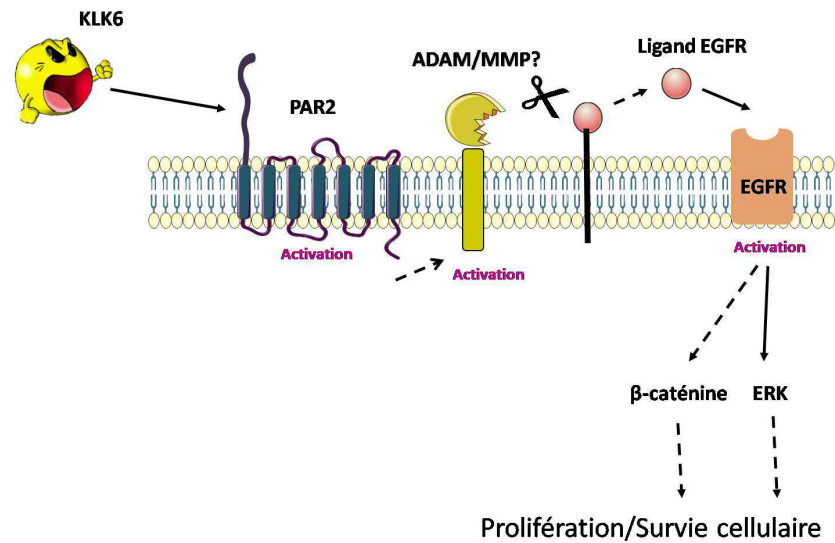


Figure 69 : Cascade de signalisation de KLK6 dans les cellules A549.

Légende : les flèches pleines indiquent les liens qui ont été établis lors de la thèse ; les flèches en pointillées sont les liens qui restent à établir.

Certains points de ce schéma qui s'appuie sur nos propres données et des données de la littérature restent cependant à valider expérimentalement dans notre système cellulaire. Si il s'agit notamment de l'activation de l'ADAM17 ou d'une autre métalloprotéase membranaire suite à l'activation de PAR-2 par KLK6, de la nature du ligand de l'EGFR mobilisé dans le contexte des cellules pulmonaires tumorales et de la connexion entre EGFR et la β -caténine.

Finalement, alors que la plupart des gènes codant les kallicroïnes tissulaires sont exprimés dans le poumon et que plusieurs d'entre eux sont dérégulés lors du cancer broncho-pulmonaire, on connaît encore peu de choses sur l'implication de ces protéases dans ce cancer. KLK8 et KLK10 semblent avoir des effets anti-tumoraux dans les stades précoces du cancer non-à-petites cellules (Sher et al. 2006; Zhang et al. 2009). A l'inverse, KLK13 a été décrit comme pouvant favoriser l'invasion et le comportement métastatique de cellules tumorales pulmonaires (Chou et al. 2011). Dans ces trois cas, les effets ont été reliés à des remodelages matriciels. Le travail rapporté ici donne un éclairage différent en mettant en avant des altérations de voies de signalisation provoquées soit par le clivage d'un récepteur membranaire (KLK6/PAR-2) soit par l'hydrolyse d'intégrateurs de signalisation (KLK12/CCNs). De nombreuses études sont encore nécessaires pour préciser dans le détail les actions étudiées ici et pour comprendre comment s'articulent des effets anti- et pro-tumoraux induits par des protéases d'une même famille.

Références Bibliographiques

Himaia. Référence du 26/11/12, <http://www.himaia.com/vb/showthread.php?t=920>

Aarbiou J, Ertmann M, van Wetering S, van Noort P, Rook D, Rabe KF, Litvinov SV, van Krieken JHJM, de Boer WI, Hiemstra PS: Human neutrophil defensins induce lung epithelial cell proliferation in vitro. *Journal of Leukocyte Biology* 2002; 72:167-174.

Abdallah RT, Keum J-S, Lee M-H, Wang B, Goos M, Luttrell DK, Luttrell LM, Jaffa AA: Plasma Kallikrein Promotes Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation and Signaling in Vascular Smooth Muscle through Direct Activation of Protease-activated Receptors. *Journal of Biological Chemistry* 2010; 285:35206-35215.

Abelous J, Bardier E: De l'action hypotensive et myotique de l'urine humaine normales *Compt Rend Soc Biol* 1909a; 11:876.

Abelous J, Bardier E: L'urohypotensine. *Journal de Physiologie et de Pathologie générale* 1909b; 11:777-786.

Abreu JG, Ketpura NI, Reversade B, De Robertis EM: Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF- β . *Nature Cell Biology* 2002; 4:599-604.

Alberg AJ, Samet JM: Epidemiology of lung cancer. *Chest* 2003; 123:21S-49S.

Amit S, Hatzubai A, Birman Y, Andersen JS, Ben-Shushan E, Mann M, Ben-Neriah Y, Alkalay I: Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes & Development* 2002; 16:1066-1076.

Angermann A, Rahn H-P, Hektor T, Fertig G, Kemme M: Purification and characterization of human salivary-gland prokallikrein from recombinant baculovirus-infected insect cells. *European Journal of Biochemistry* 1992; 206:225-233.

Anisowicz A, Sotiropoulou G, Stenman G, Mok SC, Sager R: A novel protease homolog differentially expressed in breast and ovarian cancer. *Molecular Medicine* 1996; 2:624-636.

Apte RN, Voronov E: Is interleukin-1 a good or bad 'guy' in tumor immunobiology and immunotherapy? *Immunological Reviews* 2008; 222:222-241.

Askew DJ, Silverman GA: Intracellular and extracellular serpins modulate lung disease. *Journal of Perinatology* 2008; 28:S127-S135.

Avgeris M, Mavridis K, Scorilas A: Kallikrein-related peptidase genes as promising biomarkers for prognosis and monitoring of human malignancies. *Biological Chemistry* 2010; 391:505-511.

Bakin RE, Gioeli D, Sikes RA, Bissonette EA, Weber MJ: Constitutive Activation of the Ras/Mitogen-activated Protein Kinase Signaling Pathway Promotes Androgen Hypersensitivity in LNCaP Prostate Cancer Cells. *Cancer Research* 2003; 63:1981-1989.

Barrett AJ: Citation classic - the interaction of alpha-2-macroglobulin with proteinases - characteristics and specificity of the reaction, and a hypothesis concerning its molecular mechanism. *Current Contents/Life Sciences* 1989:14-14.

Barrett AJ, Tolle DP, Rawlings ND: Managing peptidases in the genomic era. *Biological Chemistry* 2003; 384:873-882.

- Baselga J: The EGFR as a target for anticancer therapy-focus on cetuximab. *European Journal of Cancer* 2001; 37, Supplement 4:16-22.
- Bayani J, Marrano P, Graham C, Zheng Y, Li L, Katsaros D, Lassus H, Butzow R, Squire JA, Diamandis EP: Genomic instability and copy-number heterogeneity of chromosome 19q, including the kallikrein locus, in ovarian carcinomas. *Molecular Oncology* 2011; 5:48-60.
- Bayani J, Paliouras M, Planque C, Shan SJC, Graham C, Squire JA, Diamandis EP: Impact of cytogenetic and genomic aberrations of the kallikrein locus in ovarian cancer. *Molecular Oncology* 2008; 2:250-260.
- Bayes A, Tsetsenis T, Ventura S, Vendrell J, Aviles FX, Sotiropoulou G: Human kallikrein 6 activity is regulated via an autoproteolytic mechanism of activation/inactivation. *Biological Chemistry* 2004; 385:517-524.
- Beaubien G, Rosinskichupin I, Mattei MG, Mbikay M, Chretien M, Seidah NG: Gene structure and chromosomal localization of plasma kallikrein. *Biochemistry* 1991; 30:1628-1635.
- Beaufort N, Plaza K, Utzschneider D, Schwarz A, Burkhart JM, Creutzburg S, Debela M, Schmitt M, Ries C, Magdolen V: Interdependence of kallikrein-related peptidases in proteolytic networks. *Biological Chemistry*; 391:581-587.
- Becker C, Lilja H: Individual prostate-specific antigen (PSA) forms as prostate tumor markers. *Clinica Chimica Acta* 1997; 257:117-132.
- Behrens J, Vakaet L, Friis R, Winterhager E, Van Roy F, Mareel MM, Birchmeier W: Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/beta-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene. *The Journal of Cell Biology* 1993; 120:757-766.
- Bek S, Kemler R: Protein kinase CKII regulates the interaction of beta-catenin with alpha-catenin and its protein stability. *Journal of Cell Science* 2002; 115:4743-4753.
- Bernett MJ, Blaber SI, Scarisbrick IA, Dhanarajan P, Thompson SM, Blaber M: Crystal Structure and Biochemical Characterization of Human Kallikrein 6 Reveals That a Trypsin-like Kallikrein Is Expressed in the Central Nervous System. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277:24562-24570.
- Bhattacharjee A, Richards WG, Staunton J, Li C, Monti S, Vasa P, Ladd C, Beheshti J, Bueno R, Gillette M, Loda M, Weber G, Mark EJ, Lander ES, Wong W, Johnson BE, Golub TR, Sugarbaker DJ, Meyerson M: Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2001; 98:13790-13795.
- Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K: Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacological Reviews* 1992; 44:1-80.
- Blaber M, Yoon H, Juliano MA, Scarisbrick IA, Blaber SI: Functional intersection of the kallikrein-related peptidases (KLKs) and thrombostasis axis. *Biological Chemistry* 2010; 391:311-320.
- Blaber SI, Ciric B, Christophi GP, Bernett MJ, Blaber M, Rodriguez M, Scarisbrick IA: Targeting kallikrein 6-proteolysis attenuates CNS inflammatory disease. *The FASEB Journal* 2004.

- Blaber SI, Scarisbrick IA, Bennett MJ, Dhanarajan P, Seavy MA, Jin Y, Schwartz MA, Rodriguez M, Blaber M: Enzymatic Properties of Rat Myelencephalon-Specific Protease. *Biochemistry* 2001; 41:1165-1173.
- Blaber SI, Yoon H, Scarisbrick IA, Juliano MA, Blaber M: The Autolytic Regulation of Human Kallikrein-Related Peptidase 6. *Biochemistry* 2007; 46:5209-5217.
- Black PC, Mize GJ, Karlin P, Greenberg DL, Hawley SJ, True LD, Vessella RL, Takayama TK: Overexpression of protease-activated receptors-1,-2, and-4 (PAR-1, -2, and -4) in prostate cancer. *The Prostate* 2007; 67:743-756.
- Blow AMJ: Action of human lysosomal elastase on oxidized-B chain of insulin. *Biochemical Journal* 1977; 161:13-16.
- Borgoño CA, Diamandis EP: The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2004; 4:876-890.
- Borgoño CA, Gavigan J-A, Alves J, Bowles B, Harris JL, Sotiropoulou G, Diamandis EP: Defining the extended substrate specificity of kallikrein 1-related peptidases. *Biological Chemistry* 2007a; 388:1215-1225.
- Borgoño CA, Grass L, Soosaipillai A, Yousef GM, Petraki CD, Howarth DHC, Fracchioli S, Katsaros D, Diamandis EP: Human Kallikrein 14. *Cancer Research* 2003; 63:9032-9041.
- Borgoño CA, Michael IP, Diamandis EP: Human Tissue Kallikreins: Physiologic Roles and Applications in Cancer. *Molecular Cancer Research* 2004; 2:257-280.
- Borgoño CA, Michael IP, Shaw JLV, Luo L-Y, Ghosh MC, Soosaipillai A, Grass L, Katsaros D, Diamandis EP: Expression and Functional Characterization of the Cancer-related Serine Protease, Human Tissue Kallikrein 14. *Journal of Biological Chemistry* 2007b; 282:2405-2422.
- Bothwell MA, Wilson WH, Shooter EM: The relationship between glandular kallikrein and growth factor-processing proteases of mouse submaxillary gland. *Journal of Biological Chemistry* 1979; 254:7287-7294.
- Bourguignon J, Borghi H, Sesboué R, Diarra-Mehrpour M, Bernaudin J-F, Josette M, Martin J-P, Thiberville L: Immunohistochemical Distribution of Inter-alpha-trypsin Inhibitor Chains in Normal and Malignant Human Lung Tissue. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1999; 47:1625-1632.
- Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R: STATs in oncogenesis. *Oncogene* 2000; 19:2474-2488.
- Brambilla E, Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y: The new World Health Organization classification of lung tumours. *European Respiratory Journal* 2001; 18:1059-1068.
- Brattsand M, Egelrud Tr: Purification, Molecular Cloning, and Expression of a Human Stratum Corneum Trypsin-like Serine Protease with Possible Function in Desquamation. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274:30033-30040.
- Brattsand M, Stefansson K, Lundh C, Haasum Y, Egelrud T: A Proteolytic Cascade of Kallikreins in the Stratum Corneum. *Journal of Investigative Dermatology* 2004; 124:198-203.
- Caliendo G, Santagada V, Perissutti E, Severino B, Fiorino F, Frecentese F, Juliano L: Kallikrein Protease Activated Receptor (PAR) Axis: An Attractive Target for Drug Development. *Journal of Medicinal Chemistry* 2012; 55:6669-6686.

