UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant

CENTRE D'ETUDE DES PATHOLOGIES RESPIRATOIRES

INSERM U1100

THÈSE présentée par :

Woodys Euménide LENGA MA BONDA

Soutenue le : **27 Janvier 2021**

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

Discipline/ Spécialité : Sciences de la vie et de la santé

Rôle de la Kallicréine 5 dans le remodelage de l'épithélium bronchique associé à la BronchoPneumopathie Chronique Obstructive (BPCO)

THÈSE dirigée par :

Mme REVERDIAU Pascale	Professeur des Universités, Université de Tours

Co-encadrée par :

Mme IOCHMANN Sophie	Maître de Conférences, Université de Tours

PRÉSIDENT DU JURY :

M. GUILLON Antoine	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Tours

RAPPORTEURS :

Mme BONCOEUR Emilie	Maître de Conférences HDR, INSERM Université Paris 13
Mme DARMOUL Dalila	Chargé de Recherche HDR, INSERM Université Paris Diderot

---

JURY :

Mme BONCOEUR Emilie	Maître de Conférences HDR, INSERM Université Paris 13
Mme DARMOUL Dalila	Chargé de Recherche HDR, INSERM Université Paris Diderot
M. GUILLON Antoine	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Tours
M. LAGENTE Vincent	Professeur des Universités, Université de Rennes 1
M. ROGER Sébastien	Maître de Conférences, Université de Tours
Mme REVERDIAU Pascale	Professeur des Universités, Université de Tours

MEMBRE INVITÉ :

Mme IOCHMANN Sophie	Maître de Conférences, Université de Tours

Remerciements

Ces travaux de thèse ont été réalisés au sein du Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires (CEPR, INSERM UMR 1100). Le financement de cette thèse a été apporté par le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (MESRI). Les travaux de recherche ont été financés par la Ligue Contre le Cancer.

Je voudrais tout d'abord remercier le Dr Mustapha Si-Tahar de m'avoir accueilli au sein du CEPR ces 3 années. Merci pour ses conseils scientifiques et particulièrement de m'avoir permis de réaliser cette étude sur les cellules primaires issues de patients.
Merci également au Directeur de l'équipe 2, le Pr Gilles Lalmanach, pour l'accueil dans son équipe et sa sympathie.

Je tiens également à remercier ma Directrice de thèse, le Pr Pascale Reverdiau, pour sa confiance, sa rigueur scientifique, la liberté qu'elle m'a accordé, son soutien et ses précieux conseils qui m'ont facilité la réalisation de ce projet de thèse. Je remercie également ma Co-encadrante de thèse, le Dr Sophie Iochmann, pour ses discussions scientifiques intéressantes, sa motivation, son aide et les échanges non scientifiques. Je vous remercie toutes les deux de m'avoir donné ma chance de réaliser ce rêve, qui me paraissait tellement loin en quittant mes parents au Congo.

J'adresse également mes plus sincères remerciements aux membres du jury qui ont accepté de juger ce travail : le Professeur Vincent Lagente, le Professeur Antoine Guillon, le Docteur Sébastien Roger et plus particulièrement les Docteurs Dalila Darmoul et Emilie Boncoeur qui me font l'honneur d'être rapporteurs de ce travail.

Je tiens également à remercier le Dr Yves Courty pour tous les échanges scientifiques ou non que nous avons eu pendant ma thèse. Merci pour le voyage à Munich et pour la belle expérience de vol en « ULM ».
Merci à Fabien Lecaille, Ahlame Saidi, Laurent Plantier, Virginie Hervé, Chloé Boisseau, Déborah Diakité, Thomas Secher, Nathalie Heuzé, Agnes Petit-Courty, et tous ceux que je n'ai pas cité, pour leurs conseils et convivialité.

Merci également aux doctorants et post-doctorants des autres équipes du CEPR : Alan, Adeline, adélaïde pour les moments passés ensemble.

Je voudrais aussi remercier toutes les personnes avec qui j'ai eu le plaisir de travailler au cours de ces trois années. Tout d'abord, Lucie Brisson pour ses conseils scientifiques précieux et son accueil au N2C (U1069), Virginie vasseur pour son aide précieux lors de la culture et différenciation des cellules primaires, Sonia Georgeault pour la lecture des échantillons de microscopie électronique et Julien Burlaud-Gaillard pour ses conseils en microscopie confocale. Un grand merci également à Catherine Douteau pour les bons de commande que j'oubliais souvent de signer et pour les beaux moments lors des repas d'ensemble à 13h.
Je remercie également Antoine Guillon, Serge Guyétant et Antoine Legras pour leur collaboration sur les prélèvements des échantillons de patients et la lecture des diagnostics histologiques. Merci à Pieter Hiemstra pour son transfert de technologie sur la différenciation des cellules primaires en Interface Air-Liquide.

Un merci particulier à tous les membres du bureau des « étudiants » :
Thibault Chazeirat (compagnon de lutte), Seda Seren (la première à me voir), Mylène Wartenberg (celle qui m'a appris à toujours dire « oui »), Christelle Parent (pour les bières), Paul Bigot (avec sa passion de Kamelott), Delphine Fouquenet (H&S), Lyse Vanderlynden (pour les discussions de la salsa). Merci à vous pour les moments de rigolade, de consolation et pour les meilleurs moments de « bière » au bota. Merci également à Mélia Magnen et David Chauvin pour les moments passés au labo avant leur départ en postdoc. Merci également à Marion Lavergne qui va reprendre le flambeau et aux stagiaires que j'ai suivi, Laura Regnier et Théo Hédouin.

Merci aux membres du bureau des « intellos » : Elsa Montagutelli, Alexie Mayor de m'avoir si bien acceuilli mes premiers jours au CEPR. Merci à Coralie Mergault pour les idées de « bière » en plein milieu d'après-midi, ses idées lumineuses de manips à rallonge et les ragots.

Un merci particulier à Reine-Naomie, ma moitié, pour son soutien infaillible et pour avoir autant pris soin de moi pendant toutes ces années de vie commune. Tu seras une mère formidable et je suis impatient de partager cette nouvelle expérience de père de famille avec toi.
Enfin, un grand merci à mes amis, mes parents, mes sœurs et mon frère qui ont cru en moi et m'ont énormement soutenu dans cette aventure malgré la distance. A mon ami, Cevine-Aubert parti trop tôt, je te dédis ma thèse car ce projet de poursuivre les études en France était le nôtre et je sais que tu as toujours été là pour me porter et me motiver tout long de cette folle aventure.

Résumé

La BronchoPneumopathie Chronique Obstructive (BPCO), principalement causée par le tabagisme, est une pathologie inflammatoire chronique caractérisée par une diminution progressive du calibre des bronches obstruées en raison d'une hypersécrétion de mucus. L'altération de l'épithélium pulmonaire par la fumée de cigarette conduit à la production de médiateurs de l'inflammation, à un stress oxydant et à un déséquilibre de la balance protéases/antiproteases bien décrits pour jouer un rôle majeur dans la genèse et la persistance de la maladie. Parmi les protéases impliquées, notre étude s'est focalisée sur une protéase à sérine, la kallicréine 5 (KLK5), laquelle pourrait jouer un rôle dans les mécanismes de remodelage et de réparation tissulaire associés à l'agression de l'épithélium bronchique. Nos résultats ont montré, sur des épithéliums reconstitués à partir de cellules primaires issues de patients opérés en raison d'un cancer broncho-pulmonaire et cultivées en interface air-liquide, que la KLK5 clivait les protéines de jonctions épithéliales E-cadhérine et β-caténine et altérait l'ultrastructure de ces épithéliums bronchiques. A l'aide de la lignée cellulaire bronchique 16HBE14o-, exprimant fortement la KLK5, nous avons démontré que l'invalidation du gène de cette protéase augmentait l'expression de la E-cadhérine et de la β-caténine ainsi que celle des intégrines (α5, β1, β3 et β4), améliorant ainsi l'intégrité de la barrière épithéliale et la réparation de la monocouche cellulaire. Afin d'étudier les mécanismes d'action de la KLK5, nous avons par ailleurs montré sur les cellules bronchiques BEAS-2B, exprimant faiblement KLK5, que cette protéase pouvait être induite par les cytokines pro-inflammatoires (TNFα, IL-8 et IL-6) et par le peroxyde d'hydrogène (H_20_2), l'un des composants générés lors de la combustion de la cigarette et inducteur du stress oxydant. De plus, la KLK5 exogène induit une perte d'adhérence cellulaire à la fibronectine en clivant cette protéine matricielle mais aussi la E-cadhérine et les intégrines α5β1 et α6β4, lesquelles permettent l'accrochage des cellules à la matrice extracellulaire. Cette perte adhérence est associée à la Transition Epithélio-Mésenchymateuse, à l'augmentation de la migration cellulaire par activation de la voie de signalisation MAPKinase. L'ensemble de ces données suggère que l'activité de la KLK5, produite lors du processus inflammatoire associé à la BPCO, interviendrait dans les mécanismes liés à l'altération et à la réparation de l'intégrité de l'épithélium bronchique.

Abstract

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is a chronic inflammatory lung disease mainly caused by cigarette smoking and characterized by a progressive decrease in the bronchus caliber and a mucus hypersecretion. The alteration of the pulmonary epithelium by cigarette smoke leads to the production of inflammation mediators, oxidative stress and imbalance of proteases/antiproteases well known to play a key role in the genesis and persistence of COPD. Among the protease involved, our study focused on a serine protease, kallikrein 5 (KLK5), which could play a role in tissue remodeling and repair mechanisms associated with the epithelium aggression. Our results showed, on reconstituted epithelium obtained from primary cells isolated from patients following a lung cancer surgical excision and grown in Air-Liquide Interface, that KLK5 cleaved E-cadherin and β-catenin epithelial junction proteins and altered the ultrastructure of these epitheliums. Using the 16HBE14o- bronchial cell line, strongly expressing KLK5, we have demonstrated that the invalidation of the gene for this protease increases the expression of E-cadherin and β-catenin as well as that of integrins thereby improving the integrity of the epithelial barrier and the repair of the cell monolayer. In order to study the mechanisms of action of KLK5, we also showed on BEAS-2B bronchial cells, with expressing low levels of KLK5, that this protease could be induced by pro-inflammatory cytokines (TNF, IL-8 and IL-6) and by hydrogen peroxide (H202), one of the components generated while smoking a cigarette and inducing the oxidative stress. In addition, exogenous KLK5 induces a loss of cellular adhesion to fibronectin by cleaving this matrix protein, as well as E-cadherin and integrins that allow cell to bind to the extracellular matrix. This adhesion loss is associated with Epithelial-Mesenchymal Transition, to increase cell migration by activating the MAPKinase signaling pathway. All of this data suggests that the activity of KLK5 produced during the inflammatory process associated with COPD would be involved in mechanisms related to the alteration and repair of the integrity of the bronchial epithelium.

Table des matières

Remerciements 1
Résumé 3
Résumé en Anglais 4
Table des matières……...5
Liste des figures……..9
Liste des abréviations……....12
Introduction……..…14
Partie I : Synthèse bibliographique et contexte du travail.....16
A. Généralités sur la Famille des kallicréines 17
I. Organisation du locus 17
II. Caractéristiques des transcrits 18
III. Régulation de l'expression des gènes des KLK 19
IV. Les protéines KLK 22
VI. Implication des kallicréines dans les processus physiologiques et physiopathologiques 29
B. La Bronchopneumopathie Chronique Obstructive 49
I. Epidémiologie de la BPCO 49
II. Symptômes de la BPCO 51
III. Diagnostic de la BPCO 51
IV. Mécanismes physiopathologiques de la BPCO 52
V. Traitement de la BPCO 61
C. La kallicréine tissulaire de type 5 63
I. Historique de découverte de la kallicréine 5 63
II. Gène, variants et isoformes de la KLK5 63
III. Régulation de la KLK5 par les miARN 66
IV. Structure protéique et localisation de la KLK5 66
V. Autoactivation et activation par d'autres KLK 68
VI. Régulation de l'activité de la KLK5 69
VII. Implication de la KLK5 dans les processus physiologiques 73
VIII. Implication de la KLK5 dans les processus pathologiques 76
D. Inhibiteur de type künitz, « Tissue Factor Pathway Inhibitor-2 » 88
I. Structure du gène du TFPI-2 88
II. Régulation de l'expression de TFPI-2 89
III. Structure protéique et localisation du TFPI-2 91

IV. Activité inhibitrice du TFPI-2 92
V. Implication de TFPI-2 dans les processus physiopathologiques 94
VI. Implication de TFPI-2 dans les pathologies inflammatoires 98

Partie II : Caractérisation des modèles cellules pour l'étude des effets de la KLK5 sur l'épithélium bronchique……100

1. Introduction 101
2. Matériel et méthodes 101
2.1. Matériel 101
2.1.1. Cellules étudiées 101
2.1.2. Protéines recombinantes et substrats fluorogéniques 102
2.2. Méthodes 102
2.2.1. Tests immunoenzymatiques sandwich sur membrane de nitrocellulose 102
2.2.2. Expression génique et protéique 103
2.2.3. Mesure de l'activité enzymatique de la KLK5 et de son inhibition par le TFPI-2 103
3. Résultats 104
3.1. Expression de la KLK5 dans les cellules BEAS-2B et 16HBE14o- 104
3.2. Activité enzymatique de la KLK5 105
3.3. Régulation de l'activité de la KLK5 par le TFPI-2 105
3.4. Expression des transcrits du TFPI-2 dans les cellules BEAS-2B et 16HBE14o- 107
3.5. Inducteurs de la KLK5 dans un contexte inflammatoire 108
3.6. Impact de l'addition de KLK5 exogène sur les cellules BEAS-2B 110
3.6.1. Effets de différentes concentrations de la rhKLK5 sur l'expression de la vimentine.. 110
3.6.2. Effet de la rhKLK5 sur l'expression de la vimentine en fonction du temps 111
3.6.3. Effet de la rhKLK5 sur l'expression de la KLK5 par les cellules BEAS-2B 112
3.6.4. Impact de la KLK5 sur les voies de signalisation 115
3.7. Invalidation du gène de la KLK5 endogène par la technique CRISPR Cas 9 117
3.7.1. Effets de l'invalidation de la KLK5 sur les autres protéases et inhibiteurs de protéases. 120
3.7.2. Détection de la E-cadhérine, de la β-caténine et de la vimentine dans les cellules 16HBE14o- invalidées pour la KLK5 121

Partie III : Différenciation des cellules épithéliales bronchiques en Interface Air-Liquide……...…123

Partie IV : Implication de la KLK5 exogène et endogène dans les mécanismes de remodelage, réparation et de différenciation des cellules épithéliales (Article)……..134

Partie V : Etude de l'implication de la KLK5 exogène dans l'autophagie……...176

1. Introduction 177

2. Etude de l'autophagie dans des épithéliums reconstitués. 177
Discussion et perspectives 181
Discussion 182
Perspectives 194
Références bibliographiques 196

Liste des tableaux

Tableau 1 : Evaluation de la sévérité de la BPCO……52

Liste des figures

Figure 1 : Organisation du locus des KLK chez l'homme……18

Figure 2 : Transcription des gènes des KLK…….19

Figure 3 : Alignement des structures des KLK 1 à 7……22

Figure 4 : Mécanismes d'action des protéases et des kallicréines. ……..24

Figure 5 : Substrats protéolytiques des KLK et les fonctions associées……...26

Figure 6 : Cascade d'activation des KLK dans la peau……30

Figure 7: Rôle de la cascade des KLK dans la liquéfaction du sperme……32

Figure 8 : Fonctions physiologiques et pathologiques des KLKs dans les systèmes rénal et vasculaire……..34

Figure 9 : Impact de l'arrêt du tabac sur le VEMS……...50

Figure 10 : Structure de l'épithélium des voies respiratoires……56

Figure 11 : Morphologie des petites voies aériennes chez un sujet non-fumeur et un patient BPCO…….58

Figure 12 : Remodelage de l'épithélium bronchique dans la BPCO…….…….59

Figure 13 : Nouvelles cibles moléculaires des médicaments dans la BPCO……62

Figure 14 : Structure détaillée des variants d'épissage de la KLK5 et des isoformes protéiques respectivement synthétisées……..64

Figure 15 : Structure tridimensionnelle de la KLK5 (MEROPS S01.037)……...…67

Figure 16 : Cascade protéolytique initiée par la KLK5 lors de la desquamation de la peau…68

Figure 17 : Liaison du Zn^{2+} au niveau du site actif de la KLK5 dans l'orientation standard……70

Figure 18 : Implication de la KLK5 dans la liquéfaction du caillot séminal……76

Figure 19 : Structure du gène du TFPI-2…….….89

Figure 20 : Structure protéique du TFPI-2……92

Figure 21 : Représentation de l'action du TFPI-2 sur la cascade d'activation des MMPs…...93

Figure 22 : Expression de la KLK5 dans les cellules BEAS-2B et 16HBE14o- WT…….104

Figure 23 : activité enzymatique de la KLK5 et de la plasmine en présence ou non de TFPI-2.....106

Figure 24 : Détermination du Ki réel (Ki) de la KLK5 et la plasmine……...107

Figure 25 : Expression relative des ARNm du TFPI-2……...…108

Figure 26 : Induction de la KLK5 par les cytokines pro-inflammatoires et le stress oxydant……....109

Figure 27 : Effets de différentes concentrations de rhKLK5 sur l'expression de la vimentine par les cellules BEAS-2B……111