- Camoretti-Mercado B, Solway J: Transforming growth factor-B1 and disorders of the lung. *Cell Biochemistry and Biophysics* 2005; 43:131-148.
- Cao Y, Becker C, Lundwall Å, Christensson A, Gadaleanu V, Lilja H, Bjartell A: Expression of protein C inhibitor (PCI) in benign and malignant prostatic tissues. *The Prostate* 2003; 57:196-204.
- Cao Y, Lundwall Åk, Gadaleanu V, Lilja H, Bjartell A: Anti-Thrombin Is Expressed in the Benign Prostatic Epithelium and in Prostate Cancer and Is Capable of Forming Complexes with Prostate-Specific Antigen and Human Glandular Kallikrein 2. *The American Journal of Pathology* 2002; 161:2053-2063.
- Caruso R, Pallone F, Fina D, Gioia V, Peluso I, Caprioli F, Stolfi C, Perfetti A, Spagnoli LG, Palmieri G, MacDonald TT, Monteleone G: Protease-Activated Receptor-2 Activation in Gastric Cancer Cells Promotes Epidermal Growth Factor Receptor Trans-Activation and Proliferation. *The American Journal of Pathology* 2006; 169:268-278.
- Casalino-Matsuda SM, Monzon ME, Conner GE, Salathe M, Forteza RM: Role of Hyaluronan and Reactive Oxygen Species in Tissue Kallikrein-mediated Epidermal Growth Factor Receptor Activation in Human Airways. *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279:21606-21616.
- Caubet C, Jonca N, Brattsand M, Guerrin M, Bernard D, Schmidt R, Egelrud T, Simon M, Serre G: Degradation of Corneodesmosome Proteins by Two Serine Proteases of the Kallikrein Family, SCTE//KLK5//hK5 and SCCE//KLK7//hK7. *Journal of Investigative Dermatology* 2004; 122:1235-1244.
- Chai KX, Chen LM, Chao J, Chao L: Kallistatin: a novel human serine proteinase inhibitor. Molecular cloning, tissue distribution, and expression in Escherichia coli. *Journal of Biological Chemistry* 1993; 268:24498-24505.
- Chao J, Barrett AJ, Rawlings ND, J.F. W: Human kallikrein 1, tissue kallikrein. *Elsevier Academic Press* 2004:1577-1580.
- Chao J, Miao RQ, Chen V, Chen LM, Chao L: Novel roles of Kallistatin, a specific tissue kallikrein inhibitor, in vascular remodeling. *Biological Chemistry* 2001; 382:15-21.
- Charlesworth MC, Young CY, Miller VM, Tindall DJ: Kininogenase activity of prostate-derived human glandular kallikrein (hK2) purified from seminal fluid. *Journal of Andrology* 1999; 20:220-229.
- Chee J, Naran A, Misso NL, Thompson PJ, Bhoola KD: Expression of tissue and plasma kallikreins and kinin B1 and B2 receptors in lung cancer. *Biological Chemistry* 2008; 389:1225-1233.
- Chen C-C, Lau LF: Functions and mechanisms of action of CCN matricellular proteins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2009; 41:771-783.
- Chen VC, Chao L, Pimenta DC, Bledsoe G, Juliano L, Chao J: Identification of a Major Heparin-binding Site in Kallistatin. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276:1276-1284.
- Cho WCS, Kwan CK, Yau S, So PPF, Poon PCM, Au JSK: The role of inflammation in the pathogenesis of lung cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 2011; 15:1127-1137.
- Chou R-H, Lin S-C, Wen H-C, Wu C-W, Chang W-SW: Epigenetic activation of human kallikrein 13 enhances malignancy of lung adenocarcinoma by promoting N-cadherin expression and laminin degradation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2011; 409:442-447.

- Chow T-fF, Crow M, Earle T, El-Said H, Diamandis EP, Yousef GM: Kallikreins as microRNA targets: an in silico and experimental-based analysis. *Biological Chemistry* 2008; 389:731-738.
- Christensson A, Laurell C-B, Lilja H: Enzymatic activity of prostate-specific antigen and its reactions with extracellular serine proteinase inhibitors. *European Journal of Biochemistry* 1990; 194:755-763.
- Christiansen SC, Proud D, Cochrane CG: Detection of tissue kallikrein in the bronchoalveolar lavage fluid of asthmatic subjects. *The Journal of Clinical Investigation* 1987; 79:188-197.
- Ciardello F, Tortora G: EGFR Antagonists in Cancer Treatment. *New England Journal of Medicine* 2008; 358:1160-1174.
- Cisowski J, O'Callaghan K, Kuliopulos A, Yang J, Nguyen N, Deng Q, Yang E, Fogel M, Tressel S, Foley C, Agarwal A, Hunt Iii SW, McMurry T, Brinckerhoff L, Covic L: Targeting Protease-Activated Receptor-1 with Cell-Penetrating Peptides in Lung Cancer. *The American Journal of Pathology* 2011; 179:513-523.
- Clements JA: The molecular biology of the kallikreins and their roles in inflammation. *Farmer S, editor New York: The Kinin System Academic Press* 1997:71-97.
- Clements JA, Willemsen NM, Myers SA, Dong Y: The Tissue Kallikrein Family of Serine Proteases: Functional Roles in Human Disease and Potential as Clinical Biomarkers. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 2004; 41:265-312.
- Cleutjens KBJM, van Eekelen CCEM, van der Korput HAGM, Brinkmann AO, Trapman J: Two Androgen Response Regions Cooperate in Steroid Hormone Regulated Activity of the Prostate-specific Antigen Promoter. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271:6379-6388.
- Cohen P, Graves HC, Peehl DM, Kamarei M, Giudice LC, Rosenfeld RG: Prostate-specific antigen (PSA) is an insulin-like growth factor binding protein-3 protease found in seminal plasma. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1992; 75:1046-1053.
- Colasante A, Mascetra N, Brunetti M, Lattanzio G, Diodoro M, Caltagirone S, Musiani P, Aiello Francesca B: Transforming Growth Factor beta 1, Interleukin-8 and Interleukin-1, in Non-Small-Cell Lung Tumors. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1997; 156:968-973.
- Crosby LM, Waters CM: Epithelial repair mechanisms in the lung. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 2010; 298:L715-L731.
- Daniels A, van Bilsen M, Goldschmeding R, van der Vusse GJ, van Nieuwenhoven FA: Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis. *Acta Physiologica* 2009; 195:321-338.
- Darmoul D, Gratio V, Devaud H, Laburthe M: Protease-activated Receptor 2 in Colon Cancer. *Journal of Biological Chemistry* 2004a; 279:20927-20934.
- Darmoul D, Gratio Vr, Devaud Hln, Lehy Trs, Laburthe M: Aberrant Expression and Activation of the Thrombin Receptor Protease-Activated Receptor-1 Induces Cell Proliferation and Motility in Human Colon Cancer Cells. *The American Journal of Pathology* 2003; 162:1503-1513.
- Darmoul D, Gratio Vr, Devaud Hln, Peiretti F, Laburthe M: Activation of Proteinase-Activated Receptor 1 Promotes Human Colon Cancer Cell Proliferation Through Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation. *Molecular Cancer Research* 2004b; 2:514-522.

- Debela M, Beaufort N, Magdolen V, Schechter NM, Craik CS, Schmitt M, Bode W, Goettig P: Structures and specificity of the human kallikrein-related peptidases KLK 4, 5, 6, and 7. *Biological Chemistry* 2008; 389:623-632.
- Debela M, Goettig P, Magdolen V, Huber R, Schechter NM, Bode W: Structural Basis of the Zinc Inhibition of Human Tissue Kallikrein 5. *Journal of Molecular Biology* 2007a; 373:1017-1031.
- Debela M, Hess P, Magdolen V, Schechter NM, Steiner T, Huber R, Bode W, Goettig P: Chymotryptic specificity determinants in the 1.0 Å structure of the zinc-inhibited human tissue kallikrein 7. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007b; 104:16086-16091.
- Debela M, Magdolen V, Grimminger V, Sommerhoff C, Messerschmidt A, Huber R, Friedrich R, Bode W, Goettig P: Crystal Structures of Human Tissue Kallikrein 4: Activity Modulation by a Specific Zinc Binding Site. *Journal of Molecular Biology* 2006; 362:1094-1107.
- Delaria KA, Muller DK, Marlor CW, Brown JE, Das RC, Rocznik SO, Tamburini PP: Characterization of Placental Bikunin, a Novel Human Serine Protease Inhibitor. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272:12209-12214.
- Dementiev A, Petitou M, Herbert J-M, Gettins PGW: The ternary complex of antithrombin-anhydrothrombin-heparin reveals the basis of inhibitor specificity. *Nature Structural and Molecular Biology* 2004; 11:863-867.
- Denmeade SR, Lovgren J, Khan SR, Lilja H, Isaacs JT: Activation of latent protease function of Pro-HK2, but not Pro-PSA, involves autoprocessing. *Prostate* 2001; 48:122-126.
- Deperthes D, Frenette G, Brillard-Bourdet M, Bourgeois L, Gauthier F, Tremblay RR, Dube JY: Potential involvement of kallikrein hK2 in the hydrolysis of the human seminal vesicle proteins after ejaculation. *Journal of Andrology* 1996; 17:659-665.
- Deperthes D, Marceau F, Frenette G, Lazure C, Tremblay RR, Dubé JY: Human kallikrein hK2 has low kininogenase activity while prostate-specific antigen (hK3) has none. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1997; 1343:102-106.
- Deraison C, Bonnart C, Lopez F, Besson C, Robinson R, Jayakumar A, Wagberg F, Brattsand M, Hachem JP, Leonardsson G, Hovnanian A: LEKTI Fragments Specifically Inhibit KLK5, KLK7, and KLK14 and Control Desquamation through a pH-dependent Interaction. *Molecular Biology of the Cell* 2007; 18:3607-3619.
- Descargues P, Deraison C, Bonnart C, Kreft M, Kishibe M, Ishida-Yamamoto A, Elias P, Barrandon Y, Zambruno G, Sonnenberg A, Hovnanian A: Spink5-deficient mice mimic Netherton syndrome through degradation of desmoglein 1 by epidermal protease hyperactivity. *Nature Genetics* 2005; 37:56-65.
- Descargues P, Deraison C, Prost C, Fraitag S, Mazereeuw-Hautier J, D'Alessio M, Ishida-Yamamoto A, Bodemer C, Zambruno G, Hovnanian A: Corneodesmosomal Cadherins Are Preferential Targets of Stratum Corneum Trypsin- and Chymotrypsin-like Hyperactivity in Netherton Syndrome. *Journal of Investigative Dermatology* 2006; 126:1622-1632.
- Dhar A, Ray A: The CCN family proteins in carcinogenesis. *Experimental oncology* 2010; 32:2-9.
- Di Cera E: Serine proteases. *IUBMB Life* 2009; 61:510-515.
- Digby M, Zhang X-Y, Richards RI: Human prostate specific antigen (PSA) gene: structure and linkage to the kallikrein-like gene, hGK-1. *Nucleic Acids Research* 1989; 17:2137.