Figure 28 : Expression de la vimentine induite par 0,05 µM de rhKLK5 en fonction du temps……...……112

Figure 29 : Détection de la KLK5 dans les cellules BEAS-2B incubées avec la KLK5 recombinante……..…….113

Figure 30 : Induction de l'expression génique de la KLK5 par la KLK5 recombinante……114

Figure 31 : Criblage des voies de signalisation activées dans les cellules BEAS-2B incubées avec la KLK5 recombinante……...116

Figure 32 : Invalidation du gène de la KLK5 dans les cellules 16HBE14o- par la technique CRISPR Cas9……..…118

Figure 33 : Quantification de l'expression des ARNm KLK5 dans des clones de cellules 16HBE KLK5 KO résistantes à la puromycine……119

Figure 34 : Criblage des protéases et inhibiteurs de protéases dans les cellules 16HBE WT et 16HBE KO KLK5……...…121

Figure 35 : Expression des marqueurs épithéliaux (E-cadhérine, β-caténine) et mésenchymateux (vimentine) dans les cellules épithéliales bronchiques non différenciées..122

Figure 36 : Expression des marqueurs épithéliaux (E-cadhérine, β-caténine) et mésenchymateux (vimentine) dans les cellules primaires non différenciées…….125

Figure 37 : Différentiation des cellules en Interface Air Liquide (ALI)…….126

Figure 38 : Mesure de la Résistance Electrique Trans-épithéliale (TEER) des épithéliums reconstitués……..126

Figure 39 : Etude par microscopie électronique à balayage de la morphologie des cils et du mucus produit par les épithéliums reconstitués à partir des cellules 16HBE WT, 16HBE KLK5 KO et des cellules primaires……129

Figure 40 : Analyse, par microscopie électronique à transmission, des épithéliums reconstitués à partir des cellules 16HBE WT, 16HBE KLK5 KO et des cellules primaires……..131

Figure 41 : Etude des jonctions desmosomales dans les épithéliums reconstitués à partir des cellules 16HBE WT, 16HBE KLK5 KO et des cellules primaires……..…132

Figure 42 : Expression des intégrines et des molécules de jonctions E-cadhérine, β-caténine et vimentine dans les cellules 16HBEWT et 16HBE KLK5 KO……...….174

Figure 43 : Etude de l'autophagie dans les cellules 16HBE WT, KLK5 KO,primaires non différenciées ainsi que dans les épithéliums bronchiques reconstitués à partir de ces différentes cellules épithéliales……...179

Liste des abréviations

α1-AT : α1-AntiTrypsine
α2-AP: α2-AntiPlasmine
α2-M : α2-Macroglobuline
α-SMA : *α-Smooth Muscle Actin*
ACT : AntiChymoTrypsine
ACTD : ACTinomycine D
ADAMs : *A Desintegrines And Metalloproteinases*
AHR : *Aryl Hydocarbon Receptor*
ALI : *Air-Liquid Interface* (Interface air-liquide)
ARA70 : *Androgen Receptor Associated Protein 70*
AT : AntiThrombine
ATCP : *Testicular acid phosphatase*
B2R *: Bradykinine B2 Receptor*
BPCO, BronchoPneumopathie Chronique Obstructive
BPTI : *Bovin Pancreatic Trypsin Inhibitor*
CAF : *Cancer-Associated Fibroblast*
CAG : *Cancer-Associated Gene*
Cat : Cathepsine
CBPNPC : Cancer Broncho-Pulmonaire Non à Petites Cellules
CBPPC : Cancer Broncho-Pulmonaire à Petites Cellules
CCN : *Cyr61 Cystein rich protein61 CTGF connective tissue growth factor NOV nephroblastoma overexpressed gene*
CCR : Cancer colorectal
CDSN : Cornéodesmosine
CHX : Cyclohéximide
COVID : *COronaVirus Infectious Disease*
CRISPR : *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*
CRP : *C Reactive Protein*
CSE : *Cigarette Smoke Extract*
Ct : *Threshold Cycle*
CTL : Contrôle
CTGF : *Connective Tissue Growth Factor*
CVF : Capacité Vitale Forcée
DA : Dermatite Atopique
DAPI : 4',6' DiAmidino-2-Phényl Indole
DMR : *Differentially Methylated Region*
DPP4 : *DiPeptidyl Peptidase*
DSC : Desmocolline
DSG : Desmogléine
EDB : *Extra Domain B*
EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique
EFR : Epreuve Fonctionnelle Respiratoire
EGF : *Epidermal Growth Factor*
EGFR : *Epidermal Growth Factor Receptor*
ELF : *E74 Like ETS Transcrption Factor*
EMMPRIN : *Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer*
EN : Elastase Neutrophilique
ENaC : *Epithelial Na Chanel*
ERK : *Extracellular Signal-Regulated Kinase*
FAK : *Focal Adhesion Kinase*
FGF : *Fibroblast Growth Factor*
FN : Fibronectine
FT : Facteur Tissulaire
GAG : GlycosAminoGlycanes
GFP : *Green Fluorescent Protein*
GOLD : *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*
GSK-3β : *Glycogen Synthase Kinase-3β*
GST : Gène Suppresseur de Tumeur
HA : Hémagglutinine
HAI : *Hepatocyte growth factor Activator Inhibitor*
HCC : *Hepato Cellular Carcinoma*
HDR : *Homology Directed Repair*
HE4/WFDC2 : *Human Epidimydis Protein 4 / Whey Acidic Protein 4 Disulphide Core Domain*
HER : *Human Epidermal Growth Factor Receptor*
HDAC : Histone désacétylase
HGF : *Hepatocyte Growth Factor*
HGFA : *Hepatocyte Growth Factor Activator*
HGFR : *Hepatocyte Growth Factor Receptor*
HRP : *HorseRadish Peroxidase*
HIF-1α : *Hypoxia-Inducible Factor-1α*
HSCTE : *Human Stratum Corneum Tryptic Enzyme*
ICAM : *InterCellular Adhesion Molecule*
IFN : InterFéroN
IGF : *Insulin Growth Factor*
IGF-BP : *Insulin Growth Factor-Binding Protein*
Il : interleukine
inKLK : KLK inactive
ITG : Intégrine
JA : Jonctions adhérentes
JS : Jonctions serrées
KD : *Künitz Domain*
K_i : Constante d'inhibition
K_i' : Constante d'inhibition apparente
KLK : Kallicréines
KO : *Knockout*
KRT : *Cytokeratin*
L1CAM : *L1 Cell Adhesion Molecule*

LC3 : *Microtubule Associated Protein Light Chain 3*
LEKTI : *Lympho Epithelial Kazal Type Inhibitor*
lncRNA : *Long non-coding RNA*
LPS : *Lipopolysaccharide*
LTB4 : Leucotriène B4
MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinase*
MDC : *Macrophage derived chemokine*
MEB : Microscopie électronique à balayage
MEC : Matrice Extra Cellulaire
MeCP : *Méthyl-CpG-binding Protein*
MEK : *Mitogen-activated protein kinase kinase*
MET : Microscopie électronique à transmission
MMP : Métalloprotéases matricielles
MSN : *Moesin*
MUC : Mucine
NF-κB : *Nuclear Factor kappa B*
NMD : *Non-sense Mediated mRNA Decay*
NMDA : *N-méthyl-D-aspartate*
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
ORF : *Open Reading Frame*
PAGE : *PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*
PAI : *Plasminogen Activator Inhibitor*
PAR : *Protease-Activated Receptor*
PBS : *Phosphate Buffer Saline*
PCI : *Protein C Inhibitor*
PDE4 : Phosphodiestérase 4
PE : Phosphatidyl Ethanolamine
PG : Prostaglandines
PI3K : *PhosphatidylInositol 3-Kinase*
PKC : *Protein Kinase C*
PLG : *Plasminogène*
PMA : *Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*
PNN : Polynucléaire Neutrophile
PNE : Polynucléaire Eosinophile
PP5 : *Placental Protein 5*
PRSS33 : *Serine Protease 33*
PSA : *Prostate Specific Antigen*
PTC : *Premature Termination Codon*
PTHRT : *ParaThyroïdienne Hormone Related Protein*
RAAS : *Renin Angiotensin Aldosteron system*
RFP : *Red Fluorescent Protein*
rhKLK5 : *Recombinant Kallikrein 5*
RE : Récepteur des œstrogènes
ROS : *Reactive Oxygen Species*
SDS : *Sodium Dodecyl Sulfate*
SERPIN *: SERine Protease Inhibitor*
SFTI : *Sun Flower Trypsin Inhibitor*
Siglec-9 : *Sialic acid binding Ig like lectin 9P*
SLPI : *Secretory Leukocyte Protease Inhibitor*
SN : *Syndrome de Netherton*
SNC : Système nerveux central
SNP : *Single Nucleotide Polymorphism*
SPINK : *Serine Protease Inhibitor Kazal-type*
TARK : *Thymus and Activation Regulated chemokine*
TEER : *TransEpithelial Electrical Resistance*
TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse
TFPI-2 : *Tissue Factor Pathway Inhibitor 2*
TGF : *Transforming Growth Factor*
TIMP : *Tissue Inhibitors of MetalloProteinases*
TLR *: Toll-like Receptor*
TNF : *Tumor Necrosis Factor*
TRPV : *Transient Receptor Potential Vallinoid*
TSLP : *Thymic Stromal Lymphopoietin*
TVO : Trouble Ventilatoire Obstructif
uPA : *urokinase Plasminogen Activator*
uPAR : *urokinase Plasminogen Activator Receptor*
UTR : *Untranslated region*
VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*
VEMS : *Volume Expiratoire Maximal par Seconde*
ZO1 : *Zona occludens 1*

Introduction

La Bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) deviendra selon l'OMS la 3ème cause de mortalité dans le monde en 2030. En France, environ 3,5 millions de personnes sont atteintes par cette pathologie et environ 18 000 décès lui sont attribués. Ces données épidémiologiques font de la BPCO une réelle problématique de santé publique dans le monde et en France. La BPCO est en effet une pathologie inflammatoire chronique, principalement causée par le tabagisme chronique. Elle associe deux pathologies dont une bronchite chronique et une destruction des alvéoles appelée emphysème. L'inflammation des voies aériennes induite par les particules de la fumée de cigarette et les polluants modifie la structure et les fonctions bronchiques. Un épaississement de la paroi bronchique, une augmentation du tonus des muscles lisses, une hypersécrétion des glandes séro-muqueuses et une perte de la structure élastique sont des modifications structurelles décrites dans la BPCO. Parmi les mécanismes impliqués dans la survenue de ces modifications, le stress oxydant, le déséquilibre de la balance protéases/antiprotéases et une mauvaise réparation de l'épithélium bronchique participent à la persistance et à l'aggravation de la maladie. Les traitements disponibles à l'heure actuelle sont essentiellement symptomatologiques et agissent surtout sur les comorbidités associées à la BPCO. De nouvelles pistes thérapeutiques sont en cours de développement et dans ce contexte les kallicréines tissulaires, et plus particulièrement la kallicréine 5, pourrait constituer une cible intéressante puisqu'elle apparaît associée aux mécanismes de remodelage de l'épithélium bronchique et de réparation de ce dernier lorsqu'il est agressé.

L'objectif général de ce travail de thèse était donc d'étudier l'implication de la kallicréine 5 (KLK5) dans les mécanismes de remodelage et de réparation de l'épithélium bronchique dans le contexte de la BPCO. Un nouvel inhibiteur de l'activité de la KLK5, le TFPI-2, a également été identifié comme régulateur de certaines fonctions de cette enzyme. Dans un premier temps, nous avons caractérisé différents modèles de cellules épithéliales pulmonaires, immortalisées ou isolées de prélèvements bronchiques humains, afin d'étudier les mécanismes de réparation de l'épithélium. Dans un deuxième temps, nous avons focalisé nos travaux sur l'implication de la KLK5 exogène et endogène dans les mécanismes de remodelage impliquant notamment l'adhérence, la transition épithélio-mésenchymateuse, la migration et l'invasion cellulaire ainsi que dans le processus de réparation et de différenciation des cellules épithéliales bronchiques. Enfin, nous avons étudié l'implication de

la KLK5 dans l'induction de l'autophagie des cellules de l'épithélium bronchique dans le contexte de la BPCO.

Partie I :

Synthèse bibliographique et contexte du travail

Chapitre 1 . Revue bibliographique

A. Généralités sur la Famille des kallicréines

Les Kallicréines (KLK) ont été découvertes dès 1909 par Abelous et Bardier, lorsque les deux chercheurs toulousains ont constaté que l'injection d'une préparation d'urine humaine dans la veine saphène de chien (à teneur élevée en kinine) entrainait une hypotension (Abelous & Bardier, 1909). C'est en 1934 que l'équipe d'Eugen Werle, de l'Institut Max Plank de Munich, isole cette substance hypotensive dans les extraits de pancréas humains et de plusieurs animaux. Ils nomment cette substance « Kallikrein », du grec « Kallikras », ou pancréas en français. Plus tard, Eugen Werle et ses collaborateurs ont montré que cette KLK était une protéase capable de libérer la bradykinine (kallidine) et la Lys-bradykinine à partir du kininogène (kallidogène) de faible poids moléculaire. Cette étape a été montrée comme essentielle dans l'activation de la signalisation des récepteurs des bradykinines B1 et B2 (Lundwall & Brattsand, 2008). Le terme Kallicréine a été par la suite adopté pour décrire deux groupes de protéases avec, la kallicréine plasmatique du sang circulant dans l'un, et les kallicréines tissulaires exprimées dans différents tissus dans l'autre (Kalinska et al., 2016).

Les kallicréines tissulaires (KLK), ou *KLK-related proteases* en anglais, forment un groupe de 15 protéases (KLK1 à 15), codées par des gènes situés sur le bras long du chromosone 19. La kallicréine plasmatique considérée comme un autre groupe de KLK, est codée par le gène *KLKB1* situé sur le chromosome 4q34-35 (Yousef & Diamandis, 2001).

I. Organisation du locus

Le locus des gènes des KLK humaines s'étend sur 340 kb de séquence génomique du chromosome 19q13.4. Les gènes des kallicréines sont organisés en tandem dans le locus, sans aucun autre gène intermédiaire. Le gène ATCP (*Testicular Acid Phosphatase*) définit l'extrémité 5' centromérique et les gènes CAG (*Cancer-Associated Gene*) et Siglec-9 (*Sialic acid binding Ig like lectin 9*), l'extrémité 3' télomérique. Initialement, 3 kallicréines dites « classiques » ont été découvertes : la KLK1 (rénale ou pancréatique), la KLK2 (glandulaire) et la KLK3 (PSA, *Prostate Specific Antigen*). D'autres KLK ont ensuite été caractérisées (KLK4 à KLK15) et leurs protéines nommées « hK1-hK15 » (human kallikrein, hK) (Yousef & Diamandis, 2001 ; Luo et al., 2003).

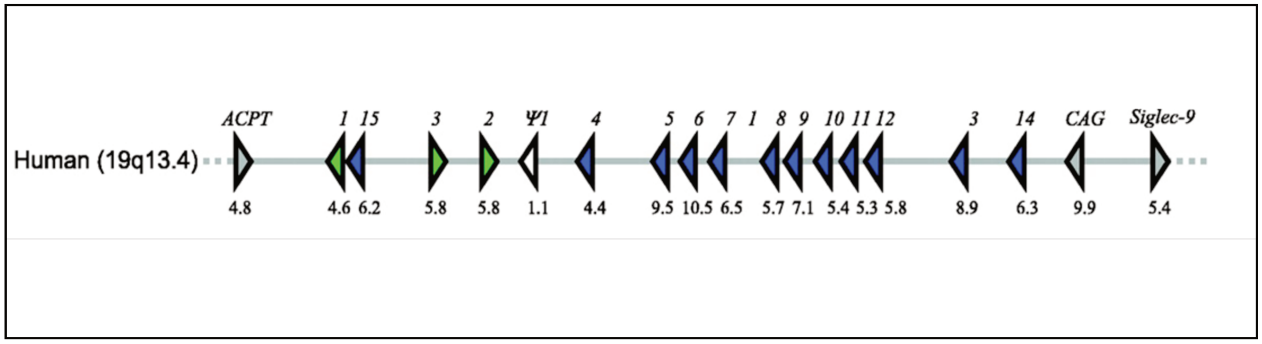


Figure 1 : Organisation du locus des KLK chez l'homme
Les Kallicréines (KLK) humaines sont codées par les gènes situés sur le chromosome 19q13.4. Tous les gènes des kallicréines sont en tandem, délimités par le gène ACTP (Testicular Acid Phospatase) du côté centromérique, par les gènes CAG (Cancer-Associated Gene) et Siglec-9 (Sialic acid-binding Ig-like lectin 9) du côté télomérique (Borgono et al., 2004)

Les gènes des KLK « classiques » (KLK1-3) et de la KLK15 sont regroupés du côté centromérique, sur une distance de 60 kb, alors que les autres (KLK4 à 14) et le pseudogène de la KLK1 (Ψ1) sont du côté télomérique (Figure 1). A l'exception des KLK2 et 3, la transcription de tous les gènes est orientée du télomère vers le centromère (Kurlender et al., 2004).

II. Caractéristiques des transcrits

Les gènes des KLK ont une longueur variable entre 4 et 10 kb et présentent des similitudes de séquence. Les différences retrouvées entre kallicréines se situent souvent au niveau des régions non codantes. Parmi les KLK « classiques », la KLK1 partage une similarité de séquence de 65,8% avec la KLK2 et de 61,5% avec la KLK3. Les KLK4 à 15 partagent environ 34 à 46,2% d'analogie de séquence avec la KLK1 (Harvey et al., 2000). Tous les ARN des KLK sont formés à partir de 5 exons hautement conservés. L'exon 1 possède toujours le codon « ATG » d'initiation de traduction et une courte région non traduite en 5' (5'UTR), alors que le codon « stop » et la queue poly-A sont situés dans l'exon 5. Suite à la traduction, à partir de 15 transcrits, les 3 résidus formant la triade catalytique de type « protéase à sérine », l'histidine 57, l'acide aspartique 102 et la sérine 195, sont conservés et codés respectivement par les exons 2, 3 et 5 (Yousef & Diamandis, 2001 ; Lawrence et al., 2010) (Figure 2).

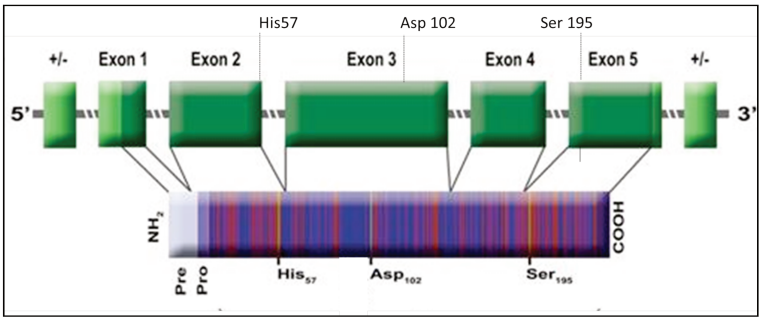


Figure 2 : Transcription des gènes des KLK
Les régions 5' et 3' non traduites sont en vert clair, les exons codants en vert sombre. La protéine est formée d'un peptide signal, d'un propeptide et de la forme mature contenant la triade catalytique et la boucle « kallicréine ». Les acides aminés composant la triade catalytique sont indiqués au-dessus des exons correspondants (Lawrence et al., 2010).

Contrairement aux exons codants, les régions non codantes et les introns sont très variables, ce qui explique les différences de longueur des gènes des KLK (Clements et al., 2001 ; Lawrence et al., 2010). De nombreux transcrits alternatifs ont également été identifiés, mais pour la plupart, ils codent pour des protéines tronquées, dépourvues d'activité enzymatique (Lai et al., 2014 ; Tan et al., 2006).

III. Régulation de l'expression des gènes des KLK

1. Variants et isoformes

Il est bien connu qu'un seul gène peut donner plusieurs transcrits après avoir subi des modifications post-transcriptionnelles (Graveley, 2001). Ces évènements sont couramment rencontrés dans la famille des KLK et environ 80 variants ou isoformes ont été identifiés (Mägert et al., 1999). Par exemple, le phénomène d'épissage alternatif avec un saut d'exon est pratiquement rencontré pour toutes les KLK et produit environ 35% des transcrits alternatifs (Kurlender et al., 2004 ; Michael et al., 2005a). La rétention d'intron est un autre phénomène couramment rencontré dans la famille des KLK. Les KLK1, 2, 3, 4, 5 et 15 ont souvent montré ce type commun de variant d'épissage dans lequel l'intron III est conservé (Michael et al., 2005a). Seule la KLK14 n'a pas de variant connu, alors que les KLK3, 4 et 13 sont les kallicréines les plus riches en transcrits alternatifs. Des transcrits issus des sites alternatifs de transcription ont également été identifiés pour les KLK3, 4, 5, 6, 7 et 11 (Korkmaz et al., 2001; Mitsui et al., 1999 ; Riegman et al., 1989). Enfin, d'autres variants résultent des sites alternatifs de polyadénylation comme pour la KLK2 (Liu et al., 1999), la KLK3 (Heuzé-Vourc'h et al., 2003) et KLK7 (Dong et al., 2003).

2. *Régulation par des mutations*

Dans le génome humain en général et dans les gènes des KLK en particulier, les polymorphismes nucléotidiques (SNP : *Single Nucleotide Polymorphisms*) sont couramment rencontrés. Dans le locus des KLK, plus de 2500 SNP ont été identifiés (Batra et al., 2012). Ces mutations sont capables de modifier le niveau d'expression transcriptionnelle, protéique ou l'activité des kallicréines (Kryza et al., 2016). La mutation de la cytosine 792 en thymidine, dans la séquence codante de la KLK2, permet de remplacer l'arginine 226 en tryptophane dans sa séquence protéique, aboutissant ainsi à l'inactivation de la KLK2 (Herrala et al., 2001). Pour la KLK1, le remplacement de l'arginine 53 en histidine réduit significativement son activité urinaire (Slim et al., 2002). Dans le promoteur de la KLK3, une substitution de la guanine 158 à l'adénine (G158A) est associée à des niveaux très élevés de PSA et un risque augmenté de développer un cancer de la prostate (Lai et al., 2007). Pour la KLK7, 9 SNP et des insertions ont été décrits. Les insertions de paires de base AACC ou AACCins5874 dans la région 3'UTR modifient l'activité de la KLK7, conférant ainsi une prédisposition génétique à la dermatite atopique (Vasilopoulos et al., 2004). Enfin, les mutations de la KLK4 ont été associées à une minéralisation défectueuse des dents (Hart et al., 2004).

3. *Régulation par méthylation*

Les mécanismes épigénétiques tels que la méthylation de l'ADN, les modifications sur les histones et les miARN régulent également l'expression des KLK (Pasic et al., 2012). Ces mécanismes permettent de modifier leur expression par compaction de la chromatine et par la stabilité des ARN. Les méthylations sont des additions d'un groupement méthyle ou hydroxyméthyle sur une cytosine située en 5' d'une guanidine (îlot CpG), sur des séquences riches en nucléotides CG. La méthylation des ilôts CpG permet le recrutement des co-represseurs de la transcription par l'intermédiaire des protéines MeCP (*Methyl-CpG-binding Protein 1 et 2*) et des histones désacétylases (HDACs), aboutissant à l'inhibition de la transcription du gène. Les études *in silico* ont mis en évidence 16 îlots CpG dans 8 gènes de KLK (Pampalakis et al., 2006). Les KLK5 et 10 possèdent le plus d'îlots CpG (4 îlots chacune). Le gène de la KLK15 en possède deux, alors que ceux des KLK1, 2, 4, 11 et 13 en présentent un seul. L'hyperméthylation de ces îlots CpG, au niveau du promoteur ou des exons, inactive les gènes des KLK (Pasic et al., 2012). Ces hyperméthylations sont considérées comme des biomarqueurs dans différents cancers, particulièrement pour les KLK6 et 10 (Pampalakis et al., 2009 ; Pasic et al., 2012). Récemment, une hyperméthylation

du gène de la KLK3, due à l'amiante, a été rapportée dans les cellules pulmonaires (Öner et al., 2020). Des phénomènes de modifications des histones (méthylation, acétylation, phospholylation et ubiquitination) sont aussi observés dans la famille des KLK. Dans les cellules prostatiques cancéreuses, l'activation des gènes *KLK2* et *KLK3* est associée à une modification des histones H3 (Jia et al., 2006 ; Kang et al., 2004). Dans les cellules cancéreuses du sein, il a été démontré que la trichostatine A, un inhibiteur de désacétylases, augmente l'expression de la KLK6, suite à une augmentation du niveau d'acétylation de l'histone H4 (Pampalakis et al., 2009).

4. Régulation par des miARNs

Les miARN sont une classe de petits ARNs endogènes de 20 à 25 nucléotides pouvant cibler et réguler plusieurs gènes en même temps. Ces miARNs sont transcrits en pré-miARN par la polymérase II, en une structure en épingle à cheveux coiffée et polyadénylée (pré-miARN). Les pré-miARN interagissent directement avec la région 3'UTR de l'ARNm du gène, aboutissant à sa dégradation ou à une répression transcriptionnelle (de Sousa et al., 2019). A partir des analyses *in silico*, 96 miARN, ciblant les gènes des KLK ont été identifiés. La KLK10 a été décrite comme celle la plus ciblée par les miARN (19 miARN), suivie de la KLK5 (15 miARN). Tandis que pour les KLK1, 3, 8 et 12, il n'a pas été montré une forte prédiction à une interférence par les miARN. A titre d'exemple, il a été montré que les miARN lef-7f, miR-224 et miR-516a inhibent la prolifération des cellules tumorales ovariennes par ciblage de la KLK10 (White et al., 2010a). L'expression de la KLK1 est aussi inhibée par le miR-224 dans les cellules HEK-293 (White et al., 2010b). La production de la KLK4 est quant à elle régulée par le miR-331-3p, comme montré dans les cellules cancéreuses prostatiques (White et al., 2012). De plus, la surexpression stable de la KLK6 dans les cellules du cancer du sein MDA-MB-231 a permis d'augmenter l'expression des miR-146a et miR-34a. Ces miARN ont été identifiés comme ciblant le cycle cellulaire, l'oncogène *MYC* et la voie des MAPKinases (Sidiropoulos et al., 2016).

D'autres miARN ont été identifiés comme ciblant la KLK6 avec des propriétés suppressives de tumeurs. Il s'agit des miR-181d et le miR-203, identifiés dans le cancer métastatique du côlon (Sells et al., 2017). Dans l'adénocarcinome oesophagien, la KLK7 est ciblée par le miR-217 qui réprime son expression. L'inhibition du miR-217 par la fumée de cigarette augmente ainsi l'expression de la KLK7 dans ce cancer (Adamopoulos et al., 2018 ; Xi et al., 2015). Le MiR-378/422a a été décrit pour cibler les KLK4 et 14 et l'expression d'autres gènes (*PiK3CG*, *GRB2* et *AKT3*) dans le cancer de la prostate (Samaan et al., 2014).

5. *Régulation par des hormones et les médiateurs de l'inflammation*

Les KLK sont bien connues pour être régulées par différents facteurs de trans-activation ou hormones, tels que les androgènes, les œstrogènes, les glucocorticoïdes et les progestatifs. Cela a été particulièrement bien décrit dans les tissus mammaires, ovariens et prostatiques (Kalinska et al., 2016 ; Kryza et al., 2016). D'autres facteurs comme la vitamine D, l'acide rétinoïque et les hormones thyroïdiennes modifient l'expression des KLK (Sotiropoulou & Pampalakis, 2010). Dans le contexte de l'angiogenèse, il a été aussi montré que l'hypoxie, *via* le facteur de transcription HIF-1, était capable d'augmenter l'expression de la KLK12 dans les cellules cancéreuses du poumon (Kryza et al., 2014). De plus, une étude a montré que des niveaux élevés des cytokines pro-inflammatoires IL-1 et -6 sont associés à une augmentation de l'expression des KLK dans la peau (Fischer & Meyer-Hoffert, 2013).

IV. Les protéines KLK

1. *Structure*

La structure protéique des KLK est relativement bien conservée, avec 61-79% d'identité de séquence entre les KLK classiques (KLK1-3) et 38 à 58% entre les KLK4-15. Ce sont toutes des endopeptidases sécrétées, de 25 à 30 kDa, avec une activité de type trypsine ou chymotrypsine (Borgoño & Diamandis, 2004). Les KLK étant des protéases à serine, elles présentent une triade catalytique conservée, constituée de l'histidine 57 (His57), l'acide Aspartique (Asp102) et la serine 195 (Ser195) selon la numérotation chymotrypsine (Kalinska et al., 2016).

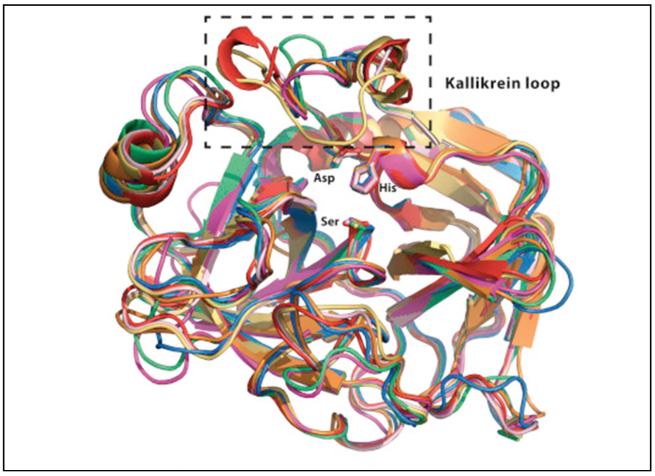


Figure 3 : Alignement des structures des KLK 1 à 7
Chaque KLK est représentée par une couleur : la KLK1 en rouge, KLK2 en rose, KLK3 en jaune, KLK4 en vert, KLK5 en bleu, KLK6 en violet et KLK7 en orange. La « boucle Kallicréine » et les acides aminés conservés (His57, Asp102 et Ser195) de la triade catalytique sont représentés (Kalinska et al., 2016).

Les structures cristallographiques montrent que les KLK partagent des caractéristiques semblables à la trypsine. Leur conformation tridimensionnelle vient d'un repliement de feuillets β composés de 6 brins anti-parallèles et de deux hélices α assemblées de façon à former une « clé grecque ». C'est ce motif, typique de la famille des protéases S1, qui permet la formation du site catalytique des KLK (Goettig et al., 2010 ; Hedstrom, 2001). Structurellement, les KLK1, 2 et 3 présentent 11 acides aminés supplémentaires, insérés en position 95, formant une « boucle de kallicréine » (Figure 3). Etant donnée sa proximité avec l'Asp102 du site actif, la boucle de kallicréine module l'accessibilité du substrat à l'enzyme. Il existe 6 autres boucles de surface qui entourent le site actif et peuvent contribuer aux différences de spécificité de substrat des différentes KLK (Kalinska et al., 2016).

Les KLK de type trypsine (KLK2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 13 et 15) présentent une spécificité stricte pour les résidus chargés positivement comme la lysine et l'arginine en position P1. Les KLK de type chymotrypsine (KLK3, 7 et 9) clivent les liaisons peptidiques avec la tyrosine, le tryptophane ou la phénylalanine en position P1. Il a été aussi démontré que 3 KLK (KLK1, 11 et 14) ont une double spécificité, trypsine et chymotrypsine (Perona & Craik, 1997).

Tout comme les membres de la famille des peptidases S1, les KLK sont synthétisées sous forme de pré-pro-enzymes composées de 244 à 276 acides aminés. Cette séquence contient un peptide signal (16 à 33 acides aminés), un pro-domaine (3 à 37 acides aminés) et une enzyme mature (244 à 253 acides aminés). Le peptide signal permet aux KLK nouvellement synthétisées de transiter vers le réticulum endoplasmique et dans l'appareil de golgi où elles sont glycolysées. Le peptide signal est clivé avant la sécrétion des KLK dans le milieu extracellulaire (Guo et al., 2014). Après la sécrétion des KLK sous forme de zymogène (pro-enzyme), le pro-domaine est clivé pour donner une enzyme active. Ce clivage permet un changement de conformation tridimensionnelle du site actif permettant la liaison au substrat (Lawrence et al, 2010 ; Goettig et al., 2010). Ce sont majoritairement des protéases de type trypsine qui activent les KLK, par clivage après une lysine ou une arginine. Il peut s'agir de protéases à sérine telles que la plasmine, la thrombine, le facteur Xa, l'uPA ou la kallicréine plasmatique, ou de métalloprotéases (MMP). Certaines KLK peuvent aussi activer d'autres KLK et initier une cascade d'activation comme par exemple les cascades KLK2-5 dans la liquéfaction du sperme et KLK5, 7 et 14 dans la desquamation de la peau (Blaber et al., 2013; Prassas et al., 2015 ; Yoon et al., 2009). Les KLK2, 5, 12 et 14 sont également capables de s'autoactiver (Pampalakis & Sotiropoulou, 2007).

2. *Mécanisme d'action*

Lors du mécanisme de protéolyse assuré par les KLK, ce sont les 3 acides aminés de la triade catalytique qui vont œuvrer. L'histidine 57 va agir comme donneur de proton, le résidu aspartate 102 assure l'orientation du cycle imidazolium de l'histidine et la sérine 195 joue le rôle nucléophile. Pour cliver un substrat, le groupement hydroxyle de la sérine attaque le carbone carbonyle de la liaison peptidique du substrat pour former un intermédiaire tétramérique covalent. Une liaison hydrogène de faible énergie se forme entre l'Asp102 et l'His57, facilitant cette réaction. L'instabilité de la charge négative de l'oxygène du carbonyle forme une cavité dit « trou oxyanion » à partir des acides aminés Ser195 et Gly193. Ce dernier capte le proton donné par l'histidine 57, polarisée par l'acide aspartique 102. C'est ainsi que l'intermédiaire, lié au site actif, se transforme en un acyl-enzyme (second intermédiaire) et une molécule d'eau est libérée à partir du groupement amine. C'est alors que le second intermédiaire se décompose pour former un produit carboxylique et l'enzyme active (Kalinska et al., 2016). La glycine 193 est remplacée par une sérine dans la KLK5 ; ce qui pourrait expliquer son manque d'activité sur les substrats classiques des KLK (Broderick, 2001 ; Kalinska et al., 2016) (Figure 4).