- Dixelius J, Cross M, Matsumoto T, Sasaki T, Timpl R, Claesson-Welsh L: Endostatin Regulates Endothelial Cell Adhesion and Cytoskeletal Organization. *Cancer Research* 2002; 62:1944-1947.
- Dong Y, Bui LT, Odorico DM, Tan OL, Myers SA, Samaratunga H, Gardiner RA, Clements JA: Compartmentalized expression of kallikrein 4 (KLK4/hK4) isoforms in prostate cancer: nuclear, cytoplasmic and secreted forms. *Endocrine-Related Cancer* 2005; 12:875-889.
- Dong Y, Matigian N, Harvey TJ, Samaratunga H, Hooper JD, Clements JA: Tissue-specific promoter utilisation of the kallikrein-related peptidase genes, KLK5 and KLK7, and cellular localisation of the encoded proteins suggest roles in exocrine pancreatic function. *Biological Chemistry* 2008; 389:99-109.
- dos Santos Silva E, Ulrich M, Döring G, Botzenhart K, Gött P: Trefoil factor family domain peptides in the human respiratory tract. *The Journal of Pathology* 2000; 190:133-142.
- Dutta PR, Maity A: Cellular responses to EGFR inhibitors and their relevance to cancer therapy. *Cancer Letters* 2007; 254:165-177.
- Eissa A, Diamandis EP: Human tissue kallikreins as promiscuous modulators of homeostatic skin barrier functions. *Biological Chemistry* 2008; 389:669-680.
- Emami N, Diamandis EP: Human Kallikrein-related Peptidase 14 (KLK14) Is a New Activator Component of the KLK Proteolytic Cascade. *Journal of Biological Chemistry* 2008; 283:3031-3041.
- Emami N, Diamandis EP: New insights into the functional mechanisms and clinical applications of the kallikrein-related peptidase family. *Molecular Oncology* 2007; 1:269-287.
- Emami N, Diamandis EP: Potential role of multiple members of the kallikrein-related peptidase family of serine proteases in activating latent TGFbeta1 in semen. *Biological Chemistry* 2009; 391:85-95.
- Emami N, Scorilas A, Soosaipillai A, Earle T, Mullen B, Diamandis EP: Association between kallikrein-related peptidases (KLKs) and macroscopic indicators of semen analysis: their relation to sperm motility. *Biological Chemistry* 2009; 390:921-929.
- España F, Fink E, Sanchez-Cuenca J, Gilabert J, Estellés A, Witzgall K: Complexes of Tissue Kallikrein with Protein C Inhibitor in Human Semen and Urine. *European Journal of Biochemistry* 1995; 234:641-649.
- España F, Gilabert J, Estellés A, Romeu A, Aznar J, Cabo A: Functionally active protein C inhibitor/plasminogen activator inhibitor-3 (PCI/PAI-3) is secreted in seminal vesicles, occurs at high concentrations in human seminal plasma and complexes with prostate-specific antigen. *Thrombosis Research* 1991; 64:309-320.
- España F, Navarro S, Medina P, Zorio E, Estellés A: The Role of Protein C Inhibitor in Human Reproduction. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 2007; 33:041,045.
- Evans CM, Kim K, Tuvim MJ, Dickey BF: Mucus hypersecretion in asthma: causes and effects. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 2009; 15:4-11.
- Evans CM, Koo JS: Airway mucus: The good, the bad, the sticky. *Pharmacology & Therapeutics* 2009; 121:332-348.

- Fernandez IS, Standker L, Forssmann W-G, Gimenez-Gallego G, Romero A: Crystallization and preliminary crystallographic studies of human kallikrein 7, a serine protease of the multigene kallikrein family. *Acta Crystallographica Section F* 2007; 63:669-672.
- Fiedler: Enzymology of glandular kallikreins. In: Erdos EG, ed. Bradykinin, kallidin, and kallikrein. *Berlin, Heidelberg, New-York : Springer-Verlag* 1979:103-161.
- Forteza R, Casalino-Matsuda SM, Monzon ME, Fries E, Rugg MS, Milner CM, Day AJ: TSG-6 Potentiates the Antitissue Kallikrein Activity of Inter- α -inhibitor through Bikunin Release. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2007; 36:20-31.
- Frey E: Zusammenhänge zwischen Herzarbeit und Nierentätigkeit. *Arch Clin Kir* 1926; 142:663.
- Frey E, Kraut H: Ein neues Kreislaufhormon und seine Wirkung. *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 1928; 133:1.
- Fuchs S, Hollins A, Laue M, Schaefer U, Roemer K, Gumbleton M, Lehr C-M: Differentiation of human alveolar epithelial cells in primary culture: morphological characterization and synthesis of caveolin-1 and surfactant protein-C. *Cell and Tissue Research* 2003; 311:31-45.
- Fujisawa T, Velichko S, Thai P, Hung L-Y, Huang F, Wu R: Regulation of Airway MUC5AC Expression by IL-1B and IL-17A; the NF-KB Paradigm. *The Journal of Immunology* 2009; 183:6236-6243.
- Gan L, Lee I, Smith R, Argonza-Barrett R, Lei H, McCuaig J, Moss P, Paeper B, Wang K: Sequencing and expression analysis of the serine protease gene cluster located in chromosome 19q13 region. *Gene* 2000; 257:119-130.
- Gao L, Chao L, Chao J: A novel signaling pathway of tissue kallikrein in promoting keratinocyte migration: Activation of proteinase-activated receptor 1 and epidermal growth factor receptor. *Experimental Cell Research* 2009; 316:376-389.
- Geiger R, Stuckstedte U, Clausnitzer B, Fritz H: Progressive inhibition of human glandular (urinary) kallikrein by human-serum and identification of the progressive anti-kallikrein as alpha-1-antitrypsin (alpha-1-protease inhibitor). *Hoppe-Seylers Zeitschrift Fur Physiologische Chemie* 1981; 362:317-325.
- Ghio P, Cappia S, Selvaggi G, Novello S, Lausi P, Zecchina G, Papotti M, Borasio P, Scagliotti GV: Prognostic role of protease-activated receptors 1 and 4 in resected stage IB non-small-cell lung cancer. *Clinical Lung Cancer* 2006; 7:395-400.
- Giusti B, Serrati S, Margheri F, Papucci L, Rossi L, Poggi F, Magi A, Del Rosso A, Cinelli M, Guiducci S, Kahaleh B, Matucci-Cerinic M, Abbate R, Fibbi G, Del Rosso M: The antiangiogenic tissue kallikrein pattern of endothelial cells in systemic sclerosis. *Arthritis & Rheumatism* 2005; 52:3618-3628.
- Goettig P, Magdolen V, Brandstetter H: Natural and synthetic inhibitors of kallikrein-related peptidases (KLKs). *Biochimie* 2010; 92:1546-1567.
- Gomis-Rüth FX, Bayés Ál, Sotiropoulou G, Pampalakis G, Tsetsenis T, Villegas V, Avilés FX, Coll M: The Structure of Human Prokallikrein 6 Reveals a Novel Activation Mechanism for the Kallikrein Family. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277:27273-27281.
- Gooptu B, Ekeowa UI, Lomas DA: Mechanisms of emphysema in alpha1-antitrypsin deficiency: molecular and cellular insights. *European Respiratory Journal* 2009; 34:475-488.

- Gras D: Etudes des interactions entre les cellules épithéliales respiratoires humains normales et mucoviscidosiques et *Staphylococcus Aureus*, Reims Champagne-Ardenne, 2006.
- Gratio V, Walker F, Lehy T, Laburthe M, Darmoul D: Aberrant expression of proteinase-activated receptor 4 promotes colon cancer cell proliferation through a persistent signaling that involves Src and ErbB-2 kinase. *International Journal of Cancer* 2009; 124:1517-1525.
- Gratio Vr, Beaufort N, Seiz L, Maier J, Virca GD, Debela M, Grebenchtchikov N, Magdolen V, Darmoul D: Kallikrein-Related Peptidase 4: A New Activator of the Aberrantly Expressed Protease-Activated Receptor 1 in Colon Cancer Cells. *The American Journal of Pathology* 2010; 176:1452-1461.
- Grauer LS, Finlay JA, Mikolajczyk SD, Pusateri KD, Wolfert RL: Detection of human glandular kallikrein, hK2, as its precursor form and in complex with protease inhibitors in prostate carcinoma serum. *Journal of Andrology* 1998; 19:407-411.
- Guillon-Munos A, Oikonomopoulou K, Michel N, Smith CR, Petit-Courty A, Canepa S, Reverdiau P, Heuzé-Vourc'h N, Diamandis EP, Courty Y: Kallikrein-related Peptidase 12 Hydrolyzes Matricellular Proteins of the CCN Family and Modifies Interactions of CCN1 and CCN5 with Growth Factors. *Journal of Biological Chemistry* 2011; 286:25505-25518.
- Hansson L, Strömqvist M, Bäckman A, Wallbrandt P, Carlstein A, Egelrud T: Cloning, expression, and characterization of stratum corneum chymotryptic enzyme. A skin-specific human serine proteinase. *Journal of Biological Chemistry* 1994; 269:19420-19426.
- Harvey TJ, Hooper JD, Myers SA, Stephenson S-A, Ashworth LK, Clements JA: Tissue-specific Expression Patterns and Fine Mapping of the Human Kallikrein (KLK) Locus on Proximal 19q13.4. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275:37397-37406.
- He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW: Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998; 281:1509-1512.
- Hedstrom L: An Overview of Serine Proteases. *Current Protocols in Protein Science*: John Wiley & Sons, Inc., 2001.
- Hedstrom L: Serine Protease Mechanism and Specificity. *Chemical Reviews* 2002; 102:4501-4524.
- Heeb MJ, España F: alpha-2-Macroglobulin and C1-Inactivator are Plasma Inhibitors of Human Glandular Kallikrein. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 1998; 24:412-419.
- Henkhaus RS, Gerner EW, Ignatenko NA: Kallikrein 6 is a mediator of K-RAS-dependent migration of colon carcinoma cells. *Biological Chemistry* 2008; 389:757-764.
- Herr C, Shaykhiev R, Bals R: The role of cathelicidin and defensins in pulmonary inflammatory diseases. *Expert Opinion on Biological Therapy* 2007; 7:1449-1461.
- Hershberger PA, Vasquez AC, Kanterewicz B, Land S, Siegfried JM, Nichols M: Regulation of Endogenous Gene Expression in Human Non Small Cell Lung Cancer Cells by Estrogen Receptor Ligands. *Cancer Research* 2005; 65:1598-1605.
- Heuze-Vourc'h N, Ainciburu M, Planque C, Brillard-Bourdet M, Ott C, Jolivet-Reynaud C, Courty Y: Recombinant kallikrein expression: site-specific integration for hK6 production in human cells. *Biological Chemistry* 2006; 387:687-695.

- Heuzé-Vourc'h N, Planque C, Guyétant S, Coco C, Brillet B, Blechet C, Parent C, Briollais L, Reverdiau P, Jourdan M-L, Courty Y: High kallikrein-related peptidase 6 in non-small cell lung cancer cells: an indicator of tumour proliferation and poor prognosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2009; 13:4014-4022.
- Hirota CL, Moreau F, Iablokov V, Dicay M, Renaux B, Hollenberg MD, MacNaughton WK: Epidermal growth factor receptor transactivation is required for proteinase-activated receptor-2-induced COX-2 expression in intestinal epithelial cells. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 2012; 303:G111-G119.
- Holbourn K, Perbal B, Ravi Acharya K: Proteins on the catwalk: modelling the structural domains of the CCN family of proteins. *Journal of Cell Communication and Signaling* 2009; 3:25-41.
- Hollenberg MD, Oikonomopoulou K, Hansen KK, Saifeddine M, Ramachandran R, Diamandis EP: Kallikreins and proteinase-mediated signaling: proteinase-activated receptors (PARs) and the pathophysiology of inflammatory diseases and cancer. *Biological Chemistry* 2008; 389:643-651.
- Hollingsworth MA, Swanson BJ: Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nature Reviews Cancer* 2004; 4:45-60.
- Hsieh M-L, Charlesworth MC, Goodmanson M, Zhang S, Seay T, Klee GG, Tindall DJ, Young CYF: Expression of Human Prostate-specific Glandular Kallikrein Protein (hK2) in the Breast Cancer Cell Line T47-D. *Cancer Research* 1997; 57:2651-2656.
- Huang W, Zhong J, Wu L-Y, Yu L-F, Tian X-l, Zhang Y-F, Li B: Downregulation and CpG island hypermethylation of NES1/hK10 gene in the pathogenesis of human gastric cancer. *Cancer Letters* 2007; 251:78-85.
- Hunt LT, Dayhoff MO: A surprising new protein superfamily containing ovalbumin, antithrombin-III, and alpha1-proteinase inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1980; 95:864-871.
- Huntington JA, Read RJ, Carrell RW: Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature* 2000; 407:923-926.
- Hutchinson S, Luo L-Y, Yousef GM, Soosaipillai A, Diamandis EP: Purification of Human Kallikrein 6 from Biological Fluids and Identification of its Complex with alpha(1)-Antichymotrypsin. *Clinical Chemistry* 2003; 49:746-751.
- Ishibashi H, Suzuki T, Suzuki S, Niikawa H, Lu L, Miki Y, Moriya T, Hayashi S-i, Handa M, Kondo T, Sasano H: Progesterone Receptor in Non-Small Cell Lung Cancer-A Potent Prognostic Factor and Possible Target for Endocrine Therapy. *Cancer Research* 2005; 65:6450-6458.
- Iwata A, Maruyama M, Akagi T, Hashikawa T, Kanazawa I, Tsuji S, Nukina N: Alpha-synuclein degradation by serine protease neurosin: implication for pathogenesis of synucleinopathies. *Human Molecular Genetics* 2003; 12:2625-2635.
- Janku F, Stewart DJ, Kurzrock R: Targeted therapy in non-small-cell lung cancer[mdash]is it becoming a reality? *Nature Reviews Clinical Oncology* 2010; 7:401-414.
- Jarry A, Dorso L, Gratio Vr, Forgue-Lafitte M-E, Laburthe M, Laboisie CL, Darmoul D: PAR-2 activation increases human intestinal mucin secretion through EGFR transactivation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007; 364:689-694.

- Jeffery P, Li D: Airway mucosa: secretory cells, mucus and mucin genes. *European Respiratory Journal* 1997; 10:1655-1662.
- Johnson SK, Ramani VC, Hennings L, Haun RS: Kallikrein 7 enhances pancreatic cancer cell invasion by shedding E-cadherin. *Cancer* 2007; 109:1811-1820.
- Jonsson M, Linse S, Frohm B, Lundwall A, Malm J: Semenogelins I and II bind zinc and regulate the activity of prostate-specific antigen. *Biochemical Journal* 2005; 387:447-453.
- Kang Z, Jänne OA, Palvimo JJ: Coregulator Recruitment and Histone Modifications in Transcriptional Regulation by the Androgen Receptor. *Molecular Endocrinology* 2004; 18:2633-2648.
- Kang Z, Pirskanen A, Jänne OA, Palvimo JJ: Involvement of Proteasome in the Dynamic Assembly of the Androgen Receptor Transcription Complex. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277:48366-48371.
- Katz BA, Liu B, Barnes M, Springman EB: Crystal structure of recombinant human tissue kallikrein at 2.0 Å resolution. *Protein Science* 1998; 7:875-885.
- Kawao N, Nagataki M, Nagasawa K, Kubo S, Cushing K, Wada T, Sekiguchi F, Ichida S, Hollenberg MD, MacNaughton WK, Nishikawa H, Kawabata A: Signal Transduction for Proteinase-Activated Receptor-2-Triggered Prostaglandin E2 Formation in Human Lung Epithelial Cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2005; 315:576-589.
- Kim H, Scorilas A, Katsaros D, Yousef GM, Massobrio M, Fracchioli S, Piccinno R, Gordini G, Diamandis EP: Human kallikrein gene 5 (KLK5) expression is an indicator of poor prognosis in ovarian cancer. *Br J Cancer* 2001; 84:643-650.
- Kim J-H, Choi DS, Lee O-H, Oh S-H, Lippman SM, Lee H-Y: Antiangiogenic antitumor activities of IGFBP-3 are mediated by IGF-independent suppression of Erk1/2 activation and Egr-1-mediated transcriptional events. *Blood* 2011a; 118:2622-2631.
- Kim J-T, Song EY, Chung K-S, Kang MA, Kim JW, Kim SJ, Yeom YI, Kim JH, Kim KH, Lee HG: Up-regulation and clinical significance of serine protease kallikrein 6 in colon cancer. *Cancer* 2011b; 117:2608-2619.
- Kim T-M, Yim S-H, Lee J-S, Kwon M-S, Ryu J-W, Kang H-M, Fiegler H, Carter NP, Chung Y-J: Genome-Wide Screening of Genomic Alterations and Their Clinicopathologic Implications in Non-Small Cell Lung Cancers. *Clinical Cancer Research* 2005; 11:8235-8242.
- Kim W-Y, Kim M-J, Moon H, Yuan P, Kim J-S, Woo J-K, Zhang G, Suh Y-A, Feng L, Behrens C, Van Pelt CS, Kang H, Lee JJ, Hong W-K, Wistuba II, Lee H-Y: Differential Impacts of Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-3 (IGFBP-3) in Epithelial IGF-Induced Lung Cancer Development. *Endocrinology* 2011c; 152:2164-2173.
- Kishi T, Cloutier SM, Kundig C, Deperthes D, Diamandis EP: Activation and enzymatic characterization of recombinant human kallikrein 8. *Biological Chemistry* 2006; 387:723-731.
- Kishi T, Grass L, Soosaipillai A, Shimizu-Okabe C, Diamandis EP: Human Kallikrein 8: Immunoassay Development and Identification in Tissue Extracts and Biological Fluids. *Clinical Chemistry* 2003; 49:87-96.

- Glucky B, Mueller R, Vogt I, Teurich S, Hartenstein B, Breuhahn K, Flechtenmacher C, Angel P, Hess J: Kallikrein 6 Induces E-Cadherin Shedding and Promotes Cell Proliferation, Migration, and Invasion. *Cancer Research* 2007; 67:8198-8206.
- Komatsu N, Saijoh K, Toyama T, Ohka R, Otsuki N, Hussack G, Takehara K, Diamandis EP: Multiple tissue kallikrein mRNA and protein expression in normal skin and skin diseases. *British Journal of Dermatology* 2005; 153:274-281.
- Komatsu N, Takata M, Otsuki N, Ohka R, Amano O, Takehara K, Saijoh K: Elevated Stratum Corneum Hydrolytic Activity in Netherton Syndrome Suggests an Inhibitory Regulation of Desquamation by SPINK5-Derived Peptides. 2002; 118:436-443.
- Komatsu N, Takata M, Otsuki N, Toyama T, Ohka R, Takehara K, Saijoh K: Expression and Localization of Tissue Kallikrein mRNAs in Human Epidermis and Appendages. *Journal of Investigative Dermatology* 2003; 121:542-549.
- Korkmaz KS, Korkmaz CG, Pretlow TG, Saatcioglu F: Distinctly different gene structure of KLK4/KLK-L1/prostase/ARM1 compared with other members of the Kallikrein family: Intracellular localization, alternative cDNA forms, and regulation by multiple hormones. *DNA and Cell Biology* 2001; 20:435-445.
- Kraut H, Frey E, Werle E: Der Nachweis eines Kreislaufhormon in der Pankreasdrüse. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* 1930; 189:97-106.
- Kubota S, Takigawa M: CCN family proteins and angiogenesis: from embryo to adulthood. *Angiogenesis* 2007; 10:1-11.
- Kubota S, Takigawa M, Kwang WJ: Role of CCN2/CTGF/Hcs24 in Bone Growth. *International Review of Cytology: Academic Press*, 2007:1-41.
- Kular L, Pakradouni J, Kitabgi P, Laurent M, Martinerie C: The CCN family: A new class of inflammation modulators? *Biochimie* 2010; 93:377-388.
- Kulasingam V, Diamandis EP: Glucocorticoid receptor-mediated expression of kallikrein 10 in human breast cancer cell lines. *Biological Chemistry* 2007; 388:1113-1119.
- Kumar A, Goel AS, Hill TM, Mikolajczyk SD, Millar LS, Kuus-Reichel K, Saedi MS: Expression of Human Glandular Kallikrein, hK2, in Mammalian Cells. *Cancer Research* 1996; 56:5397-5402.
- Kumar A, Mikolajczyk SD, Goel AS, Millar LS, Saedi MS: Expression of Pro Form of Prostate-specific Antigen by Mammalian Cells and Its Conversion to Mature, Active Form by Human Kallikrein 2. *Cancer Research* 1997; 57:3111-3114.
- Kurlender L, Borgono C, Michael IP, Obiezu C, Elliott MB, Yousef GM, Diamandis EP: A survey of alternative transcripts of human tissue kallikrein genes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 2005; 1755:1-14.
- Kuzmanov U, Jiang N, Smith CR, Soosaipillai A, Diamandis EP: Differential N-glycosylation of Kallikrein 6 Derived from Ovarian Cancer Cells or the Central Nervous System. *Molecular & Cellular Proteomics* 2009; 8:791-798.
- Kuzmanov U, Smith CR, Batruch I, Soosaipillai A, Diamandis A, Diamandis EP: Separation of kallikrein 6 glycoprotein subpopulations in biological fluids by anion-exchange chromatography coupled to ELISA and identification by mass spectrometry. *Proteomics* 2012; 12:799-809.

- L.O. Hebb A, Bhan V, D. Wishart A, S. Moore C, S. Robertson G: Human Kallikrein 6 Cerebrospinal Levels are Elevated in Multiple Sclerosis. *Current Drug Discovery Technologies* 2010; 7:137-140.
- Lai J, Myers SA, Lawrence MG, Odorico DM, Clements JA: Direct Progesterone Receptor and Indirect Androgen Receptor Interactions with the Kallikrein-Related Peptidase 4 Gene Promoter in Breast and Prostate Cancer. *Molecular Cancer Research* 2009; 7:129-141.
- Landvik NE, Hart K, Skaug V, Stangeland LB, Haugen A, Zienolddiny S: A specific interleukin-1B haplotype correlates with high levels of IL1B mRNA in the lung and increased risk of non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis* 2009; 30:1186-1192.
- Lawrence MG, Lai J, Clements JA: Kallikreins on Steroids: Structure, Function, and Hormonal Regulation of Prostate-Specific Antigen and the Extended Kallikrein Locus. *Endocrine Reviews* 2010; 31:407-446.
- Le Faou A, Scemama O: Epidemiology of tobacco smoking. *Revue Des Maladies Respiratoires* 2005; 22:S27-S32.
- Leask A, Parapuram SK, Shi-Wen X, Abraham DJ: Connective tissue growth factor (CTGF, CCN2) gene regulation: a potent clinical bio-marker of fibroproliferative disease? *J Cell Commun Signal* 2009 Jun;3(2):89-94 doi: 101007/s12079-009-0037-7 Epub 2009 Jan 21 2009.
- Lee C-H, Hung H-W, Hung P-H, Shieh Y-S: Epidermal growth factor receptor regulates beta-catenin location, stability, and transcriptional activity in oral cancer. *Molecular Cancer* 2010; 9:64.
- Li B, Goyal J, Dhar S, Dimri G, Evron E, Sukumar S, Wazer DE, Band V: CpG Methylation as a Basis for Breast Tumor-specific Loss of NES1/Kallikrein 10 Expression. *Cancer Research* 2001; 61:8014-8021.
- Lickert H, Bauer A, Kemler R, Stappert J: Casein Kinase II Phosphorylation of E-cadherin Increases E-cadherin/B-Catenin Interaction and Strengthens Cell-Cell Adhesion. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275:5090-5095.
- Lilja H: A kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein. *The Journal of Clinical Investigation* 1985; 76:1899-1903.
- Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2 DDCT Method. *Methods* 2001; 25:402-408.
- Lövgren J, Airas K, Lilja H: Enzymatic action of human glandular kallikrein 2 (hK2). *European Journal of Biochemistry* 1999; 262:781-789.
- Lövgren J, Rajakoski K, Karp M, Lundwall Åk, Lilja H: Activation of the Zymogen Form of Prostate-Specific Antigen by Human Glandular Kallikrein 2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997; 238:549-555.
- Lu CY, Hsieh SY, Lu YJ, Wu CS, Chen LC, Lo SJ, Wu CT, Chou MY, Huang THM, Chang YS: Aberrant DNA Methylation Profile and Frequent Methylation of KLK10 and OXGR1 Genes in Hepatocellular Carcinoma. *Genes Chromosomes & Cancer* 2009; 48:1057-1068.
- Lundwall A: Characterization of the gene for prostate-specific antigen, a human glandular kallikrein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1989; 161:1151-1159.