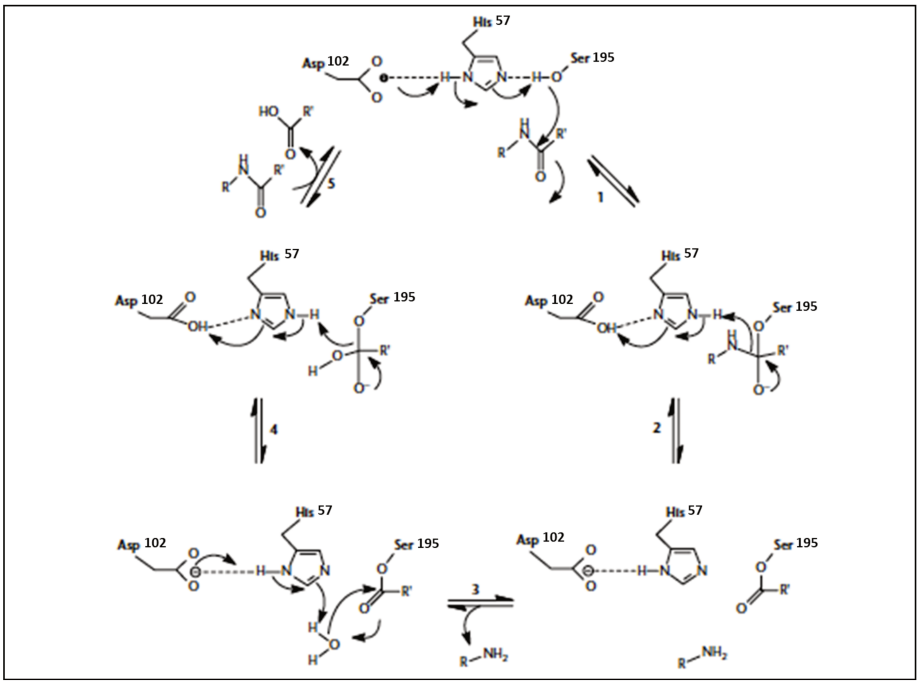


Figure 4 : Mécanismes d'action des protéases et des kallicréines.
Le groupement hydroxyl de la sérine attaque le substrat pour former un intermédiaire tétraédrique covalent (1). Après avoir capté le proton donné par l'histidine, l'intermédiaire tétraédrique se transforme en acyl-enzyme et libère un produit amine (2). L'attaque nucléophile de la molécule d'eau libérée à partir du groupement amine induit une déacylation et la formation d'un second intermédiaire (3)(4). Le second intermédiaire tétraédrique disparaît et le produit carboxyle est relargué (5)(adapté de Broderick., 2001).

3. Les substrats protéolytiques des KLK

Plusieurs substrats naturels des KLK ont été identifiés, principalement par des études *in silico*, de « *phage display* », de chimie combinatoire ou de criblage peptidique. Ces substrats putatifs ont ensuite été confirmés *in vitro* par des analyses biochimiques, avec des protéines purifiées et/ou recombinantes (Li et al., 2008 ; Matsumura et al., 2005 ; Yu et al., 2014).

Les KLK, comme la plupart des protéases sécrétées, clivent des protéines de la matrice extracellulaire (MEC) comme la fibronectine, la laminine, la vitronectine, les collagène (I, II, III et IV), l'énaméline et les protéines matricielles CCN (*Cyr61 (cysteine-rich protein 61)*, CTGF (*Connective Tissue Growth Factor*) and NOV (*Nephroblastoma Overexpressed gene*) (Guillon-Munos et al., 2011; Lawrence et al., 2010). Les molécules de jonction et d'adhérence cellulaires telles que les desmogléines, les desmocollines, la E-cadhérine et la molécule d'adhérence L1 (L1CAM) sont également clivées par les KLK (Dong et al., 2014a ; Jiang et al., 2011 ; Shaw et al., 2008 ; Haddada et al., 2018).

Les KLK peuvent aussi activer ou inactiver par clivage protéolytique certains récepteurs comme le récepteur de la bradykinine B2 (*Bradykinin B2 receptor*, B2R) ou les récepteurs PAR (*Protease Activated Receptor*) 1, 2 et 4. Les KLK modulent ainsi les voies de signalisation associées à ces récepteurs, par clivage de leur partie extracellulaire (Darmoul et al., 2004 ; Ramsay et al., 2008 ; Hollenberg et al., 2014). Plusieurs facteurs de croissance, cytokines, hormones ou médiateurs intracellulaires (comme des molécules chaperones) sont également ciblés par les KLK. Par exemple, les protéines de liaison au facteur de croissance analogue à l'insuline (IGFBP), l'IL-1β ou le TGF-β latent sont clivés par les KLK avant d'être activés (Matsumura et al., 2005 ; Nylander-Lundqvist & Egelrud, 1997 ; Shahinian et al., 2014). Le ciblage de ces protéines permet aux KLK de moduler plusieurs fonctions cellulaires impliquées dans le cancer telles que la prolifération, la croissance, la survie, la Transition-Epithélio-Mésenchymateuse (TEM), l'apoptose, la migration, l'invasion et l'angiogenèse (Figure 5) (Stefanini et al., 2015).

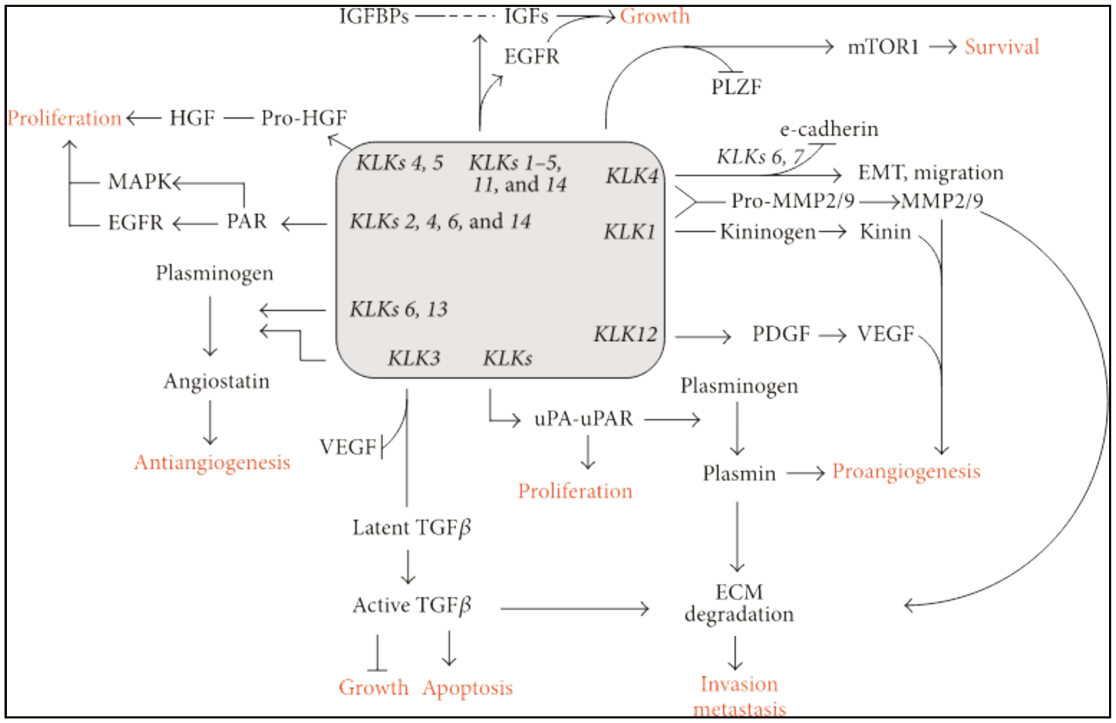


Figure 5 : Substrats protéolytiques des KLK et les fonctions associées
Les KLK participent à la prolifération cellulaire, par l'intermédiaire des récepteurs des facteurs de croissance (HGFR, PAR, EGFR et uPAR), et la survie cellulaire est modulée par la signalisation mTOR. Elles peuvent également réguler l'angiogenèse, la migration et l'invasion cellulaire par libération du VEGF, l'activation des MMP, la dégradation de la MEC et l'induction de la TEM. Les KLK exercent aussi des fonctions anti-cancereuses en favorisant l'apoptose et en inhibant l'angiogenèse et la prolifération cellulaire (Stefanini et al., 2015).

Les KLK libèrent aussi les peptides bioactifs par clivage protéolytique de grands peptides. C'est le cas de la libération de la kinine à partir du kininogène de haut poids moléculaire par la KLK1, ou la libération des peptides anti-angiogéniques (angiostatine 4,5 et domaine 3 de la cystatine C) à partir du plasminogène par les KLK3, 5, 6 et 13 (Bayés et al., 2004 ; Emami & Diamandis, 2007 ; Michael et al., 2005b ; Sotiropoulou et al., 2002). Les KLK, notamment la KLK5, participent au contrôle de l'immunité innée par libération du peptide antimicrobien LL-37 après clivage de la protéine cathélicidine (Yamasaki et al., 2006). Enfin, les KLK peuvent cliver d'autres protéases et être impliquées dans l'activation de plusieurs cascades protéolytiques. C'est par exemple le cas de l'activation de l'urokinase (activateur du plasminogène de type urokinase, uPAR) et du plasminogène tissulaire dans la fibrinolyse, ou l'activation des pro-MMP-2 et -9 et du pro-HGF (Blaber et al., 2013 ; Kryza et al., 2016 ; Mukai et al., 2008 ; Yoon et al., 2008).

V. Régulation de l'activité protéolytique des KLK

1. *Régulation par la glycosylation*

Tous les membres de la famille des KLK présentent au moins un site de glycosylation (N-glycosylation ou O-glycosylation) qui ont une influence sur le repliement et l'activité de ces protéases. Les KLK produites chez la levure présentent deux sites d'activation (Lys25 et Phe35) et un site de glycosylation (Asn30) situé entre les deux. La présence d'un glycane sur ce résidu Asn30 empêche le clivage des KLK après la Phe35. La glycolysation affecte ainsi l'activité des KLK 3, 4, 8 et 13 mais pas celle des KLK1, 2 et 15 (Guo et al., 2014). Une glycosylation et une sialylation hétérogène de la KLK6 sont associées à une augmentation de son activité, comme retrouvée dans le cancer de l'ovaire (Kuzmanov et al., 2009, 2012).

2. Régulation par les glycosaminoglycanes

Les glycosaminoglycanes ou GAG (héparine, sulfate d'héparine, sulfate de dermatane et sulfate de chondroïtine) interagissent avec les KLK dans le microenvironnement. Par exemple, l'acide l'hyaluronique peut séquestrer la KLK1, limitant son activité protéolytique (Forteza et al., 2007). Il a été montré que la dégradation de l'acide hyaluronique par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) de la fumée de cigarette libère la KLK1 et augmente son activité (Casalino-Matsuda et al., 2004). L'activité des KLK6, 7 et 13 est souvent augmentée en présence des GAG et ceci en fonction de leur concentration et du pH (Andrade et al., 2011 ; Angelo et al., 2006). Les GAG peuvent aussi faciliter l'interaction des KLK avec leurs substrats. C'est ce qui a été montré pour la KLK8, qui a besoin d'interagir avec le sulfate d'héparane pour cliver la protéine de capside L1 du papillomavirus humain (Cerqueira et al., 2015).

3. *Régulation par des ions bivalents et des sels*

L'activité des KLK est fortement contrôlée dans la MEC pour éviter une activité protéolytique excessive pouvant conduire au développement de nombreuses pathologies. Dans un premier temps, l'activité des KLK est régulée selon les propriétés physico-chimiques du microenvironnement. Par exemple, dans la MEC ou les liquides biologiques, les KLK peuvent se fixer aux ions Zn^{2+} qui inhibent leur activité (Jonsson et al., 2005; Sotiropoulou & Pampalakis, 2010). Le Zn^{2+} interagit avec les ponts salins des sites actifs des KLK4, 5 et 7 (Debela et al., 2006 ; Goettig, et al., 2010). Dans la prostate, les

KLK2 et KLK3 sont inhibées par l'ion Zn^{2+} en modifiant leur « boucle kallicréine » (Skala et al., 2014).

Certains sels kosmotropes sont capables d'activer les KLK, comme il a été montré pour la KLK13, essentiellement activée par le citrate et le sulfate de sodium (Andrade et al., 2011). Selon la molarité et le pH, ces deux sels peuvent soit activer la KLK6, à pH 7,5, soit l'inhiber, à pH 9 (Angelo et al., 2006). Les sels aussi capables d'inhiber l'activité des KLK1 et 7 à 250 mM et de la restaurer à 1,2 M. Enfin, contrairement aux sels kosmotropes, le NaCl a réduit l'activité de la KLK1 et 7 à toutes les concentrations utilisées (Oliveira et al., 2015).

4. Régulation par les inhibiteurs

Des inhibiteurs endogènes du microenvironnement sont susceptibles d'inhiber les KLK en se fixant de manière réversible ou irréversible sur leur site actif. Plusieurs inhibiteurs de type Kazal et Künitz ont été identifiés pour inhiber les KLK de manière réversible (Goettig et al., 2010). Parmi eux, les inhibiteurs de type LEKTI/SPINK (*Lympho-Epithelial Kazal Type-related Inhibitor/Serine Protease Inhibitor Kazal-type*), ont été impliqués dans le contrôle de la desquamation de la peau, et leur déficit est responsable du syndrome de Netherton (Assis et al., 2013 ; Fortugno et al., 2012 ; Furio et al., 2014). L'inhibiteur réversible de type künitz, HAI-1 (*Hepatocyte growth factor Activator Inhibitor type 1*), inhibe les KLK4 et 5 (Mukai et al., 2008). D'autres inhibiteurs de la peau, comme le SLPI (*Secretory Leukocyte Protease Inhibitor*) et l'élafine, inhibent de façon réversible la KLK7 (Franzke et al., 1996 ; Tian et al., 2004).

Les inhibiteurs de la famille des SERPINES (*SERine Protease INhibitor*) inhibent de façon irréversible plusieurs KLK. C'est le cas de la Kallistatine (PI4), l'alpha1-antichymotrypsine (α1-ACT), l'Antithrombine (AT), l'α2-Antiplasmine (α2-AP), et les protéines C inhibitrices (PCI), qui sont des inhibiteurs suicides des protéases dont les KLK. L'alpha2-macroglobine (α2-M) est aussi capable d'inhiber l'activité des KLK1, 2 et 3 (Goettig et al., 2010 ; Huntington, 2011). Enfin, indépendamment des inhibiteurs, l'activité de certaines KLK peut être inactivée par auto-clivage ou clivage par d'autres KLK (Beaufort et al., 2010 ; Emami & Diamandis, 2008).

VI. Implication des kallicréines dans les processus physiologiques et physiopathologiques

Les kallicréines sont retrouvées dans une majorité des tissus humains et des liquides biologiques. De nombreuses études ont démontré leur rôle dans plusieurs processus physiologiques et pathologiques.

1. *Physiopathologie cutanée*

La peau est l'organe dans lequel les KLK ont été le plus étudiées depuis la découverte des KLK5 et 7 à partir des extraits d'épiderme (Ekholm et al., 2000; Lundstrom & Egelrud, 1991). La peau est un organe constitué de deux parties : le derme qui est la couche profonde et l'épiderme qui est la couche orientée vers l'extérieur. Les couches cornée et granuleuse constituant l'épiderme (*stratum corneum*), assurent une fonction vitale de barrière pour l'organisme contre les agents pathogènes, les allergènes et les agressions mécaniques. La couche cornée est constituée essentiellement des cellules mortes, appelées cornéocytes, reliées entre elles par les protéines de jonctions appelées cornéodesmosomes. Ces cornéocytes sont continuellement remplacés lors de la desquamation de la peau, initiée après le clivage des cornéodesmosomes par des protéases. Cette desquamation de la peau aboutit au détachement des cellules mortes et au renouvellement de la peau (Rawlings & Matts, 2005). Plusieurs anomalies dans la couche superficielle de l'épiderme aboutissent à des dysfonctionnements de cette barrière de protection. Ces dysfonctionnements jouent un rôle critique dans l'initiation ou l'aggravation de l'inflammation de la peau et facilitent l'installation des pathologies comme la dermatite atopique ou encore le syndrome de Netherton etc. (Prassas et al., 2015). Les premières études ont démontré l'implication des KLK5 et 7 dans la desquamation de la peau, par clivage des jonctions desmosomales : desmocollines (DSC) et desmogléines (DSG) (Ekholm et al., 2000 ; Lundstrom & Egelrud, 1991). De même, les KLK1, 6, 11 et 13 peuvent agir dans la desquamation de la peau mais l'essentiel de cette activité protéolytique est portée par les KLK5, 7, 8 et 14 (Figure 6) (Borgoño et al., 2007 ; Komatsu et al., 2006).