- Lundwall Åk, Band V, Blaber M, Clements JA, Courty Y, Diamandis EP, Fritz H, Lilja H, Malm J, Maltais LJ, Yvonne Olsson A, Petraki C, Scorilas A, Sotiropoulou G, Stenman U-Hk, Stephan C, Talieri M, Yousef GM: A comprehensive nomenclature for serine proteases with homology to tissue kallikreins. *Biological Chemistry* 2006a; 387:637-641.
- Lundwall Åk, Clauss A, Olsson AY: Evolution of kallikrein-related peptidases in mammals and identification of a genetic locus encoding potential regulatory inhibitors. *Biological Chemistry* 2006b; 387:243-249.
- Luo L-Y, Grass L, Diamandis EP: Steroid hormone regulation of the human kallikrein 10 (KLK10) gene in cancer cell lines and functional characterization of the KLK10 gene promoter. *Clinica Chimica Acta* 2003; 337:115-126.
- Luo L-Y, Grass L, Howarth DJC, Thibault P, Ong H, Diamandis EP: Immunofluorometric Assay of Human Kallikrein 10 and Its Identification in Biological Fluids and Tissues. *Clinical Chemistry* 2001; 47:237-246.
- Luo L-Y, Shan SJC, Elliott MB, Soosaipillai A, Diamandis EP: Purification and Characterization of Human Kallikrein 11, a Candidate Prostate and Ovarian Cancer Biomarker, from Seminal Plasma. *Clinical Cancer Research* 2006; 12:742-750.
- Luo L, Herbrick J-A, Scherer SW, Beatty B, Squire J, Diamandis EP: Structural Characterization and Mapping of the Normal Epithelial Cell-Specific 1 Gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998; 247:580-586.
- Luo LY, Grass L, Diamandis EP: The normal epithelial cell-specific 1 (NES1) gene is up-regulated by steroid hormones in the breast carcinoma cell line BT-474. *Anticancer Research* 2000; 20:981-986.
- Luo LY, Jiang WP: Inhibition profiles of human tissue kallikreins by serine protease inhibitors. *Biological Chemistry* 2006; 387:813-816.
- Luo W, Lin SC: Axin: A master scaffold for multiple signaling pathways. *Neurosignals* 2004; 13:99-113.
- Maeda H, Yonou H, Yano K, Ishii G, Saito S, Ochiai A: Prostate-specific antigen enhances bioavailability of insulin-like growth factor by degrading insulin-like growth factor binding protein 5. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2009; 381:311-316.
- Magklara A, Grass L, Diamandis EP: Differential steroid hormone regulation of human glandular kallikrein (hK2) and prostate-specific antigen (PSA) in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Research and Treatment* 2000; 59:263-270.
- Magklara A, Mellati AA, Wasney GA, Little SP, Sotiropoulou G, Becker GW, Diamandis EP: Characterization of the enzymatic activity of human kallikrein 6: autoactivation, substrate specificity, and regulation by inhibitors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003; 307:948-955.
- Marquez-Garban DC, Mah V, Alavi M, Maresh EL, Chen H-W, Bagryanova L, Horvath S, Chia D, Garon E, Goodglick L, Pietras RJ: Progesterone and estrogen receptor expression and activity in human non-small cell lung cancer. *Steroids* 2011; 76:910-920.
- Massi D, Naldini A, Ardinghi C, Carraro F, Franchi A, Paglierani M, Tarantini F, Ketabchi S, Cirino G, Hollenberg MD, Geppetti P, Santucci M: Expression of protease-activated receptors 1 and 2 in melanocytic nevi and malignant melanoma. *Human Pathology* 2005; 36:676-685.

- Matsui H, Kimura A, Yamashiki N, Moriyama A, Kaya M, Yoshida I, Takagi N, Takahashi T: Molecular and Biochemical Characterization of a Serine Proteinase Predominantly Expressed in the Medulla Oblongata and Cerebellar White Matter of Mouse Brain. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275:11050-11057.
- Mattsson JM, Valmu L, Laakkonen P, Stenman UH, Koistinen H: Structural characterization and anti-angiogenic properties of prostate-specific antigen isoforms in seminal fluid. *Prostate* 2008; 68:945-954.
- Memari N, Jiang W, Diamandis EP, Luo L-Y: Enzymatic properties of human kallikrein-related peptidase 12 (KLK12). *Biological Chemistry* 2007; 388:427-435.
- Mendelsohn J, Baselga J: Status of Epidermal Growth Factor Receptor Antagonists in the Biology and Treatment of Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2003; 21:2787-2799.
- Ménez R, Michel S, Muller BH, Bossus M, Ducancel Fdr, Jolivet-Reynaud C, Stura EA: Crystal Structure of a Ternary Complex between Human Prostate-specific Antigen, Its Substrate Acyl Intermediate and an Activating Antibody. *Journal of Molecular Biology* 2008; 376:1021-1033.
- Meyer-Hoffert U, Wu Z, Kantyka T, Fischer J, Latendorf T, Hansmann B, Bartels J, He Y, Gläser R, Schröder J-M: Isolation of SPINK6 in Human Skin. *Journal of Biological Chemistry* 2010; 285:32174-32181.
- Miao RQ, Chen V, Chao L, Chao J: Structural elements of kallistatin required for inhibition of angiogenesis. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 2003; 284:C1604-C1613.
- Michael IP, Pampalakis G, Mikolajczyk SD, Malm J, Sotiropoulou G, Diamandis EP: Human Tissue Kallikrein 5 Is a Member of a Proteolytic Cascade Pathway Involved in Seminal Clot Liquefaction and Potentially in Prostate Cancer Progression. *Journal of Biological Chemistry* 2006; 281:12743-12750.
- Michael IP, Sotiropoulou G, Pampalakis G, Magklara A, Ghosh M, Wasney G, Diamandis EP: Biochemical and Enzymatic Characterization of Human Kallikrein 5 (hK5), a Novel Serine Protease Potentially Involved in Cancer Progression. *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280:14628-14635.
- Miki Y, Suzuki T, Abe K, Suzuki S, Niikawa H, Iida S, Hata S, Akahira J-i, Mori K, Evans DB, Kondo T, Yamada-Okabe H, Sasano H: Intratumoral Localization of Aromatase and Interaction between Stromal and Parenchymal Cells in the Non-Small Cell Lung Carcinoma Microenvironment. *Cancer Research* 2010; 70:6659-6669.
- Mikkonen L, Pihlajamaa P, Sahu B, Zhang F-P, Jänne OA: Androgen receptor and androgen-dependent gene expression in lung. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2009; 317:14-24.
- Mikolajczyk SD, Catalona WJ, Evans CL, Linton HJ, Millar LS, Marker KM, Katir D, Amirkhan A, Rittenhouse HG: Proenzyme Forms of Prostate-Specific Antigen in Serum Improve the Detection of Prostate Cancer. *Clinical Chemistry* 2004; 50:1017-1025.
- Mikolajczyk SD, Millar LS, Kumar A, Saedi MS: Human glandular kallikrein, hK2, shows arginine-restricted specificity and forms complexes with plasma protease inhibitors. *The Prostate* 1998; 34:44-50.
- Mikolajczyk SD, Millar LS, Wang TJ, Rittenhouse HG, Wolfert RL, Marks LS, Song W, Wheeler TM, Slawin KM: "BPSA" a specific molecular form of free prostate-specific antigen, is found

- predominantly in the transition zone of patients with nodular benign prostatic hyperplasia. *Urology* 2000; 55:41-45.
- Mize GJ, Wang W, Takayama TK: Prostate-Specific Kallikreins-2 and -4 Enhance the Proliferation of DU-145 Prostate Cancer Cells through Protease-Activated Receptors-1 and -2. *Molecular Cancer Research* 2008; 6:1043-1051.
- Moriyuki K, Sekiguchi F, Matsubara K, Nishikawa H, Kawabata A: Proteinase-Activated Receptor-2-Triggered Prostaglandin E(2) Release, but Not Cyclooxygenase-2 Upregulation, Requires Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt/Nuclear Factor-kappa B Pathway in Human Alveolar Epithelial Cells. *Journal of Pharmacological Sciences* 2009; 111:269-275.
- Morris BJ: HGK-1 - A kallikrein gene expressed in human prostate. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 1989; 16:345-351.
- Movat H: The plasma kallikrein-kinin and its interrelationship with other components of blood. In : Erdos EG, ed. Bradykinin, kallikrein, and kallikrein. *Berlin, Heidelberg, New-York : Springer-Verlag* 1979:1-89.
- Mukai S, Fukushima T, Naka D, Tanaka H, Osada Y, Kataoka H: Activation of hepatocyte growth factor activator zymogen (pro-HGFA) by human kallikrein 1-related peptidases. *FEBS Journal* 2008; 275:1003-1017.
- Myers SA, Clements JA: Kallikrein 4 (KLK4), A New Member of the Human Kallikrein Gene Family Is Up-Regulated By Estrogen and Progesterone in the Human Endometrial Cancer Cell Line, KLE. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2001; 86:2323.
- Nagahara H, Mimori K, Utsunomiya T, Barnard GF, Ohira M, Hirakawa K, Mori M: Clinicopathologic and Biological Significance of Kallikrein 6 Overexpression in Human Gastric Cancer. *Clinical Cancer Research* 2005; 11:6800-6806.
- Nelson PS, Gan L, Ferguson C, Moss P, Gelinas R, Hood L, Wang K: Molecular cloning and characterization of prostase, an androgen-regulated serine protease with prostate-restricted expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1999; 96:3114-3119.
- Netea MG, Simon A, van de Veerdonk F, Kullberg B-J, Van der Meer JWM, Joosten LAB: IL-1beta Processing in Host Defense: Beyond the Inflammasomes. *PLoS Pathogens* 2010; 6:e1000661.
- Ni X, Zhang W, Huang KC, Wang Y, Ng SK, Mok SC, Berkowitz RS, Ng SW: Characterisation of human kallikrein 6/protease M expression in ovarian cancer. *British Journal of Cancer* 2004; 91:725-731.
- Nicholas B, Skipp P, Mould R, Rennard S, Davies DE, O'Connor CD, Djukanović R: Shotgun proteomic analysis of human-induced sputum. *Proteomics* 2006; 6:4390-4401.
- Niikawa H, Suzuki T, Miki Y, Suzuki S, Nagasaki S, Akahira J, Honma S, Evans DB, Hayashi S-i, Kondo T, Sasano H: Intratumoral Estrogens and Estrogen Receptors in Human Non-Small Cell Lung Carcinoma. *Clinical Cancer Research* 2008; 14:4417-4426.
- Nishibori M, Mori S, Takahashi HK: Physiology and Pathophysiology of Proteinase-Activated Receptors (PARs): PAR-2-Mediated Proliferation of Colon Cancer Cell. *Journal of Pharmacological Sciences* 2005; 97:25-30.