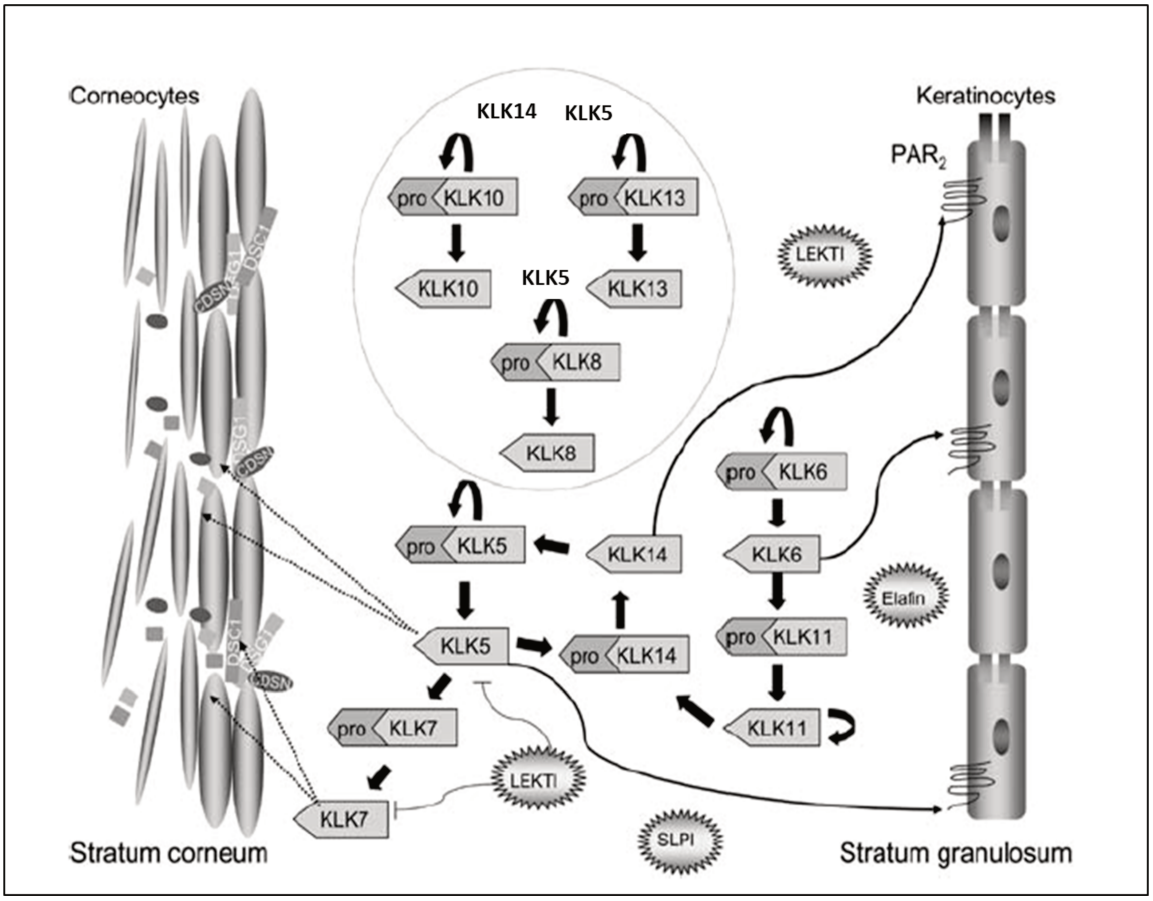


Figure 6 : Cascade d'activation des KLK dans la peau
Activation de la cascade des KLK5-8, 10-11 et 13-14, exprimées dans la couche cornée de la peau. Lors de l'activation, les KLK5 et 7 vont dégrader les cornéodesmosomes (DSG1, DSG4, DSC1 et CDSN) conduisant à la desquamation de la peau. Ces KLK ciblent aussi le récepteur PAR2 et l'activent. L'activité protéolytique des KLK est régulée par les inhibiteurs LEKTI, élafine et SLPI dans l'épiderme. Les flèches noires continues représentent la cascade d'activation spécifique de la peau. Les KLK récemment impliquées dans cette cascade sont représentées dans le cercle (Eissa & Diamandis, 2008 ; Yoon et al., 2008 ; Kishibe, 2019).

En plus de participer au processus de desquamation, les KLK sont impliquées dans l'inflammation cutanée par l'intermédiaire des récepteurs PAR, des cytokines et des peptides antimicrobiens (Yamasaki et al., 2006). Ces mécanismes sont observés dans la rosacée ou les dermatites atopiques (Billi et al., 2020 ; Prassas et al., 2015). De plus, la surexpression des KLK5 et 7 reproduit les principales caractéristiques du Syndrome de Netherton (inflammation cutanée, hyperkératose, prurit sévère, etc.) (Furio et al., 2014 ; Hansson et al., 2002). L'inhibition de la KLK5 a permis d'empêcher les mécanismes de cancérogenèse cutanée (Pampalakis et al., 2019). Enfin, la KLK8 a été impliquée dans le contrôle de l'immunité innée cutanée (Kasetty et al., 2011).

2. Physiopathologie de la reproduction

Une grande majorité des études sur le rôle des KLK dans la physiologie de la reproduction concerne la KLK3. A l'origine, cette protéase était associée à la liquéfaction du sperme et la motilité des spermatozoïdes en raison du clivage des protéines séménogélines 1 et 2 par la KLK3 (Pampalakis & Sotiropoulou, 2007). D'autres KLK comme les KLK4, 5, 14 et 15 ont été par la suite décrites pour leur rôle dans l'activation de la pro-KLK3 (Prassas et al., 2015). De plus, une activité protéolytique directe des KLK5 et 14 a été montrée sur les protéines séménogélines 1 et 2 (Figure 7) (Laflamme & Wolfner, 2013). Dans le cancer de la prostate, la KLK3 facilite les métastases en dégradant les protéines de la MEC, les facteurs de croissance apparentés à l'insuline (IGF) 1 et 2, ainsi que les protéines apparentées à l'hormone parathyroïdienne (PTHRP) (Kryza et al., 2020 ; Mattsson et al., 2014). La KLK2 est la deuxième KLK la mieux étudiée dans les fonctions de reproduction. Son substrat majeur connu à ce jour est l'ARA70 (*Androgen receptor coactivator 70*), un co-régulateur des récepteurs aux androgènes, impliqué dans l'équilibre testiculaire (Shang et al., 2014). Malgré son niveau d'expression relativement faible par rapport au PSA dans la prostate, la KLK2 est un second biomarqueur diagnostic de ce cancer, dans la mesure où elle augmente la spécificité et la sensibilité de détection de la tumeur maligne (Nam et al., 2000). Toujours dans la prostate, la KLK4, également régulée par les androgènes et fortement exprimée dans le cancer de la prostate, favoriserait les métastases osseuses (Gao et al., 2007 ; Logothetis & Lin, 2005).

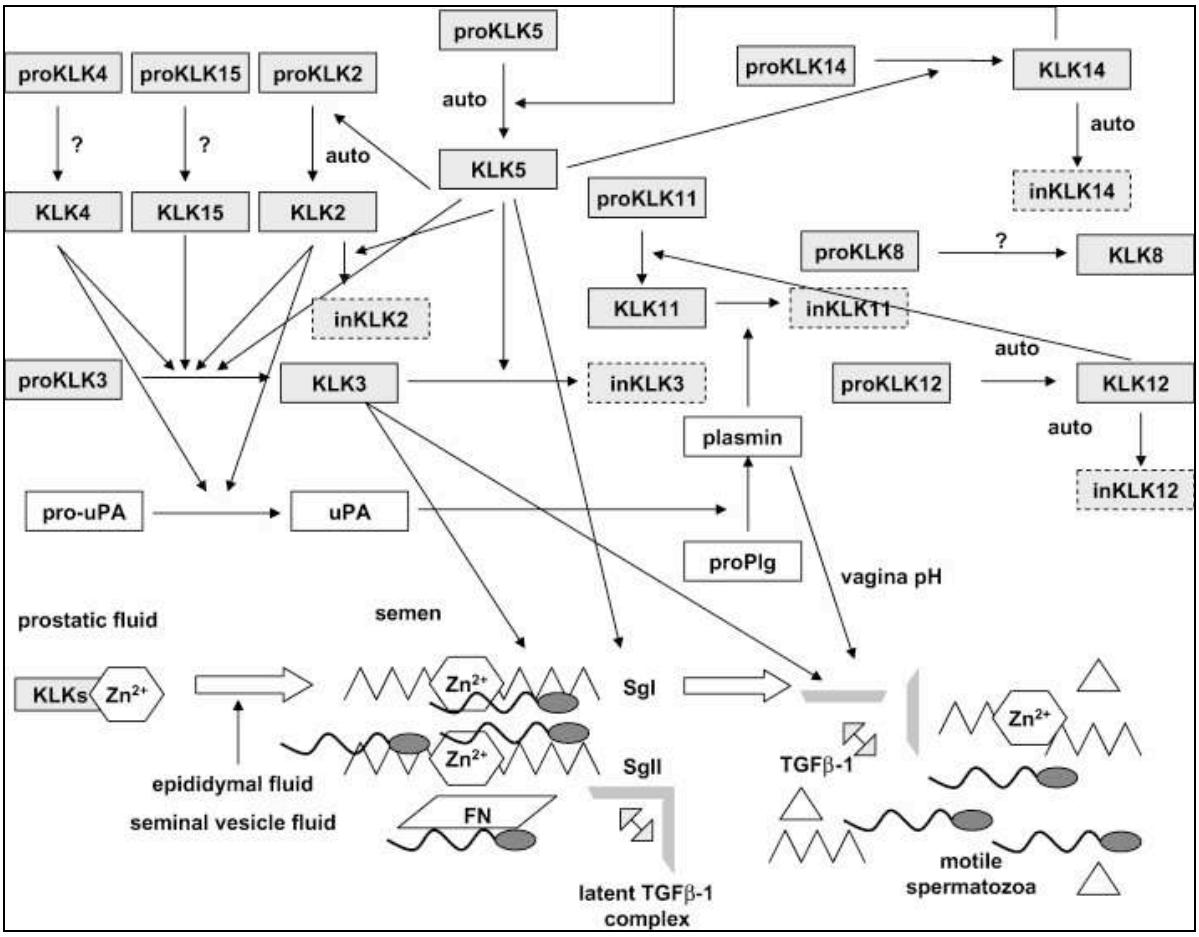


Figure 7: Rôle de la cascade des KLK dans la liquéfaction du sperme
Les KLK sont sous forme latente dans le liquide prostatique par fixation du Zn^{2+}. Les KLK sont activées après mélange du liquide prostatique avec le liquide épididymaire, suite à la redistribution du Zn^{2+}. L'activation de la cascade implique plusieurs KLK (KLK2, 4, 5 et 15) qui activent la KLK3 responsable de la dégradation des protéines séménogélines 1 et 2 pour libérer les spermatozoïdes. La KLK5 dégrade également les protéines séménogélines. inKLK= KLK inactive; FN= fibronectine ; ProPlg= proplasminogène ; uPA = activateur du plasminogène de type urokinase (Pampalakis et al, 2007).

Dans le cancer de l'ovaire, plusieurs études ont montré la surexpression des KLK2 à 11, 13 et 14 (au niveau des transcrits et des protéines) dans les cellules, le tissu, le sérum et/ou le liquide d'ascite (Kalinska et al., 2016 ; Luo et al., 2003 ; Welsh et al., 2003). Dans ce même type de cancer, les KLK6 et 7 dégradent la E-cadhérine, favorisant ainsi les métastases et l'apparition du liquide d'ascite (Cowden Dahl et al., 2008 ; Dong et al., 2014b).

3. Physiopathologie de la cavité buccale

Dans la physiologie dentaire, c'est une coopération de plusieurs protéines et protéases, dont la KLK4 et la MMP-20, qui permettent la formation de l'émail dentaire. En effet, la KLK4 dégrade les protéines de la matrice de l'émail, l'énaméline et l'améloblastine,

dans la dernière étape de ce processus (Cho et al., 2013 ; Simmer et al., 1998). Il a été montré que les mutations aboutissant à une KLK4 non fonctionnelle conduisent à une mauvaise minéralisation de la dent et à la formation de cristaux (Hart et al., 2004 ; Wang et al., 2013b). Dans les carcinomes épidermoïdes oraux, une augmentation de l'expression et de l'activité de la KLK4 est corrélée avec l'apparition des métastases (Papagerakis et al., 2015)

4. Physiopathologie du cerveau

Dans le cerveau, la plasticité neuronale nécessite des mécanismes de clivages protéolytiques qui doivent être finement régulés pour éviter les troubles neuronaux (Wang et al., 2008). La KLK6, la plus décrite dans le cerveau est exprimée dans les oligodendrocytes, les astrocytes, les cellules gliales et semble être impliquée dans les troubles neurodégénératifs comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la sclérose en plaque (Ashby et al., 2010 ; Ogawa et al., 2000). Dans la maladie d'Alzheimer et dans les gliomes, l'expression de la KLK6 est diminuée dans le sérum des patients et dans les tissus (Lou et al., 2014 ; Zarghooni et al., 2002). Le taux des KLK6 et 10 est significativement plus élevé dans le liquide cephalorachidien des patients avec la maladie d'Alzheimer que chez les sujets sains (Goldhardt et al., 2019). De plus, dans les gliomes la KLK6 favorise la résistance aux agents cytotoxiques ou de chimiothérapie (staurosporine, cisplatine, témozolomide) et à la radiothérapie *via* le récepteur PAR-1 (Drucker et al., 2013). Dans la maladie de Parkinson, les études ont montré que la KLK6 peut dégrader la protéine α-synucléine non phosphorylée, formant des dépôts de protéines, responsables de cette maladie. La KLK6 est également impliquée dans la démyélinisation des neurones du Système Nerveux Central (SNC) par dégradation de la myéline, processus observé dans la sclérose en plaque. La KLK6 dégrade aussi les composants de la barrière hémato-encéphalique (laminine, fibronectine et les collagènes), augmentant la démyélinisation et la neuro-inflammation par l'intermédiaire du récepteur PAR2 (Burda et al., 2013 ; Hebb et al., 2014 ; Panos et al., 2014).

Une autre KLK exprimée dans le SNC est la KLK8, dont l'expression est limitée à l'hippocampe, le noyau latéral de l'amygdale et à d'autres zones du système limbique. La KLK8 serait impliquée dans l'apprentissage par activation du récepteur NMDA (*N-Méthyl-D-Aspartate*). Par ailleurs, une activité excessive de la KLK8 est associée à la schizophrénie (Matsumoto-Miyai et al., 2003 ; Tamura et al., 2012).

5. *Physiopathologie rénale et vasculaire*

La KLK1 est la kallicréine la plus décrite en physiologie cardiovasculaire et rénale. Elle exerce plusieurs effets à l'intersection des systèmes rénal et cardiovasculaire. La KLK1 qui est libérée dans les tubules rénaux, où elle inhibe l'activité des canaux collecteurs H+, K+-ATPase-dépendants du tube cortical, active en revanche les canaux sodiques épithéliaux (ENaC) et TRPVs (*Transient Receptor Potentiel Vanilloid*). La libération de la bradykinine par la KLK1, a des effets bénéfiques (via le récepteur B2R) sur le diabète de type 2, l'hypertension et les lésions rénales ischémiques chez les rongeurs (Charest-Morin et al., 2015). La KLK1 peut également déréguler le système Rénine-Angiotensine-Aldostérone (RAAS) et contribuer à la morbidité cardiovasculaire et rénale (Lieb et al., 2015). Des études récentes ont montré des données contradictoires concernant la KLK1, qui aurait des effets de renaux-protecteurs, notamment contre l'hyperkaliémie (Zou et al., 2015)(Stefanini et al., 2015)(Figure 8). Néanmoins, la KLK1 peut également activer des voies pro-inflammatoires par l'intermédiaire du récepteur PAR4 (Yiu et al., 2014).

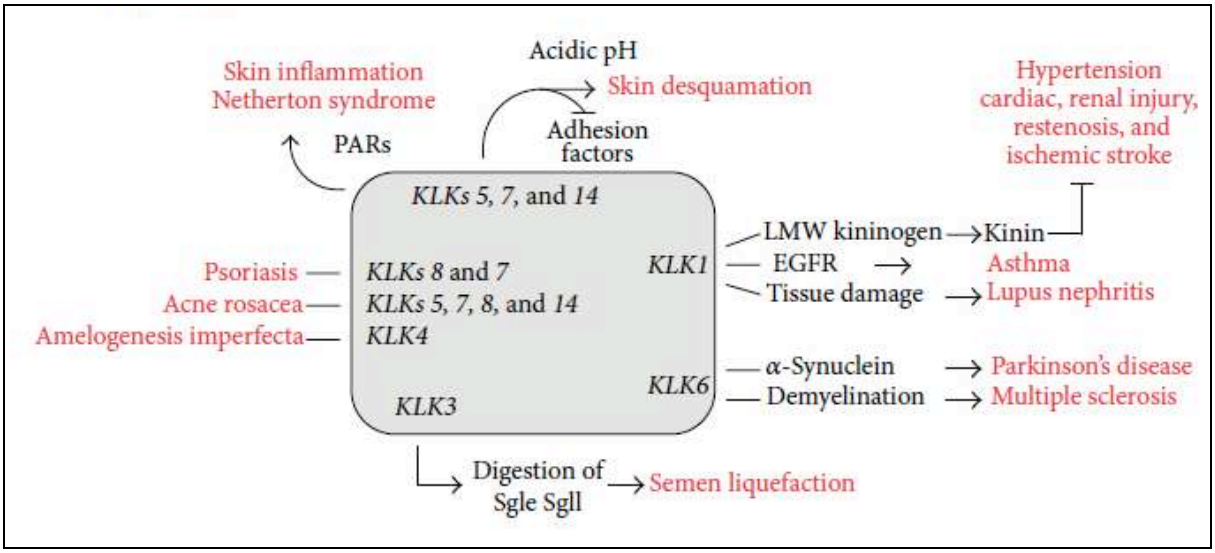


Figure 8 : Fonctions physiologiques et pathologiques des KLKs dans les systèmes rénal et vasculaire*. Les KLK sont impliquées dans les processus de desquamation de la peau, de la régulation de la pression artérielle, de la fibrinolyse et de la liquefaction du sperme. Leur dérégulation peut conduire à différentes pathologies telles que le syndrome de Netherton, des maladies inflammatoires cutanées, des pathologies cardiaques, des maladies neurodégénératives et auto-immunes. Les KLK sont aussi présentes dans le système pulmonaire où elles participent à différents processus physiologiques. Elles sont également impliquées dans le développement de diverses pathologies des voies respiratoires* (Stefanini et al., 2015) .