- Nishinaka T, Yabe-Nishimura C: EGF receptor-ERK pathway is the major signaling pathway that mediates upregulation of aldose reductase expression under oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 2001; 31:205-216.
- Nyati MK, Morgan MA, Feng FY, Lawrence TS: Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy. *Nature Reviews Cancer* 2006; 6:876-885.
- NylanderLundqvist E, Egelrud T: Formation of active IL-1 beta from pro-IL-1 beta catalyzed by stratum corneum chymotryptic enzyme in vitro. *Acta Dermato-Venereologica* 1997; 77:203-206.
- Obiezu CV, Michael IP, Levesque MA, Diamandis EP: Human kallikrein 4: enzymatic activity, inhibition, and degradation of extracellular matrix proteins. *Biological Chemistry* 2006; 387:749-759.
- Oikonomopoulou K, Batruch I, Smith CR, Soosaipillai A, Diamandis EP, Hollenberg MD: Functional proteomics of kallikrein-related peptidases in ovarian cancer ascites fluid. *Biological Chemistry* 2010a; 391:381-390.
- Oikonomopoulou K, Diamandis EP, Hollenberg MD: Kallikrein-related peptidases: proteolysis and signaling in cancer, the new frontier. *Biological Chemistry* 2010b; 391:299-310.
- Oikonomopoulou K, Hansen KK, Saifeddine M, Tea I, Blaber M, Blaber SI, Scarisbrick I, Andrade-Gordon P, Cottrell GS, Bunnett NW, Diamandis EP, Hollenberg MD: Proteinase-activated Receptors, Targets for Kallikrein Signaling. *Journal of Biological Chemistry* 2006a; 281:32095-32112.
- Oikonomopoulou K, Hansen KK, Saifeddine M, Vergnolle N, Tea I, Blaber M, Blaber SI, Scarisbrick I, Diamandis EP, Hollenberg MD: Kallikrein-mediated cell signalling: targeting proteinase-activated receptors (PARs). *Biological Chemistry* 2006b; 387:817-824.
- Oikonomopoulou K, Hansen Kristina K, Baruch A, Hollenberg Morley D, Diamandis Eleftherios P: Immunofluorometric activity-based probe analysis of active KLK6 in biological fluids. *Biological Chemistry*, 2008:747.
- Olsson AY, Bjartell A, Lilja H, Lundwall Å: Expression of prostate-specific antigen (PSA) and human glandular kallikrein 2 (hK2) in ileum and other extraprostatic tissues. *International Journal of Cancer* 2005; 113:290-297.
- Paliouras M, Borgono C, Diamandis EP: Human tissue kallikreins: The cancer biomarker family. *Cancer Letters* 2007; 249:61-79.
- Paliouras M, Diamandis E: Coordinated steroid hormone-dependent and independent expression of multiple kallikreins in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Research and Treatment* 2007; 102:7-18.
- Paliouras M, Diamandis EP: An AKT activity threshold regulates androgen-dependent and androgen-independent PSA expression in prostate cancer cell lines. *Biological Chemistry* 2008a; 389:773-780.
- Paliouras M, Diamandis EP: Androgens act synergistically to enhance estrogen-induced upregulation of human tissue kallikreins 10, 11, and 14 in breast cancer cells via a membrane bound androgen receptor. *Molecular Oncology* 2008b; 1:413-424.
- Paliouras M, Diamandis EP: Intracellular signaling pathways regulate hormone-dependent kallikrein gene expression. *Tumor Biology* 2008c; 29:63-75.
- Paliouras M, Diamandis EP: The kallikrein world: an update on the human tissue kallikreins. *Biological Chemistry* 2006; 387:643-652.

- Pallis AG, Karamouzis MV, Konstantinopoulos PA, Papavassiliou AG: Molecular networks in respiratory epithelium carcinomas. *Cancer Letters* 2010; 295:1-6.
- Pampalakis G, Diamandis EP, Sotiropoulou G: The epigenetic basis for the aberrant expression of kallikreins in human cancers. *Biological Chemistry* 2006; 387:795-799.
- Pampalakis G, Prosnikli E, Agalioti T, Vlahou A, Zoumpourlis V, Sotiropoulou G: A Tumor-Protective Role for Human Kallikrein-Related Peptidase 6 in Breast Cancer Mediated by Inhibition of Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Cancer Research* 2009; 69:3779-3787.
- Pampalakis G, Sotiropoulou G: Multiple mechanisms underlie the aberrant expression of the human kallikrein 6 gene in breast cancer. *Biological Chemistry* 2006; 387:773-782.
- Perez-Gil Js, Weaver TE: Pulmonary Surfactant Pathophysiology: Current Models and Open Questions. *Physiology* 2010; 25:132-141.
- Petersen I: The Morphological and Molecular Diagnosis of Lung Cancer. *Dtsch Arztebl International* 2011; 108:525-531.
- Petraki CD, Karavana VN, Diamandis EP: Human Kallikrein 13 Expression in Normal Tissues: An Immunohistochemical Study. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2003; 51:493-501.
- Petraki CD, Karavana VN, Luo L-Y, Diamandis EP: Human Kallikrein 10 Expression in Normal Tissues by Immunohistochemistry. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2002; 50:1247-1261.
- Petraki CD, Karavana VN, Skoufogiannis PT, Little SP, Howarth DJC, Yousef GM, Diamandis EP: The Spectrum of Human Kallikrein 6 (Zyme/Protease M/Neurosin) Expression in Human Tissues as Assessed by Immunohistochemistry. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2001; 49:1431-1441.
- Petraki CD, Papanastasiou PA, Karavana VN, Diamandis EP: Cellular distribution of human tissue kallikreins: immunohistochemical localization. *Biological Chemistry* 2006; 387:653-663.
- Planque C, Aïnciburu M, Heuzé-Vourc'h N, Régina S, de Monte MI, Courty Y: Expression of the human kallikrein genes 10 (KLK10) and 11 (KLK11) in cancerous and non-cancerous lung tissues. *Biological Chemistry* 2006; 387:783-788.
- Planque C, Bléchet C, Ayadi-Kaddour A, Heuzé-Vourc'h N, Dumont P, Guyétant S, Diamandis EP, El Mezni F, Courty Y: Quantitative RT-PCR analysis and immunohistochemical localization of the kallikrein-related peptidases 13 and 14 in lung. *Biological Chemistry* 2008a; 389:781-786.
- Planque C, Choi Y-H, Guyétant S, Heuze-Vourc'h N, Briollais L, Courty Y: Alternative Splicing Variant of Kallikrein-Related Peptidase 8 as an Independent Predictor of Unfavorable Prognosis in Lung Cancer. *Clinical Chemistry* 2010; 56:987-997.
- Planque C, de Monte M, Guyétant S, Rollin J, Desmazes C, Panel V, Lemarié E, Courty Y: KLK5 and KLK7, two members of the human tissue kallikrein family, are differentially expressed in lung cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005; 329:1260-1266.
- Planque C, Li L, Zheng Y, Soosaipillai A, Reckamp K, Chia D, Diamandis EP, Goodglick L: A Multiparametric Serum Kallikrein Panel for Diagnosis of Non-Small Cell Lung Carcinoma. *Clinical Cancer Research* 2008b; 14:1355-1362.

- Poblete MT, Garces G, Figueroa CD, Bhoola KD: Localization of immunoreactive tissue kallikrein in the seromucous glands of the human and guinea-pig respiratory tree. *Histochemical Journal* 1993; 25:834-839.
- Potempa J, Korzus E, Travis J: The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. *Journal of Biological Chemistry* 1994; 269:15957-15960.
- Pribram H, Hernheiser G: Zur Kenntnis der dialysierbaren Bestandteile des Menschenharnes. *Biochem Z* 1920; 111:30.
- Proud D, Vio CP: Localization of immunoreactive tissue kallikrein in human trachea. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 1993; 8:16-19.
- Radloff DR, Wakeman TP, Feng J, Schilling S, Seto E, Wang X-F: Trefoil factor 1 acts to suppress senescence induced by oncogene activation during the cellular transformation process. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011; 108:6591-6596.
- Ramsay AJ, Dong Y, Hunt ML, Linn M, Samaratinga H, Clements JA, Hooper JD: Kallikrein-related Peptidase 4 (KLK4) Initiates Intracellular Signaling via Protease-activated Receptors (PARs). *Journal of Biological Chemistry* 2008; 283:12293-12304.
- Rawlings ND, Morton FR, Barrett AJ: MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research* 2006; 34:D270-D272.
- Réhault S, Monget P, Mazerbourg S, Tremblay R, Gutman N, Gauthier F, Moreau T: Insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) as potential physiological substrates for human kallikreins hK2 and hK3. *European Journal of Biochemistry* 2001; 268:2960-2968.
- Reynolds SD, Malkinson AM: Clara cell: Progenitor for the bronchiolar epithelium. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2009; 42:1-4.
- Riegman PHJ, Klaassen P, van der Korput JAGM, Romijn JC, Trapman J: Molecular cloning and characterization of novel prostate antigen cDNA's. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1988; 155:181-188.
- Riegman PHJ, Vlietstra RJ, van der Korput JAGM, Brinkmann AO, Trapman J: The Promoter of the Prostate-Specific Antigen Gene Contains a Functional Androgen Responsive Element. *Molecular Endocrinology* 1991; 5:1921-1930.
- Rocha E, Silva M, Beraldo W, G R: Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *American Journal of Physiology* 1949; 156:261-273.
- Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, Castillejo JA, Barrios M, Andreu EJ, Prosper F, Heiniger A, Torres A: The normal epithelial cell-specific 1 (NES1) gene, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 19q13.3-4, is downregulated by hypermethylation in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2003; 18:362-365.
- Ryu O, Hu JCC, Yamakoshi Y, Villemain JL, Cao X, Zhang C, Bartlett JD, Simmer JP: Porcine kallikrein-4 activation, glycosylation, activity, and expression in prokaryotic and eukaryotic hosts. *European Journal of Oral Sciences* 2002; 110:358-365.

- Sainz I, Pixley R, Colman R: Fifty years of research on the plasma kallikrein-kinin system: from protein structure and function to cell biology and in-vivo pathophysiology. *Trombosis and haemostasis* 2007; 98:77-83.
- Sanchez-Hernandez PE, Ramirez-Dueñas MG, Albarran-Somoza B, García-Iglesias T, del Toro-Arreola A, Franco-Topete R, Daneri-Navarro A: Protease-activated receptor-2 (PAR-2) in cervical cancer proliferation. *Gynecologic Oncology* 2008; 108:19-26.
- Sanders HR, Albitar M: Somatic mutations of signaling genes in non-small-cell lung cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2010; 203:7-15.
- Sano A, Sangai T, Maeda H, Nakamura M, Hasebe T, Ochiai A: Kallikrein 11 expressed in human breast cancer cells releases insulin-like growth factor through degradation of IGFBP-3. *International Journal of Oncology* 2007; 30:1493-1498.
- Santibañez JF, Quintanilla M, Bernabeu C: TGF-beta/TGF-beta receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clinical Science* 2011; 121:233-251.
- Sasaki H, Kawano O, Endo K, Suzuki E, Haneda H, Yukiue H, Kobayashi Y, Yano M, Fujii Y: Decreased Kallikrein 11 Messenger RNA Expression in Lung Cancer. *Clinical Lung Cancer* 2006; 8:45-48.
- Scarisbrick IA, Epstein B, Cloud BA, Yoon H, Wu J, Renner DN, Blaber SI, Blaber M, Vandell AG, Bryson AL: Functional Role of Kallikrein 6 in Regulating Immune Cell Survival. *PLoS ONE* 2011; 6:e18376.
- Schachter M: Kallikreins (kininogenases)--a group of serine proteases with bioregulatory actions. *Pharmacological Reviews* 1979; 31:1-17.
- Schuur ER, Henderson GA, Kmetec LA, Miller JD, Lamparski HG, Henderson DR: Prostate-specific Antigen Expression Is Regulated by an Upstream Enhancer. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271:7043-7051.
- Seiz L, Kotzsch M, Grebenchtchikov NI, Geurts-Moespot AJ, Fuessel S, Goettig P, Gkazepis A, Wirth MP, Schmitt M, Lossnitzer A, Sweep FCGJ, Magdolen V: Polyclonal antibodies against kallikrein-related peptidase 4 (KLK4): immunohistochemical assessment of KLK4 expression in healthy tissues and prostate cancer. *Biological Chemistry* 2010; 391:391-401.
- Sensabaugh GF, Blake ET: Seminal plasma-protein P-30-simplified purification and evidence for identify with prostate specific antigen. *Journal of Urology* 1990; 144:1523-1526.
- Shan J-D, Porvari K, Ruukonen M, Karhu A, Launonen V, Hedberg P, Oikarinen J, Vihko P: Steroid-Involved Transcriptional Regulation of Human Genes Encoding Prostatic Acid Phosphatase, Prostate-Specific Antigen, and Prostate-Specific Glandular Kallikrein. *Endocrinology* 1997; 138:3764-3770.
- Shang Y, Myers M, Brown M: Formation of the Androgen Receptor Transcription Complex. *Molecular Cell* 2002; 9:601-610.
- Shaw JLV, Diamandis EP: Distribution of 15 Human Kallikreins in Tissues and Biological Fluids. *Clinical Chemistry* 2007; 53:1423-1432.
- Shaw JLV, Diamandis EP: Regulation of human tissue kallikrein-related peptidase expression by steroid hormones in 32 cell lines. *Biological Chemistry* 2008; 389:1409-1419.