6. Physiopathologie pulmonaire (article de revue) :

Kallikrein-related peptidases in lung diseases

Biological chemistry, 2018

Woodys Lenga Ma Bonda[1,2], Sophie Iochmann[1,2,3], Mélia Magnen[1,2], Yves Courty[1,2] and Pascale Reverdiau[1,2,3]

[1]INSERM, Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires, UMR 1100, Faculté de Médecine, 10 Boulevard Tonnellé, F-37032 Tours, France
[2]Université de Tours, F-37032 Tours, France
[3]IUT de Tours, Université de Tours, F-37082 Tours, France

Résumé de l'article de revue

De nombreuses études ont révélé le rôle crucial des kallicréines dans la physiopathologie des maladies pulmonaires chroniques, infectieuses et tumorales. Ces études ont notamment montré que les KLK1, 3 et 14 sont impliqués dans la pathogenèse de l'asthme. La KLK1 pourrait également être associée à l'exacerbation de cette pathologie inflammatoire causée par les rhinovirus. Les KLK sont également impliquées dans le cancer du poumon. En fonction des KLK, du sous-type et du stade du cancer ainsi que du microenvironnement des tumeurs, l'expression des KLK est augmentée ou diminuée. Des études fonctionnelles ont montré que la KLK12 était un puissant facteur pro-angiogénique, que la KLK6 favorisait la prolifération des cellules malignes et que la KLK13 était pro-invasive. En revanche, d'autres études ont montré que les KLK8 et 10 réduisaient la prolifération et l'invasion des cellules malignes. De plus, les KLK1, 5 et 12 sont des protéases capables de cliver le virus de la grippe chez l'homme et de favoriser sa propagation. Au regard de ces données, les KLK en général, et la KLK5 en particulier semble être un biomarqueur potentiel et une cible thérapeutique intéressante dans les maladies pulmonaires, incluant la Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) (Lenga Ma Bonda et al., 2018).

Review

Woodys Lenga Ma Bonda, Sophie Iochmann, Mélia Magnen, Yves Courty and Pascale Reverdiau*

Kallikrein-related peptidases in lung diseases

https://doi.org/10.1515/hsz-2018-0114
Received January 11, 2018; accepted March 26, 2018; previously published online March 31, 2018

Abstract: Human tissue kallikreins (KLKs) are 15 members of the serine protease family and are present in various healthy human tissues including airway tissues. Multiple studies have revealed their crucial role in the pathophysiology of a number of chronic, infectious and tumour lung diseases. KLK1, 3 and 14 are involved in asthma pathogenesis, and KLK1 could be also associated with the exacerbation of this inflammatory disease caused by rhinovirus. KLK5 was demonstrated as an influenza virus activating protease in humans, and KLK1 and 12 could also be involved in the activation and spread of these viruses. KLKs are associated with lung cancer, with up- or downregulation of expression depending on the KLK, cancer subtype, stage of tumour and also the microenvironment. Functional studies showed that KLK12 is a potent pro-angiogenic factor. Moreover, KLK6 promotes malignant-cell proliferation and KLK13 invasiveness. In contrast, KLK8 and KLK10 reduce proliferation and invasion of malignant cells. Considering the involvement of KLKs in various physiological and pathological processes, KLKs appear to be potential biomarkers and therapeutic targets for lung diseases.

Keywords: asthma; cancer; ECM remodelling; influenza; protease; respiratory tract.

***Corresponding author: Pascale Reverdiau,** Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires, INSERM UMR 1100, Faculté de Médecine, 10 Boulevard Tonnellé, F-37032 Tours, France; Université de Tours, F-37032 Tours, France; and IUT de Tours, Université de Tours, F-37082 Tours, France, e-mail: reverdiau@med.univ-tours.fr
Woodys Lenga Ma Bonda, Mélia Magnen and Yves Courty: Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires, INSERM UMR 1100, Faculté de Médecine, 10 Boulevard Tonnellé, F-37032 Tours, France; and Université de Tours, F-37032 Tours, France
Sophie Iochmann: Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires, INSERM UMR 1100, Faculté de Médecine, 10 Boulevard Tonnellé, F-37032 Tours, France; Université de Tours, F-37032 Tours, France; and IUT de Tours, Université de Tours, F-37082 Tours, France

Introduction

Proteases are involved in a wide variety of physiological functions and pathological processes, from inflammatory and infection diseases to cancer. In the lung, the deregulated protease activities could be used as biomarkers for diagnosis or prognosis of pulmonary diseases (Taggart et al., 2017). Among the serine proteases, representing more than 100 members of the proteolytic enzyme family, are the kallikrein-related peptidases (KLKs) (Kalinska et al., 2016; Kryza et al., 2016; Ramachandran et al., 2016). KLKs are encoded by chromosome 19 of the human genome and represent 15 distinct enzymes (KLK1 to 15). About 80 mRNA splicing variants and 85 fusion transcripts, some with more than 1000 single nucleotide polymorphisms, have been recorded for KLKs (Lai et al., 2016). Bioinformatics analysis predicted 96 microRNAs (noncoding RNAs) as possible post-transcriptional regulators of KLKs. The most frequently targeted KLKs were KLK10, then KLK5, but no strong microRNA–KLK1, 3, 8, or 12 interactions have been predicted (Chow et al., 2008).

Some KLKs – KLK3 (or prostate-specific antigen), 7 and 9 – exhibit chymotrypsin-like activity in terms of their substrate specificity, whereas others have trypsin-like activity. KLK1 is the only KLK able to generate lysyl-bradykinin from the low-molecular-weight kininogen. The involvement of active kinins in physiological mechanisms and inflammatory diseases is now well documented. Bradykinin binds to the G-protein-coupled B1 and B2 receptors, leading to vasodilatation, vascular permeability and chemotaxis. KLK1 may also activate protease activated receptor 1 (PAR1) and 4, a subfamily of G-protein-coupled receptors (Gao et al., 2010; Yiu et al., 2014). PAR1 and 2 are activated by other KLKs (KLK2, 4, 5, 6 and 14) (Oikonomopoulou et al., 2006; Mize et al., 2008; Ramsay et al., 2008; Stefansson et al., 2008; Chung et al., 2012; Michel et al., 2014; Johnson et al., 2016). The proteolytic activity of KLKs is regulated by various endogenous inhibitors that bind to their active site. These are members of several families of inhibitors such as Kazal-type inhibitors (lympho-epithelial Kazal type-related inhibitor), Kunitz-type inhibitors (hepatocyte growth factor activator

Brought to you by | Universite de Tours
Authenticated
Download Date | 5/16/19 10:22 AM

inhibitor type 1), and serine protease inhibitors, with, for example, kallistatin, antithrombin and alpha-2 antiplasmin (Goettig et al., 2010; Masurier et al., 2018).

KLKs are found in nearly all healthy tissues and are secreted in most human biological fluids. The physiological functions of some KLKs have been elucidated, particularly in desquamation of the skin (KLK5 and 7), formation of tooth enamel (KLK4), semen liquefaction (KLK3), neuro-inflammation (KLK6) and regulation of sodium channel in the renal and cardiovascular systems (KLK1) (Kalinska et al., 2016). However, the physiological functions of the other KLKs, particularly in the lung, remain to be deciphered.

Several KLKs are present in the respiratory tract, and some studies have focused on understanding the physiological role of KLKs and their impact on pathological processes. KLK transcripts have been studied in healthy lung tissues from adult and foetus and were detected at variable levels depending on the KLK (Shaw and Diamandis, 2007). In the lung, the distribution of KLKs has been studied by immunohistochemical labelling. KLK1, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 13 and 14 were found expressed in the epithelium

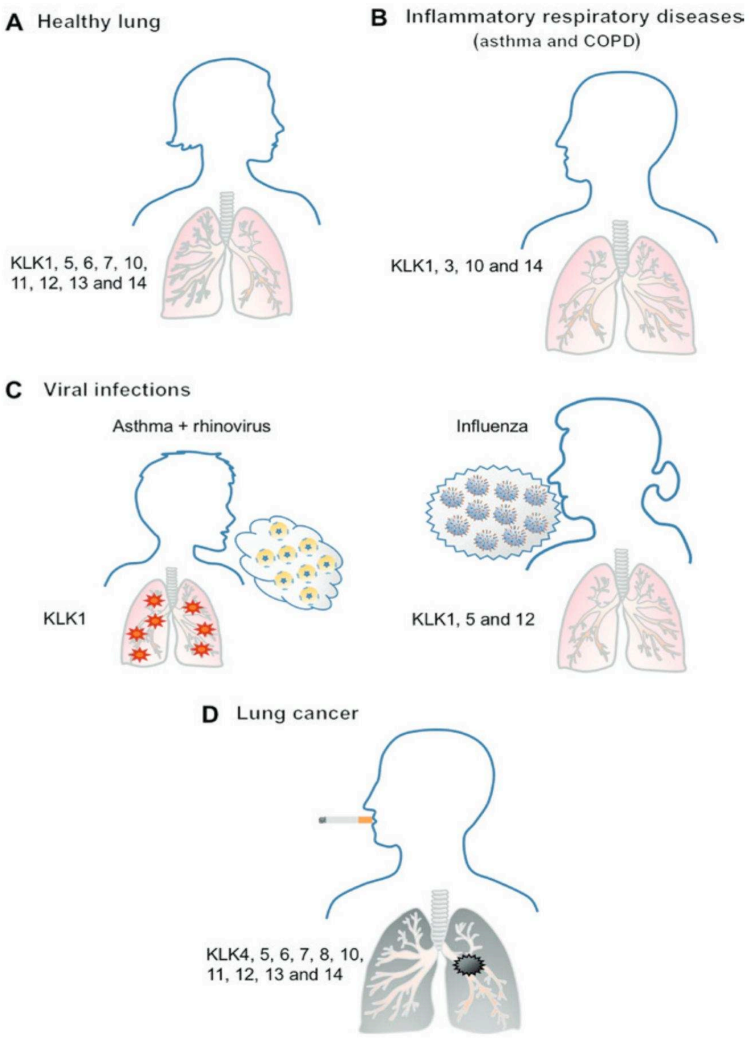


Figure 1: Summary of data highlighting the involvement of KLKs in lung diseases as reported in the literature.
Kallikrein-related peptidases reported in healthy lung (A) and in the following lung diseases: inflammatory respiratory diseases (B), viral infections (C) and cancer (D).

Brought to you by | Universite de Tours
Authenticated
Download Date | 5/16/19 10:22 AM

(cytoplasm and nucleus) of the upper and lower respiratory tract, submucosal glands and chondrocytes but not in the alveolar epithelium and lung parenchyma (Petraki et al., 2006; Chee et al., 2008; Planque et al., 2008a; Nathalie et al., 2009). Staining for KLK8 was detected in the cilia and the cytoplasm of the basal cells of bronchi, and in globet cells, chondrocytes and submucosal glands (Singh et al., 2008). KLK4 was not detected in healthy adult lung tissue (Seiz et al., 2010).

The physiological role of KLKs in the healthy lung remains to be detailed, but their contributions to lung diseases are now studied in various pathological mechanisms such as inflammatory processes, viral and bacterial infections and cancer (Figure 1).

KLKs in inflammatory pulmonary diseases

Asthma

Asthma is a chronic disease affecting more than 300 million people worldwide. This inflammatory pulmonary disease is characterised by dyspnoea, coughing, wheezing, bronchoconstriction, thickening of the airway wall, mucus hypersecretion and airway remodelling (Proud, 1998; Ichinose, 2003; Wadsworth et al., 2011). Some tissue KLKs are involved in the pathophysiology of asthma, particularly in the remodelling of bronchial airways, which commonly occurs in severe asthma. The sources of airway KLKs are mainly submucosal gland cells, epithelium and resident and non-resident immune cells such as monocytes, alveolar macrophages and granulocytes, as demonstrated for KLK1 (Lauredo et al., 2004; Magnen et al., 2017). The epithelial-to-mesenchymal transition plays a crucial role in the increase in airway smooth muscle (ASM) mass associated with airway obstruction and loss of respiratory function in all asthmatic patients.

KLK1 was the first KLK found to be involved in the pathophysiology of asthma. Christiansen and collaborators described an elevation of kininogenase activity in relation with KLK1 in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid from patients with airway diseases (asthma and allergic rhinitis), particularly after allergen challenge (Christiansen et al., 1992). The KLK-kinin system has a role in airway inflammation (Proud, 1998; Ichinose, 2003). Indeed, by cleaving both low- and high-molecular-weight kininogen, KLK1 releases lysyl-bradykinin (kallidin) and bradykinin, respectively, which causes a variety of cell responses via bradykinin B1 and B2 receptors. The bronchoconstriction observed in asthmatic patients is mainly mediated by the G-protein-coupled B2 receptor being constitutively expressed by lung fibroblasts/myofibroblasts but also by airway epithelial cells (Abraham et al., 2006). B2 receptor is also involved in the bronchial vascular remodelling observed in asthma (Ricciardolo et al., 2013). These authors showed that expression of B2 receptor was constitutively higher in asthmatic patients and even more so after exposure to allergens together with an increase in nuclear factor-kappa B (NF-κB) expression. They also demonstrated that allergen-driven B2 receptor expression was mediated by NF-κB in airways of people with asthma (Ricciardolo et al., 2015).

One of the characteristics of airway inflammatory diseases such as asthma is a goblet cell (GC) metaplasia with mucus hypersecretion subsequently inducing airway obstruction. A cascade of events implicating KLK1 has been proposed to explain this mechanism. Initially, Forteza and colleagues showed that after secretion, the inactive form of KLK1 binds to hyaluronan of the epithelial surface (Forteza et al., 1999). The hyaluronan degradation increases the bioavailability and activity of KLK1 and the release of epidermal growth factor (EGF) (Casalino-Matsuda et al., 2004). Smoking and diesel particle exposure also generated oxydative stress with reactive oxygen species that could induce hyaluronan fragmentation. Pro-inflammatory cytokines (i.e. tumor necrosis factor α, interleukin 1β, etc.), upregulated during the inflammation process, increase hyaluronidase expression and activity, thereby also inducing hyaluronan depolymerisation at the surface of lung GCs (Monzón et al., 2008). An increase in soluble hyaluronan has been observed in the BAL fluid of asthmatic patients and smokers which suggests that hyaluronan depolymerisation occurs in the airways of these individuals (Forteza et al., 2004). The release of active KLK1 stimulates the EGF receptor signalling pathway leading to increased secretion of mucin protein 5AC (MUC5AC) (Casalino-Matsuda et al., 2006). Mucin hypersecretion is associated with poor survival of patients with severe asthma, who die with severe airflow obstruction caused by bronchoconstriction and airway mucus plugging. Recently, Evans and coworkers reported airway hyperreactivity associated with MUC5AC secretion and ASM contraction in inflamed lungs of mice exposed to allergic stimuli (ovalbumin and Aspergillus extract) (Evans et al., 2015).

Other KLKs could be involved in asthma. Genome-wide screens reported evidence for linkage of allergic asthma-related phenotypes to several chromosomal locations. Loci on chromosome 19 have been linked to allergic asthma phenotypes in different populations in

Brought to you by | Universite de Tours
Authenticated
Download Date | 5/16/19 10:22 AM

independent studies (Venanzi et al., 2001; Myers et al., 2012). The EVE consortium conducted genome-wide association studies of 12 000 asthmatic patients and controls representing European ancestry. Meta-analysis revealed two asthma risk loci in European Americans; one of the replicated single nucleotide polymorphisms is in an intron in the KLK3 gene (rs1061477) (Myers et al., 2012). KLK3 (or prostate-specific antigen), highly expressed in prostate cancer, is also produced at low levels in many other tissues, particularly in the bronchial epithelium of asthmatic patients. The authors suggested a novel role of KLK3 in interferon γ secretion involved in asthma pathogenesis (Kodak et al., 2006; Myers et al., 2012).

Recently, Aubier and colleagues compared bronchial biopsies from healthy subjects and 129 patients with mild to moderate or severe asthma. KLK14 expression was upregulated in BAL fluid in severe asthma. They also observed a PAR2 overexpression associated with the ASM area in severe asthma, particularly in the youngest patients. The authors suggested that ASM hypertrophy and hyperplasia of patients with severe asthma was associated with the KLK14-mediated PAR2 activation (Aubier et al., 2016).

Chronic inflammatory respiratory disease

Chronic inflammatory respiratory disease (COPD), one of the leading causes of mortality and morbidity worldwide, is a chronic inflammatory respiratory illness characterised by increasing breathlessness, coughing and wheezing due to thickening of the airway wall obstructing airflow and hypersecretion of mucus (Bagdonas et al., 2015). The World Health Organization (WHO) predicts the disease will move from fifth to third among the leading causes of death globally by 2030. Most cases of COPD are caused by inhaling pollutants and smoking, and it is also a risk factor for lung cancer. Little is known about the involvement of KLKs in this disease. An epigenome-wide association study of blood DNA analysed differentially methylation regions in terms of COPD and lung functions. A cohort of 60 COPD patients and 40 controls was analysed. KLK10 was one of the five genes identified from the 104 regions with differential methylation associated with spirometric measures and COPD (Lee et al., 2017). During acute exacerbation of COPD, KLK3 level in serum was found to be increased, probably due to hypoxaemia (Ozge et al., 2015). The mechanisms leading to mucus hypersecretion could be associated with EGF receptor signalling, with the activation of KLK1 and release of mature EGF (Casalino-Matsuda et al., 2004).

KLKs in lung infections

Rhinoviruses and asthma

Human rhinoviruses (RV) are single-stranded non-enveloped RNA viruses of the Picornaviridae family. The capsid of many RVs binds to intercellular adhesion molecule-1 at the surface of airway epithelial cells, thereby using this receptor to infect the target cells. RVs are exclusive respiratory pathogens causing the common symptoms of a cold but also precipitate exacerbations of asthma and COPD. Moreover, infection by RVs could contribute to asthma development (Castillo et al., 2017). Indeed, airway remodelling leading to thickening of the lamina reticularis and increasing ASM mass in patients with asthma could be due to recurrent RV infections in early childhood. Using human airway epithelial cells infected by RV, Proud's team showed that ASM cells and bronchial fibroblasts could migrate toward the epithelial layer. They also identified the chemokines CCL5 and CXCL8 as potential chemotattractants for ASM cells and fibroblasts (Shelfoon et al., 2016; Shariff et al., 2017). Moreover, Minor and Proud (2017) showed the combined effect of RVs and transforming growth factor β1 (TGF-β1) to trigger the airway epithelial-mesenchymal transition. These data can be related to studies demonstrating that RV infection upregulates the expression and activity of some proteases such as matrix metalloprotease 9 (MMP9) dependent on NF-κB signalling (Tacon et al., 2010) and MMP1 (Naveed et al., 2017), thus contributing to airway remodelling and exacerbation of asthma and COPD. Similarly, the role of the serine protease KLK1 has been investigated with human experimental RV infection: increased activity of KLK1 in the lower airway was observed in all asthmatic patients, associated with increased IL-8 level in BAL fluid (Christiansen et al., 2008). KLK1 leads to high levels of kallidin and bradykinin detected in the nasal wash of individuals with symptomatic RV infection, particularly those with allergies and asthma. As previously described by Casalino-Matsuda et al. (2006) in asthma, RV induces MUC5AC secretion into BAL in vivo and from respiratory epithelial cells, as demonstrated in vitro. The authors showed that RV induction of NF-κB signalling was required for MMP expression. MMPs could then activate TGF-β1 from pro-TGF-β1. This EGF receptor ligand activates mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (ERK) signalling responsible for the secretion of MUC5AC (Hewson et al., 2010). Whether KLK1 can play the same role as MMPs needs investigation.

The impact of KLK1 in RV-induced asthma exacerbation was suggested by a recent study of murine epithelial

Brought to you by | Universite de Tours
Authenticated
Download Date | 5/16/19 10:22 AM

cells infected by different respiratory viruses – RVB1, the coronavirus MHV-1 or the influenza A virus PR8 – causing mild, moderate and severe disease, respectively. To establish a specific transcriptional signature for each virus infection, microarray analysis was used after 12 and 24 h of infection as compared with mock treatment. KLK1 was upregulated by RV, together with KLK1-related proteins (KLK1b4, b5 etc.) and proteins involved in remodelling. Among genes coding for mucus proteins, MUC2 was upregulated with only RV infection, contributing to a mechanism leading to mucus hypersecretion (Van Leuven et al., 2017).

Influenza virus infection

Human influenza viruses are highly infectious pathogens that cause respiratory illness in both children and adults. Influenza epidemics are estimated to cause between 250 000 and 500 000 deaths per year worldwide, and seasonal influenza occurs regularly each winter in both the Northern and Southern hemispheres. Influenza viruses are members of the Orthomyxiviridae family that represents enveloped RNA viruses. The viruses responsible for seasonal infections are influenza A viruses (IAVs) belonging to the H1N1 and H3N2 subtypes as well as influenza B viruses. The viral hemagglutinin (HA) plays an important role in viral infection. Indeed, a critical step for the production of infective virus is the cleavage of an external loop of the HA0 precursor (arginine 343 at the C-terminal side) by host serine proteases into HA1 and HA2 subunits driving the binding of IAV to sialic acids on the surface of host cells and the virus endocytosis (Neumann and Kawaoka, 2015). Many trypsin-like serine proteases such as type II transmembrane serine proteases (TMPRSS2 and TMPRSS4), human-airway tryptase (HAT), and maptriptase (Böttcher et al., 2006; Bertram et al., 2010; Beaulieu et al., 2013) but also KLK1, 5 and 12 (Hamilton and Whittaker, 2013; Leu et al., 2015; Magnen et al., 2017; Straus and Whittaker, 2017) were identified to cleave HA proteins in vitro and/or in vivo. Besides a direct action of KLK5 and 12 on HA0 cleavage, these kallikreins can activate and cleave plasminogen, pro-uPA and prekallikrein into plasmin, urokinase and plasma kallikrein, respectively. These serine proteases of the fibrinolytic system may subsequently cleave HA0s (Hamilton et al., 2012; Straus and Whittaker, 2017). Several groups have reported a preference of diverse proteases, comprising kallikreins, for the cleavage and activation of certain strains and subtypes of influenza A viruses (Hamilton et al., 2012; Hamilton and Whittaker, 2013; Magnen et al., 2017; Straus and Whittaker, 2017). In fact, KLK5 and 12 preferently activate seasonal viruses of the H3 subtype. As suggested by a recent molecular modelling study, differences in the cleavage site region could explain the preference of KLK5 for certain subtypes. In addition, other parameters such as glycosylation or tridimensional structure probably also influence this preference (Magnen et al., this issue). In humans, IAVs are processed in the respiratory tract and KLK5 amounts were found to be selectively enhanced in tracheal aspirates collected in patients with flu (Magnen et al., 2017). The increase in KLK5 production and secretion by epithelial cells and submucosal glands of airways could help activate non-infectious viral particles of H3N2 and their subsequent spread. Hence, pretreatment of airway secretions by a KLK5-selective inhibitor (cyclic peptide, sunflower trypsin inhibitor-1) significantly reduced activation of non-infectious H3N2 influenza virus (Magnen et al., 2017). In contrast, KLK1 is mainly secreted by neutrophils recruited in inflamed airways and seems to be more limited in activating seasonal viruses.

To evaluate the physiological relevance of kallikreins during influenza, in vivo investigations were performed with murine models. However, this approach has serious limitations. Indeed, Magnen and coworkers demonstrated that mouse KLK5 does not have the same ability as human KLK5 to activate A/Scotland/20/74 virus of the H3N2 subtype (Magnen et al., this issue). Thus, human and mouse orthologs are not functionally equivalent; subtle differences in their structure critically modify their substrate specificity, which could also explain the reported divergences regarding the role of KLK1 in IAV activation. In their study, Leu and colleagues used human kallistatin, a specific inhibitor of KLK1 synthesised in liver, to assess the effects of this protease on the pathogenicity of the H1N1 virus. Lentivirus-mediated kallistatin gene delivery in mice conferred protection against a lethal influenza infection (Leu et al., 2015). The authors also showed that cells transduced with the lentivirus-vector-kallistatin gene inhibited HA subtype H1, H2 and H3 cleavage by rat KLK1. However, a more recent study demonstrated that human KLK1 can not functionally activate viruses belonging to the H1 and H3 subtypes (Magnen et al., 2017). Hence, the assumption that data obtained with mouse models can be transposed to humans is questionned.

KLKs in bacterial infections

Little is known about the role of KLKs in bacterial infections. Only one study of KLK1 showed that its activity was increased in airway secretions from both patients

Brought to you by | Universite de Tours
Authenticated
Download Date | 5/16/19 10:22 AM

undergoing prolonged mechanical ventilation for more than 4 weeks and patients with cystic fibrosis (CF) than in tracheal aspirates from patients under mechanical ventilation for less than 1 week (O'Riordan et al., 2003). In patients with CF, chronic colonisation by Pseudomonas aeruginosa is widely observed, with purulent and hypersecretion of mucus. An increase in elastase activity, highlighting neutrophil activation, was also greater in sputum from CF patients than the other two groups of patients despite similar neutrophil counts. It would now be interesting to identify the inducer of KLK1 expression and elastase secretion in the sputum of patients with CF (O'Riordan et al., 2003). KLK1 and other KLKs may play a role in modulating inflammation due to bacterial infections.

KLKs in lymphangioleiomyomatosis

Lymphangioleiomyomatosis is a rare diffuse cystic lung disease characterised by the proliferation of smooth muscle-like cells, especially in lungs but also in the lymphatic system and kidneys. It affects women and leads to airway obstruction, necrosis of the airway walls and parenchyma destruction (Harari et al., 2011; Pais et al., 2017). In a study evaluating potential biomarkers of lymphangioleiomyomatosis, among 14 proteins differentially expressed in the serum of patients compared to healthy controls, the KLK3 level was significantly increased (Banville et al., 2014).

KLKs in lung cancer

Lung cancer is the leading cause of cancer death worldwide, with 1.69 million deaths in 2015 [World Health Organisation (WHO)]; tobacco smoking is the major risk factor of lung cancer. Data on KLKs and lung cancer concern mainly non-small-cell lung cancer (NSCLC), the most common type of lung cancer, representing about 80% to 85% of cases. The most frequent subtypes are adenocarcinoma and squamous cell carcinoma, which develop from epithelial cells. Carcinoid tumours with low-grade malignancy now classified with neuroendocrine tumours and large cell carcinoma are among the uncommon subtypes of NSCLC. Small-cell lung cancer (SCLC) represents about 15–20% of lung cancer and is growing and spreading faster than NSCLC. Alteration of KLK expression has been described in lung cancer. Most studies aimed to identify KLK transcripts or proteins that could be used as biomarkers for lung cancer diagnosis or prognosis of patient outcomes. In the study by Planque et al. (2008b), the level of 11 KLKs was quantified by ELISA in serum from patients with NSCLC (n = 51) and compared to that of healthy volunteers (n = 50). Levels of KLK5, 7, 8, 10 and 12 were lower in serum from patients with NSCLC, and those of KLK11, 13 and 14 were higher. Furthermore, univariate and multivariate analysis revealed an association between KLK11, 12, 13 and 14 expression and increased risk of NSCLC, which suggests that this panel of KLK could be used for lung cancer diagnosis. Only a few studies have investigated the functional significance of KLK expression in lung tumour using lung cell lines. Here we summarise data obtained for each KLK studied in lung cancer.

KLK1

The distribution of KLK1 according to lung carcinoma subtypes was studied by immunolabelling of a few tumour sections and determination of labelling localisation, the percentage of labelled cells and intensity grade (Chee et al., 2008). A cytoplasmic labelling of KLK1 was detected in 53% of tumour cells in large-cell carcinoma; 64–72% of cells in adenocarcinoma, squamous cell carcinoma and small-cell carcinoma; and in all tumour cells in carcinoid tumour. Nuclear staining of KLK1 was negative in small-cell carcinoma and observed only in some tumours of the other lung carcinoma subtypes. In squamous cell carcinoma, desmosomes and keratinised cells also showed intense labelling for KLK1.

KLK4

Little information is known about KLK4 as regarding lung cancer. Heterogeneous expression of KLK4 mRNA is found in NSCLC tumour tissue samples (Zhu et al., 2017). The authors demonstrated in vitro that hsa-miR-422a is one of the miRNAs that targets KLK4. Moreover, hsa-miR-422a binds the long intergenic non-protein coding RNA 00858 (LINC00858), which acts as a miRNA inhibitor. LINC00858 level is higher in NSCLC tissues and NSCLC cell lines than non-tumour lung tissues and lung epithelial cells, respectively. Overexpression of LINC00858 induced proliferation of lung cancer cell lines. The authors suggested that LINC00858 might facilitate NSCLC progression by regulating the miR-422a-KLK4 pathway.

KLK5 and 7

Intense cytoplasmic labelling of KLK5 and 7 was observed in most tumour cells from squamous cell carcinoma,

Brought to you by | Universite de Tours
Authenticated
Download Date | 5/16/19 10:22 AM

carcinoid tumour, mesothelioma and small cell carcinoma, with no cytoplasmic staining detected in tumour cells of lung adenocarcinoma (Chee et al., 2007; Singh et al., 2008). the KLK5 and 7 were also expressed in the nuclei of 70% of tumour cells from carcinoid tumour and 20% of cells from lung carcinoma.

In lung tumour, the KLK5 mRNA level was significantly higher in squamous cell lung carcinoma tissues than matched non-tumour tissue samples, whereas KLK7 mRNA level was decreased in lung adenocarcinoma (Planque et al., 2005). These observations were obtained from a small number of patients and need to be verified in much larger cohorts.

KLK6

In most lung cancer subtypes (adenocarcinoma, squamous cell carcinoma, carcinoid tumour, mesothelioma and small cell carcinoma) KLK6 staining was in the cytoplasm of tumour cells (Chee et al., 2007; Singh et al., 2008; Nathalie et al., 2009). Nuclear labelling of KLK6 was observed in only tumour cells from mesothelioma (Chee et al., 2007).

A study of a small cohort of patients with NSCLC showed that the expression of KLK6 transcripts was significantly higher in tumour tissues than in matched non-cancerous specimens (Nathalie et al., 2009). Moreover, this high expression was associated with poor overall survival independent of the other risk factors, which suggests a pejorative role of KLK6 in NSCLC. This hypothesis was supported by *in vitro* studies showing increased cell proliferation in A549 lung cancer cells transfected to express KLK6. Cell cycle progression of these cells was accelerated between the G1 and S phases, with upregulation of cyclin E and downregulation of p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinases (Nathalie et al., 2009). In parallel, apoptosis was decreased in A549 cells expressing KLK6. The mechanism proposed is that KLK6 involved the activation of PAR2 and the transactivation of the EGF receptor leading to ERK and Akt signalling and nuclear translocation of β-catenin. These stimulating effects of KLK6 required its proteolytic activity (Michel et al., 2014).

KLK8

KLK8 expression was also mostly localised in the cytoplasm of tumour cells from small cell carcinoma, carcinoid tumour, mesothelioma and squamous cell carcinoma while in lung adenocarcinoma, 20% of tumour cells showed positive nuclear staining (Chee et al., 2007; Singh et al., 2008).

The role of KLK8 was also clarified in lung cancer. Abnormal KLK8 transcripts and/or the KLK8 protein have been found in several malignancies (Magklara et al., 2001; Shigemasa et al., 2004; Liu et al., 2008; Planque et al., 2010). Six alternative mRNA variants encoded by *KLK8* have been described in the lung (Sher et al., 2006; Planque et al., 2010). Type 1 (also named regular) and type 2 mRNA variants (KLK8-T1 and KLK8-T2) produce two zymogens that differ only in their propeptide sequences; in both cases, the final active protein is the KLK8 protease. The other transcripts are predicted or shown to encode peptides more or less related to the KLK8 protease; none of them has the catalytic triad of serine proteases. In NSCLC tissues, the most abundant transcripts are KLK8-T3 and -T4 (Planque et al., 2010). Univariate analysis showed that KLK8, -T3 and -T4 mRNA levels were significantly associated with low survival. Cox multivariate analysis indicated that KLK-T4 transcript was an independent predictor of an unfavourable prognosis in NSCLC.

The role of KLK8 was investigated with CL-1 cells derived from lung adenocarcinoma cells (Sher et al., 2006). Higher expression of KLK8 transcripts was found in CL1-0 cells, which are weakly invasive, than in CL1-5 cells, which are highly invasive. These observations suggest a role of KLK8 in reducing invasion, and this hypothesis was supported by experimental data. Overexpression of KLK8 (KLK8-T1 and KLK8-T2) in the highly invasive lung cell line CL1-5 decreased their invasiveness *in vitro* and reduced subcutaneous tumour growth in SCID mice. The authors also showed fibronectin degradation and weaker adherence in cells expressing KLK8 cultured on a fibronectin-coated surface than with vector-transfected cells. KLK8 also downregulated several signalling pathways including the fibronectin/β-integrin pathway and altered actin cytoskeleton reorganisation, which could reduce the motility of cells.

In summary, the *KLK8* gene generates different transcripts in NSCLC that seem to have opposite functions. Transcripts encoding the protease (KLK8-T1 and -T2) would have a protective action against tumour cell dissemination, whereas the KLK8-T4 transcript would have a pejorative action. Further studies are needed to determine the function of the KLK8-T4 variant and whether a balance between the KLK8 peptidase and KLK8-T4 mRNA or protein is involved in NSCLC progression.