- Shaw JLV, Petraki C, Watson C, Bocking A, Diamandis EP: Role of tissue kallikrein-related peptidases in cervical mucus remodeling and host defense. *Biological Chemistry* 2008; 389:1513-1522.
- Sher Y-P, Chou C-C, Chou R-H, Wu H-M, Wayne Chang W-S, Chen C-H, Yang P-C, Wu C-W, Yu C-L, Peck K: Human Kallikrein 8 Protease Confers a Favorable Clinical Outcome in Non Small Cell Lung Cancer by Suppressing Tumor Cell Invasiveness. *Cancer Research* 2006; 66:11763-11770.
- Shimizu C, Yoshida S, Shibata M, Kato K, Momota Y, Matsumoto K, Shiosaka T, Midorikawa R, Kamachi T, Kawabe A, Shiosaka S: Characterization of Recombinant and Brain Neuropsin, a Plasticity-related Serine Protease. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273:11189-11196.
- Shinoda Y, Kozaki K-i, Imoto I, Obara W, Tsuda H, Mizutani Y, Shuin T, Fujioka T, Miki T, Inazawa J: Association of KLK5 overexpression with invasiveness of urinary bladder carcinoma cells. *Cancer Science* 2007; 98:1078-1086.
- Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A: The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1999; 96:5522-5527.
- Sidiropoulos M, Pampalakis G, Sotiropoulou G, Katsaros D, Diamandis EP: Downregulation of human kallikrein 10 (KLK10/NES1) by CpG island hypermethylation in breast, ovarian and prostate cancers. *Tumor Biology* 2005; 26:324-336.
- Siegfried JM, Hershberger PA, Stabile LP: Estrogen Receptor Signaling in Lung Cancer. *Seminars in Oncology* 2009; 36:524-531.
- Simmer JP, Hu JCC: Expression, Structure, and Function of Enamel Proteinases. *Connective Tissue Research* 2002; 43:441-449.
- Singh J, Naran A, Misso NL, Rigby PJ, Thompson PJ, Bhoola KD: Expression of kallikrein-related peptidases (KRP/hK5, 7, 6, 8) in subtypes of human lung carcinoma. *International Immunopharmacology* 2008; 8:300-306.
- Sinha S, Watorek W, Karr S, Giles J, Bode W, Travis J: Primary structure of human neutrophil elastase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1987; 84:2228-2232.
- Skytt A, Stromqvist M, Egelrud T: Primary Substrate Specificity of Recombinant Human Stratum Corneum Chymotryptic Enzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1995; 211:586-589.
- Soh UJK, Dores MR, Chen B, Trejo J: Signal transduction by protease-activated receptors. *British Journal of Pharmacology* 2011; 160:191-203.
- Sotiropoulou G, Pampalakis G: Kallikrein-related peptidases: bridges between immune functions and extracellular matrix degradation. *Biological Chemistry* 2010; 391:321-331.
- Sotiropoulou G, Pampalakis G, Diamandis EP: Functional Roles of Human Kallikrein-related Peptidases. *Journal of Biological Chemistry* 2009; 284:32989-32994.
- Sotiropoulou G, Rogakos V, Tsetsenis T, Pampalakis G, Zafiropoulos N, Simillides G, Yiotakis A, Diamandis EP: Emerging interest in the kallikrein gene family for understanding and diagnosing cancer. *Oncology Research* 2003; 13:381-391.

- Stabile LP, Davis ALG, Gubish CT, Hopkins TM, Luketich JD, Christie N, Finkelstein S, Siegfried JM: Human Non-Small Cell Lung Tumors and Cells Derived from Normal Lung Express Both Estrogen Receptor alpha and beta and Show Biological Responses to Estrogen. *Cancer Research* 2002; 62:2141-2150.
- Stefansson K, Brattsand M, Ny A, Glas B, Egelrud T: Kallikrein-related peptidase 14 may be a major contributor to trypsin-like proteolytic activity in human stratum corneum. *Biological Chemistry* 2006; 387:761-768.
- Stefansson K, Brattsand M, Roosterman D, Kempkes C, Bocheva G, Steinhoff M, Egelrud T: Activation of Proteinase-Activated Receptor-2 by Human Kallikrein-Related Peptidases. *Journal of Investigative Dermatology* 2007; 128:18-25.
- Stenman U-Hk, Leinonen J, Alfthan H, Rannikko S, Tuhkanen K, Alfthan O: A Complex between Prostate-specific Antigen and alpha1-Antichymotrypsin Is the Major Form of Prostate-specific Antigen in Serum of Patients with Prostatic Cancer: Assay of the Complex Improves Clinical Sensitivity for Cancer. *Cancer Research* 1991; 51:222-226.
- Stephenson S-A, Verity K, Ashworth LK, Clements JA: Localization of a New Prostate-specific Antigen-related Serine Protease Gene, KLK4, Is Evidence for an Expanded Human Kallikrein Gene Family Cluster on Chromosome 19q13.3-13.4. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274:23210-23214.
- Subramanian J, Govindan R: Lung Cancer in Never Smokers: A Review. *Journal of Clinical Oncology* 2007; 25:561-570.
- Sun JD, Linden KG: Netherton syndrome: A case report and review of the literature. *International Journal of Dermatology* 2006; 45:693-697.
- Sun S, Schiller JH, Gazdar AF: Lung cancer in never smokers : a different disease. *Nature Reviews Cancer* 2007; 7:778-790.
- Swift GH, Dagorn JC, Ashley PL, Cummings SW, MacDonald RJ: Rat pancreatic kallikrein mRNA: nucleotide sequence and amino acid sequence of the encoded preproenzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1982; 79:7263-7267.
- Taddei ML, Chiarugi P, Cirri P, Buricchi F, Fiaschi T, Giannoni E, Talini D, Cozzi G, Formigli L, Raugei G, Ramponi G: Beta-Catenin Interacts with Low-Molecular-Weight Protein Tyrosine Phosphatase Leading to Cadherin-mediated Cell-Cell Adhesion Increase. *Cancer Research* 2002; 62:6489-6499.
- Takada Y, Skidgel RA, Erdos EG: Purification of human urinary prokallikrein - Identification of the site of activation by the metalloproteinase thermolysin. *Biochemical Journal* 1985; 232:851-858.
- Takayama TK, Carter CA, Deng T: Activation of Prostate-Specific Antigen Precursor (pro-PSA) by Prostasin, a Novel Human Prostatic Serine Protease Identified by Degenerate PCR. *Biochemistry* 2001a; 40:1679-1687.
- Takayama TK, Fujikawa K, Davie EW: Characterization of the Precursor of Prostate-specific Antigen. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272:21582-21588.
- Takayama TK, McMullen BA, Nelson PS, Matsumura M, Fujikawa K: Characterization of hK4 (Prostase), a Prostate-Specific Serine Protease: Activation of the Precursor of Prostate Specific

- Antigen (pro-PSA) and Single-Chain Urokinase-Type Plasminogen Activator and Degradation of Prostatic Acid Phosphatase. *Biochemistry* 2001b; 40:15341-15348.
- Tatebe H, Watanabe Y, Kasai T, Mizuno T, Nakagawa M, Tanaka M, Tokuda T: Extracellular neurosin degrades alpha-synuclein in cultured cells. *Neuroscience Research* 2010; 67:341-346.
- Teclé T, Tripathi S, Hartshorn KL: Review: Defensins and cathelicidins in lung immunity. *Innate Immunity* 2010; 16:151-159.
- Tetsu O, McCormick F: Beta-Catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999; 398:422-426.
- Thai P, Loukoianov A, Wachi S, Wu R: Regulation of Airway Mucin Gene Expression. *Annual Review of Physiology* 2008; 70:405-429.
- Thornton DJ, Rousseau K, McGuckin MA: Structure and Function of the Polymeric Mucins in Airways Mucus. *Annual Review of Physiology* 2008; 70:459-486.
- Tian X, Liu Z, Niu B, Zhang J, Kui Tan T, Lee SR, Zhao Y, Harris DCH, Zheng G: E-Cadherin/beta-Catenin Complex and the Epithelial Barrier. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011; 2011.
- Toonkel RL, Borczuk AC, Powell CA: TGF-beta Signaling Pathway in Lung Adenocarcinoma Invasion. *Journal of Thoracic Oncology* 2010; 5:153-157.
- Toyooka S, Mitsudomi T, Soh J, Aokage K, Yamane M, Oto T, Kiura K, Miyoshi S: Molecular oncology of lung cancer. *General Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2011; 59:527-537.
- Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger K, Yatabe Y, Powell CA, Beer D, Riely G, Garg K, Austin JHM, Rusch VW, Hirsch FR, Jett J, Yang P-C, Gould M: International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society: International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma: Executive Summary. *Proceedings of the American Thoracic Society*; 8:381-385.
- Tschesche H, Mair G, Godec G: The primary structure of porcine glandular kallikreins. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1979; 120A:245-260.
- Tye CE, Pham CT, Simmer JP, Bartlett JD: DPPI May Activate KLK4 during Enamel Formation. *Journal of Dental Research* 2009; 88:323-327.
- Van de Veerdonk FL, Netea MG, Dinarello CA, Joosten LAB: Inflammasome activation and IL-1 β and IL-18 processing during infection. *Trends in Immunology* 2011; 32:110-116.
- Verma MK, Miki Y, Sasano H: Aromatase in human lung carcinoma. *Steroids* 2011; 76:759-764.
- Vivanco I, Sawyers CL: The phosphatidylinositol 3-Kinase-AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer* 2002; 2:489-501.
- von Haussen J, Koczulla R, Shaykhiiev R, Herr C, Pinkenburg O, Reimer D, Wiewrodt R, Biesterfeld S, Aigner A, Czubyko F, Bals R: The host defence peptide LL-37/hCAP-18 is a growth factor for lung cancer cells. *Lung Cancer* 2008; 59:12-23.
- Wakelee HA, Chang ET, Gomez SL, Keegan TH, Feskanich D, Clarke CA, Holmberg L, Yong LC, Kolonel LN, Gould MK, West DW: Lung Cancer Incidence in Never Smokers. *Journal of Clinical Oncology* 2007; 25:472-478.

- Watt KW, Lee PJ, M'Timkulu T, Chan WP, Loo R: Human prostate-specific antigen: structural and functional similarity with serine proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1986; 83:3166-3170.
- Waugh DJJ, Wilson C: The Interleukin-8 Pathway in Cancer. *Clinical Cancer Research* 2008; 14:6735-6741.
- Weather R, Young B, Heath JW: *Histologie Fonctionnelle*, 2004.
- Webster ME, Pierce JV: Studies on plasma kallikrein and its relationship to plasmin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1960; 130:484-491.
- Werle E, Fiedler F: Kallikreins. *Biochemical Journal* 1969; 115:4P-6P.
- Werle E, Gotze W, Keppler A: Über die Wirkung des kallikreins aus dem isolierten Darm und über eine neue darmkontrahierende Substanz. *Biochemical Journal* 1937; 289:217-233.
- White NMA, Chow TFF, Mejia-Guerrero S, Diamandis M, Rofael Y, Faragalla H, Mankaruous M, Gabriel M, Girgis A, Yousef GM: Three dysregulated miRNAs control kallikrein 10 expression and cell proliferation in ovarian cancer. *British Journal of Cancer* 2010; 102:1244-1253.
- Wong AP, Keating A, Waddell TK: Airway regeneration: the role of the Clara cell secretory protein and the cells that express it. *Cytotherapy* 2009; 11:676-687.
- Wu WKK, Wang G, Coffelt SB, Betancourt AM, Lee CW, Fan D, Wu K, Yu J, Sung JJY, Cho CH: Emerging roles of the host defense peptide LL-37 in human cancer and its potential therapeutic applications. *International Journal of Cancer* 2010; 127:1741-1747.
- Xi Z, Klock TI, Korkmaz K, Kurys P, Elbi C, Risberg Br, Danielsen Hv, Loda M, Saatcioglu F: Kallikrein 4 is a Predominantly Nuclear Protein and Is Overexpressed in Prostate Cancer. *Cancer Research* 2004; 64:2365-2370.
- Xu N, Wang Y-s, Pan W-b, Xiao B, Wen Y-j, Chen X-c, Chen L-j, Deng H-x, You J, Kan B, Fu Af, Li D, Zhao X, Wei Y-q: Human alpha defensin-1 inhibits growth of human lung adenocarcinoma xenograft in nude mice. *Molecular Cancer Therapeutics* 2008; 7:1588-1597.
- Xu P, Derynck R: Direct Activation of TACE-Mediated Ectodomain Shedding by p38 MAP Kinase Regulates EGF Receptor-Dependent Cell Proliferation. *Molecular Cell* 2010; 37:551-566.
- Yada K, Shibata K, Matsumoto T, Ohta M, Yokoyama S, Kitano S: Protease-activated receptor-2 regulates cell proliferation and enhances cyclooxygenase-2 mRNA expression in human pancreatic cancer cells. *Journal of Surgical Oncology* 2005; 89:79-85.
- Yagy T, Kobayashi H, Matsuzaki H, Wakahara K, Kondo T, Kurita N, Sekino H, Inagaki K: Enhanced spontaneous metastasis in bikunin-deficient mice. *International Journal of Cancer* 2006; 118:2322-2328.
- Yamasaki K, Schaubert Jr, Coda A, Lin H, Dorschner RA, Schechter NM, Bonnart C, Descargues P, Hovnanian A, Gallo RL: Kallikrein-mediated proteolysis regulates the antimicrobial effects of cathelicidins in skin. *The FASEB Journal* 2006; 20:2068-2080.
- Yanagawa S-i, Matsuda Y, Lee J-S, Matsubayashi H, Sese S, Kadowaki T, Ishimoto A: Casein kinase I phosphorylates the Armadillo protein and induces its degradation in *Drosophila*. *EMBO J* 2002; 21:1733-1742.

- Yano T, Haro A, Shikada Y, Maruyama R, Maehara Y: Non-small cell lung cancer in never smokers as a representative 'non-smoking-associated lung cancer': epidemiology and clinical features. *International Journal of Clinical Oncology* 2011; 16:287-293.
- Yao C, Karabasil MR, Purwanti N, Li X, Akamatsu T, Kanamori N, Hosoi K: Tissue Kallikrein mK13 Is a Candidate Processing Enzyme for the Precursor of Interleukin-1beta in the Submandibular Gland of Mice. *Journal of Biological Chemistry* 2006; 281:7968-7976.
- Yoon H, Blaber Sachiko I, Li W, Scarisbrick Isobel A, Blaber M: Activation profiles of human kallikrein-related peptidases by matrix metalloproteinases. *Biological Chemistry*, 2012:137.
- Yoon H, Blaber SI, Debela M, Goettig P, Scarisbrick IA, Blaber M: A completed KLK activome profile: investigation of activation profiles of KLK9, 10, and 15. *Biological Chemistry* 2008a; 390:373-377.
- Yoon H, Blaber SI, Evans DM, Trim J, Juliano MA, Scarisbrick IA, Blaber M: Activation profiles of human kallikrein-related peptidases by proteases of the thrombostasis axis. *Protein Science* 2008b; 17:1998-2007.
- Yoon H, Laxmikanthan G, Lee J, Blaber SI, Rodriguez A, Kogot JM, Scarisbrick IA, Blaber M: Activation Profiles and Regulatory Cascades of the Human Kallikrein-related Peptidases. *Journal of Biological Chemistry* 2007; 282:31852-31864.
- Young CYF, Andrews PE, Montgomery BT, Tindall DJ: Tissue-specific and hormonal-regulation of human prostate-specific glandular kallikrein. *Biochemistry* 1992; 31:818-824.
- Yousef GM, Borgono CA, Michael IP, Davidian C, Stephan C, Jung K, Diamandis EP: Molecular cloning of a new gene which is differentially expressed in breast and prostate cancers. *Tumor Biology* 2004a; 25:122-133.
- Yousef GM, Chang A, Diamandis EP: Identification and Characterization of KLK-L4, a New Kallikrein-like Gene That Appears to be Down-regulated in Breast Cancer Tissues. *Journal of Biological Chemistry* 2000a; 275:11891-11898.
- Yousef GM, Chang A, Scorilas A, Diamandis EP: Genomic Organization of the Human Kallikrein Gene Family on Chromosome 19q13.3-q13.4. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000b; 276:125-133.
- Yousef GM, Diamandis EP: The Expanded Human Kallikrein Gene Family: Locus Characterization and Molecular Cloning of a New Member, KLK-L3 (KLK9). *Genomics* 2000; 65:184-194.
- Yousef GM, Diamandis EP: The New Human Tissue Kallikrein Gene Family: Structure, Function, and Association to Disease. *Endocrine Reviews* 2001; 22:184-204.
- Yousef GM, Elliott MB, Kopolovic AD, Serry E, Diamandis EP: Sequence and evolutionary analysis of the human trypsin subfamily of serine peptidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* 2004b; 1698:77-86.
- Yousef GM, Fracchioli S, Scorilas A, Borgoño CA, Iskander L, Puopolo M, Massobrio M, Diamandis EP, Katsaros D: Steroid Hormone Regulation and Prognostic Value of the Human Kallikrein Gene 14 in Ovarian Cancer. *American Journal of Clinical Pathology* 2003; 119:346-355.

- Yousef GM, Luo L-Y, Scherer SW, Sotiropoulou G, Diamandis EP: Molecular Characterization of Zyme/Protease M/Neurosin (PRSS9), A Hormonally Regulated Kallikrein-like Serine Protease. *Genomics* 1999a; 62:251-259.
- Yousef GM, Magklara A, Diamandis EP: KLK12 Is a Novel Serine Protease and a New Member of the Human Kallikrein Gene Family -Differential Expression in Breast Cancer. *Genomics* 2000c; 69:331-341.
- Yousef GM, Obiezu CV, Luo L-Y, Black MH, Diamandis EP: Prostase/KLK-L1 Is a New Member of the Human Kallikrein Gene Family, Is Expressed in Prostate and Breast Tissues, and Is Hormonally Regulated. *Cancer Research* 1999b; 59:4252-4256.
- Yousef GM, Scorilas A, Chang A, Rendl L, Diamandis M, Jung K, Diamandis EP: Down-regulation of the human kallikrein gene 5 (KLK5) in prostate cancer tissues. *Prostate* 2002a; 51:126-132.
- Yousef GM, Scorilas A, Diamandis EP: Genomic Organization, Mapping, Tissue Expression, and Hormonal Regulation of Trypsin-like Serine Protease (TLSP PRSS20), a New Member of the Human Kallikrein Gene Family. *Genomics* 2000d; 63:88-96.
- Yousef GM, Scorilas A, Kyriakopoulou LG, Rendl L, Diamandis M, Ponzzone R, Biglia N, Gai M, Roagna R, Sismondi P, Diamandis EP: Human Kallikrein Gene 5 (KLK5) Expression by Quantitative PCR: An Independent Indicator of Poor Prognosis in Breast Cancer. *Clinical Chemistry* 2002b; 48:1241-1250.
- Yousef GM, Scorilas A, Magklara A, Memari N, Ponzzone R, Sismondi P, Biglia N, Abd Ellatif M, Diamandis EP: The androgen-regulated gene human kallikrein 15 (KLK15) is an independent and favourable prognostic marker for breast cancer. *Br J Cancer* 2002c; 87:1294-1300.
- Yousef GM, Scorilas A, Magklara A, Soosaipillai A, Diamandis EP: The KLK7 (PRSS6) gene, encoding for the stratum corneum chymotryptic enzyme is a new member of the human kallikrein gene family - genomic characterization, mapping, tissue expression and hormonal regulation. *Gene* 2000e; 254:119-128.
- Yousef GM, White NMA, Kurlender L, Michael I, Memari N, Robb JD, Katsaros D, Stephan C, Jung K, Diamandis EP: The kallikrein gene 5 splice variant 2 is a new biomarker for breast and ovarian cancer. *Tumor Biology* 2004c; 25:221-227.
- Yu H, Bowden DW, Spray BJ, Rich SS, Freedman BI: Identification of Human Plasma Kallikrein Gene Polymorphisms and Evaluation of Their Role in End-Stage Renal Disease. *Hypertension* 1998; 31:906-911.
- Yu H, Diamandis EP, Zarghami N, Grass L: Induction of prostate-specific antigen production by steroids and tamoxifen in breast-cancer cell-lines. *Breast Cancer Research and Treatment* 1994; 32:291-300.
- Zarghami N, Levesque M, Dcosta M, Angelopoulou K, Diamandis EP: Frequency of expression of prostate-specific antigen mRNA in lung tumors. *American Journal of Clinical Pathology* 1997; 108:184-190.
- Zhang W-M, Finne P, Leinonen J, Vesalainen S, Nordling S, Stenman U-Hk: Measurement of the Complex between Prostate-specific Antigen and alpha1-Protease Inhibitor in Serum. *Clinical Chemistry* 1999; 45:814-821.

Zhang W-M, Leinonen J, Kalkkinen N, Stenman U-H: Prostate-specific antigen forms a complex with and cleaves α 1-protease inhibitor in vitro. *The Prostate* 1997; 33:87-96.

Zhang Y, Song H, Miao Y, Wang R, Chen L: Frequent transcriptional inactivation of Kallikrein 10 gene by CpG island hypermethylation in non-small cell lung cancer. *Cancer Science* 2009; 101:934-940.

Zhao EH, Shen ZY, Liu H, Jin X, Cao H: Clinical significance of human kallikrein 12 gene expression in gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology* 2012; 18:6597-6604.

Zhou GX, Chao L, Chao J: Kallistatin: a novel human tissue kallikrein inhibitor. Purification, characterization, and reactive center sequence. *Journal of Biological Chemistry* 1992; 267:25873-25880.

Zuo GW, Kohls CD, He BC, Chen L, Zhang W, Shi Q, Zhang BQ, Kang Q, Luo J, Luo X, Wagner ER, Kim SH, Restegar F, Haydon RC, Deng ZL, Luu HH, He TC, Luo Q: The CCN proteins: important signaling mediators in stem cell differentiation and tumorigenesis. *Histology and Histopathology* 2010; 25:795-806.

Résumé

Les kallibréines tissulaires humaines (KLK) ont récemment émergé comme une famille de protéases à serine pouvant jouer un rôle important dans la tumorigenèse. Le but de cette étude a été de mieux comprendre comment KLK6 et KLK12 pourraient intervenir dans la physiopathologie pulmonaire.

Nous avons démontré qu'une expression ectopique de KLK6 induisait la prolifération des cellules A549 d'une manière dépendante de son activité enzymatique, une résistance à l'apoptose, ainsi qu'une translocation nucléaire de la β -caténine. Nous avons également montré une voie de signalisation impliquée dans la prolifération induite par KLK6 impliquant PAR2, EGFR et ERK.

Nous avons identifié de nouveaux substrats pour KLK12 : les CCN. Nous avons démontré que le clivage de CCN1 et CCN5 par KLK12 limitait leurs fixations avec le VEGF, BMP2 et le TGF- β 1.

Mots clés : kallibréines, cancer du poumon

Résumé en anglais

Recently, human tissue kallikreins (KLK) emerged as a new family of serine proteases which might play a major role in the tumorigenesis. The project aims at determining the contribution of KLK6 and 12 in lung pathophysiology.

We showed that ectopic KLK6 promoted A549 cell proliferation in a protease activity-dependant manner, inhibited cell apoptosis and induced β -catenin nuclear translocation. Furthermore, this study uncovered a signaling pathway mediated by KLK6 in promoting A549 cell proliferation trough activation of the PAR2-EGFR-ERK pathway.

We have also identified novel substrates of KLK12, the CCN family. We reported that KLK12-mediated proteolysis of CCN1 and CCN5 can reduce or abolish the binding of VEGF, BMP2, and TGF- β 1.

Keywords: kallikreins, lung cancer.