KLK10

Only a few studies have focussed on KLK10 in lung cancer. In a first study of a small cohort of patients with NSCLC,

Brought to you by | Universite de Tours
Authenticated
Download Date | 5/16/19 10:22 AM

KLK10 mRNA level was significantly higher in squamous cell lung carcinoma tissues than matched non-tumour tissue samples. In addition, KLK10 mRNA expression was slightly higher in non-tumour tissue than paired tumour specimens. However, the difference was not statistically significant. Moreover, no association was observed between the variations in KLK10 mRNA expression and the overall survival of patients (Planque et al., 2006). In a more recent study, KLK10 gene expression was downregulated in 57.7% of NSCLC tissues as compared to adjacent non-tumour tissues (Zhang et al., 2011). This downregulation was mainly correlated with hypermethylation of the CpG islands of the KLK10 gene promoter (Zhang et al., 2010). This methylation was associated with advanced stage and lymph metastasis. KLK10 methylation was proposed in a panel of candidate epigenetic biomarkers for NSCLC detection (Zhang et al., 2011). Additionally, methylation of KLK10 DNA from plasma was detected in 38.5% of NSCLC patients and only 4% of cancer-free subjects (Zhang et al., 2010).

The functional role of KLK10 has been studied in vitro. Transfection of A549 lung cancer cells to express KLK10 inhibited their proliferation in a colony-formation assay and migration in a wound-healing assay. Moreover, tumour growth was also reduced when KLK10-expressing cells were injected subcutaneously in nude mice (Zhang et al., 2011).

KLK11

The impact of KLK11 expression in lung cancer was investigated at the transcriptional and protein levels. The first study of KLK11 in lung cancer concerned a microarray experiment including 127 adenocarcinoma lung tumour samples clustered into poorly, moderately and well-differentiated tumours (Bhattacharjee et al., 2001). To define a molecular signature of the different subclasses of adenocarcinoma, 12 600 transcripts were analysed. KLK11 transcripts were expressed only in moderately differentiated tumour tissues of patients with the less favourable outcome. Another study showed no significant difference in KLK11 mRNA expression between matched tumour and non-tumour lung tissues from 47 patients with NSCLC. KLK11 expression was not associated with clinical features of patients or with overall survival (Planque et al., 2006). In another study, KLK11 mRNA expression was found to be lower in lung cancer tissues than in adjacent non-tumour tissues from 64 patients (Sasaki et al., 2006). KLK11 transcript level was higher in bronchiolalveolar carcinoma than in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. Patients with low KLK11 mRNA level had a significantly worse prognosis than those with high expression. Similar data were obtained at the protein level by other authors. Indeed, the overall survival rate of patients with non-metastatic NSCLC treated with chemotherapy was significantly increased for those with strong KLK11 immunostaining of lung cancer cells (Unal et al., 2016).

The clinical value of KLK11 was also investigated at the serum level (Planque et al., 2008b; Xu et al., 2014). In these studies, KLK11 level was higher in patients with NSCLC than in healthy controls. KLK11 expression was found to be significantly associated with an increased risk of NSCLC (Planque et al., 2008b). Furthermore, Cox multivariate analysis indicated that KLK11 was an independent prognostic indicator of progression free survival and overall survival (Xu et al., 2014). However, when KLK11 was examined in a relatively large cohort of patients with lung cancer, heavy smokers and patients with cancers other than lung cancer, KLK11 in serum was not an informative biomarker for lung cancer detection, with an area under the receiver operating characteristic curve close to 0.50 (Diamandis et al., 2011).

KLK12

Expression in the lung of the KLK12 peptidase was first described by Shaw and Diamandis (2007). As for many other KLK genes, KLK12 is known to produce several mRNA isoforms (Kurlender et al., 2005). Some mRNA isoforms have been found in lung squamous cell carcinoma (Kimes, 2014) and the authors suggested that these variants could serve as transcriptional cancer markers in applications of clinical interest as previously described in breast cancer (Talieri et al., 2012). Alterations of KLK12 mRNA expression in NSCLC were identified in a small cohort of patients with adenocarcinoma or squamous cell carcinoma (Guillon-Munos et al., 2011) and in pulmonary carcinoid tumours (Swarts et al., 2013). In both studies, KLK12 expression was significantly higher in tumour than matched non-tumour tissue samples. Furthermore, in patients with carcinoid tumours, high expression of KLK12 mRNA was associated with a worse outcome (Swarts et al., 2013). KLK12 level was quantified in the serum of patients with NSCLC. KLK12 expression was lower in serum of NSCLC patients than healthy individuals. Moreover, low KLK12 level was significantly associated with increased risk of lung cancer (Planque et al., 2008b).

The physiological role of KLK12 in the respiratory tract is not yet fully understood, but recent evidence points to

Brought to you by | Universite de Tours
Authenticated
Download Date | 5/16/19 10:22 AM

a role in the control of angiogenesis. The pro-angiogenic effect of KLK12 was first observed in lung endothelial microvascular cells with tubule-like formation on Matrigel™ (Kryza et al., 2013). The authors showed that this effect was not related to a kinin-mediated activation of the kinin B2 receptor. Indeed, KLK12 has very low kininogenase activity due to the cleavage resistance of the N-terminal side of the kinin sequence. Moreover, in in vitro studies, the same authors demonstrated the release of extracellular matrix or membrane-bound platelet-derived growth factor B (PDGF-B) from lung endothelial cells after KLK12 cleavage (Kryza et al., 2014). KLK12 also upregulates PDGF release from NSCLC cells. PDGF-B release induces vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion by lung fibroblasts and leads to capillary tube-like formation by lung endothelial cells. KLK12 also has proteolytic activity against matricellular proteins belonging to the CCN family, which bind growth factors such as VEGF (Guillon-Munos et al., 2011). CCN1 reduced migration of A549 lung tumour cells in a wound-healing assay, whereas KLK12-cleaved CCN1 abolished this effect. Thus, KLK12 is involved in the regulation of growth factor bioavailability implicated in angiogenesis or cell migration.

KLK13 and KLK14

Immunoreactivity of KLK13 and 14 proteins was found to be diffuse in the cytosolic and perinuclear regions of malignant cells from several NSCLC subtypes (adenocarcinoma, squamous cell carcinoma and large cell carcinoma). In some specimens, inflammatory cells were also stained (Planque et al., 2008a).

In lung, KLK13 staining was observed in 68.2% of NSCLC tissues and was significantly higher in adenocarcinoma than squamous cell carcinoma (Planque et al., 2008a). High KLK13 mRNA or protein expression was associated with positive node status. In another cohort of 128 NSCLC patients, KLK13 mRNA level was found higher in tumour tissue than paired non-malignant tissue for 59.3% of cases. Patients with high KLK13 mRNA expression had favourable overall survival (Gueugnon et al., 2015). KLK13 transcripts were also found to be upregulated in lung adenocarcinoma cell lines but were undetectable in lung normal cell lines (Chou et al., 2011). This lack of expression in normal cells was associated with the hypermethylation of the CpG islands of the KLK13 promoter region. In the low invasive cell line CL1-0, CpG sites were moderately methylated and were hypomethylated in the high invasive cell line CL1-5, so demethylation could occur during cancer progression.

Overexpression of KLK13 in cell lines promoted their invasiveness and migration in vitro and in vivo and increased lung nodules in SCID mice with a tail-vein injection of cells expressing KLK13 versus parental cells. With an extracellular matrix degradation assay, cells overexpressing KLK13 were able to degrade laminin but not fibronectin, and N-cadherin level was significantly increased in these cells, which favoured their motility. These results could explain how KLK13 promotes tumour activity (Chou et al., 2011).

Little is known about the expression and role of KLK14 in lung cancer. The study of a small cohort of patients with NSCLC revealed positive KLK14 staining in 90.9% of tumour tissues, but the level of KLK14 expression was not associated with survival rate (Planque et al., 2008a).

KLK13 and 14 levels were higher in the serum of patients with NSCLC than in control serum and were significantly associated with an increased risk of NSCLC (Planque et al., 2008b).

Conclusions and future perspectives

All these studies have shown that KLKs are not only involved in lung tumours but also play proven or probable roles in chronic lung diseases (asthma, COPD, etc.) by affecting inflammation and tissue remodelling and also by promoting viral and bacterial infections.

Several studies have shown that dysregulation of KLK expression occurs in lung cancer and that KLKs may be relevant biomarkers for lung cancer diagnosis or prognosis. However, for most of the KLKs only single reports have been published. Furthermore, the small size of the cohort used in different studies, the lack of homogeneity of the cancer subtypes included in these cohorts and the use of different investigative methods make repeated studies difficult to compare. To evaluate the real clinical utility of the proposed biomarkers, we now need validation of multiple markers (KLK gene and protein expression, miRNAs targeting KLK) in large samples sizes from independent patient sets based on standard operating procedures with clinical data stored in an annotated database (Pasic et al., 2015). KLKs are undoubtedly involved in pathogenesis of lung cancers, but drawing a general diagram of their actions is difficult. Some KLKs have protumour effects whereas others ensure tumour suppressor functions. These various actions could be explained in part by the influence of the tumour microenvironment on cancer progression. Further studies are clearly needed to elucidate the role of KLKs in each subtype of lung cancer.

Brought to you by | Universite de Tours
Authenticated
Download Date | 5/16/19 10:22 AM

Considering the involvement of KLKs in various physiological and pathological processes, KLKs appear to be potential therapeutic targets in inflammatory diseases, virus infections and cancer affecting the respiratory tract. To date, most of the KLK-targeted therapeutics including KLK inhibitors (peptides and antibodies), cancer vaccines (PROSTVAC) and immunotherapies (TRICOM), KLK-activated pro-drugs and KLK-targeting aptamers have been developed and evaluated for treating prostate tumours and skin lesions (Prassas et al., 2015; Avgeris and Scorilas, 2016; Masurier et al., 2018). So far, only KLK1 targeting has been examined in the lung. Administration of a KLK1-inhibitory antibody (DX-2300) in an allergic sheep model of asthma considerably reduced mucus cell proliferation and hypersecretion by inhibiting oxidative-stress-induced EGF receptor activation previously shown to be mediated by KLK1. Moreover, DX2300 inhibited the allergen late-phase bronchoconstriction and hyperactivity of the airway response to carbachol (Sexton et al., 2009). Synthetic high-affinity inhibitors of KLK1 were obtained after a chemical modification of the KLK1 natural substrate low-molecular-weight kininogen and particularly the sequence Pro387-Phe388-Arg389-Ser390 cleaved by KLK1 (Evans et al., 1996; Sotiropoulou and Pampalakis, 2012). After modifying this sequence, the optimised peptide (FE999024) reduced eosinophilia during allergic inflammation and attenuated the effect of parainfluenza virus-induced lung inflammation in a guinea-pig model (Evans et al., 1996; Broadley et al., 2010).

Further investigations to precisely understand the pathophysiology of KLKs and their yin and yang effects in the lung are crucial to develop new therapies for asthma, infectious diseases and COPD associated or not with bronchopulmonary cancer.

Acknowledgements: We particularly thank Laura Smales for editing the English text. Studies conducted by our team were supported by the 'Ligue Contre le Cancer' and we especially thank the Departmental committees of Indre et Loire, Morbihan, Maine et Loire, Deux-Sèvres, Indre, and Cher.

References

Abraham, W.M., Scuri, M., and Farmer, S.G. (2006). Peptide and non-peptide bradykinin receptor antagonists: role in allergic airway disease. Eur. J. Pharmacol. 533, 215–221.

Aubier, M., Thabut, G., Hamidi, F., Guillou, N., Brard, J., Dombret, M.C., Borensztajn, K., Aitilaine, B., Poirier, I., Roland-Nicaise, P., et al. (2016). Airway smooth muscle enlargement is associated with protease-activated receptor 2/ligand overexpression in patients with difficult-to-control severe asthma. J. Allergy Clin. Immunol. 138, 729–739.

Avgeris, M. and Scorilas, A. (2016). Kallikrein-related peptidases (KLKs) as emerging therapeutic targets: focus on prostate cancer and skin pathologies. Expert Opin. Ther. Targets 20, 801–818.

Bagdonas, E., Raudoniute, J., Bruzauskaite, I., and Aldonyte, R. (2015). Novel aspects of pathogenesis and regeneration mechanisms in COPD. Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis. 10, 995–1013.

Banville, N., Burgess, J.K., Jaffar, J., Tjin, G., Richeldi, L., Cerri, S., Persiani, E., Black, J.L., and Oliver, B.G. (2014). A quantitative proteomic approach to identify significantly altered protein networks in the serum of patients with lymphangioleiomyomatosis (LAM). PLoS One 9, e105365.

Beaulieu, A., Gravel, É., Cloutier, A., Marois, I., Colombo, É., Désilets, A., Verreault, C., Leduc, R., Marsault, É., and Richter, M.V. (2013). Matriptase proteolytically activates influenza virus and promotes multicycle replication in the human airway epithelium. J. Virol. 87, 4237–4251.

Bertram, S., Glowacka, I., Blazejewska, P., Soilleux, E., Allen, P., Danisch, S., Steffen, I., Choi, S.Y., Park, Y., Schneider, H., et al. (2010). TMPRSS2 and TMPRSS4 facilitate trypsin-independent spread of influenza virus in Caco-2 cells. J. Virol. 84, 10016–10025.

Bhattacharjee, A., Richards, W.G., Staunton, J., Li, C., Monti, S., Vasa, P., Ladd, C., Beheshti, J., Bueno, R., Gillette, M., et al. (2001). Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 13790–13795.

Böttcher, E., Matrosovich, T., Beyerle, M., Klenk, H.D., Garten, W., and Matrosovich, M. (2006). Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium. J. Virol. 80, 9896–9898.

Broadley, K.J., Blair, A.E., Kidd, E.J., Bugert, J.J., and Ford, W.R. (2010). Bradykinin-induced lung inflammation and bronchoconstriction: role in parainfluenze-3 virus-induced inflammation and airway hyperreactivity. J. Pharmacol. Exp. Ther. 335, 681–692.

Casalino-Matsuda, S.M., Monzon, M.E., Conner, G.E., Salathe, M., and Forteza, R.M. (2004). Role of hyaluronan and reactive oxygen species in tissue kallikrein-mediated epidermal growth factor receptor activation in human airways. J. Biol. Chem. 279, 21606–21616.

Casalino-Matsuda, S.M., Monzón, M.E., and Forteza, R.M. (2006). Epidermal growth factor receptor activation by epidermal growth factor mediates oxidant-induced goblet cell metaplasia in human airway epithelium. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 34, 581–591.

Castillo, J.R., Peters, S.P., and Busse, W.W. (2017). Asthma exacerbations: pathogenesis, prevention, and treatment. J. Allergy Clin. Immunol. Pract. 5, 918–927.

Chee, J., Singh, J., Naran, A., Misso, N.L., Thompson, P.J., and Bhoola, K.D. (2007). Novel expression of kallikreins, kallikrein-related peptidases and kinin receptors in human pleural mesothelioma. Biol. Chem. 388, 1235–1242.

Chee, J., Naran, A., Misso, N.L., Thompson, P.J., and Bhoola, K.D. (2008). Expression of tissue and plasma kallikreins and kinin B1 and B2 receptors in lung cancer. Biol. Chem. 389, 1225–1233.

Brought to you by | Universite de Tours
Authenticated
Download Date | 5/16/19 10:22 AM

Chou, R.H., Lin, S.C., Wen, H.C., Wu, C.W., and Chang, W.S. (2011). Epigenetic activation of human kallikrein 13 enhances malignancy of lung adenocarcinoma by promoting N-cadherin expression and laminin degradation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 409, 442–447.

Chow, T.F., Crow, M., Earle, T., El-Said, H., Diamandis, E.P., and Yousef, G.M. (2008). Kallikreins as microRNA targets: an in silico and experimental-based analysis. Biol. Chem. 389, 731–738.

Christiansen, S.C., Proud, D., Sarnoff, R.B., Juergens, U., Cochrane, C.G., and Zuraw, B.L. (1992). Elevation of tissue kallikrein and kinin in the airways of asthmatic subjects after endobronchial allergen challenge. Am. Rev. Respir. Dis 145, 900–905.

Christiansen, S.C., Eddleston, J., Bengtson, S.H., Jenkins, G.R., Sarnoff, R.B., Turner, R.B., Gwaltney, J.M., and Zuraw, B.L. (2008). Experimental rhinovirus infection increases human tissue kallikrein activation in allergic subjects. Int. Arch. Allergy Immunol. 147, 299–304.

Chung, H., Hamza, M., Oikonomopoulou, K., Gratio, V., Saifeddine, M., Virca, G.D., Diamandis, E.P., Hollenberg, M.D., and Darmoul, D. (2012). Kallikrein-related peptidase signaling in colon carcinoma cells: targeting proteinase-activated receptors. Biol. Chem. 393, 413–420.

Diamandis, E.P., Goodglick, L., Planque, C., and Thornquist, M.D. (2011). Pentraxin-3 is a novel biomarker of lung carcinoma. Clin. Cancer Res. 17, 2395–2399.

Evans, D.M., Jones, D.M., Pitt, G.R., Ashworth, D., De Clerck, F., Verheyen, F., and Szelke, M. (1996). Synthetic inhibitors of human tissue kallikrein. Immunopharmacology 32, 117–118.

Evans, C.M., Raclawska, D.S., Ttofali, F., Liptzin, D.R., Fletcher, A.A., Harper, D.N., McGing, M.A., McElwee, M.M., Williams, O.W., Sanchez, E., et al. (2015). The polymeric mucin Muc5ac is required for allergic airway hyperreactivity. Nat. Commun. 6, 6281–6306.

Forteza, R., Lauredo, I., Abraham, W.M., and Conner, G.E. (1999). Bronchial tissue kallikrein activity is regulated by hyaluronic acid binding. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 21, 666–674.

Forteza, R., Conner, G.E., and Salathe, M. (2004). Hyaluronan in the airways. In: Chemistry and Biology of Hyaluronan, Lung Biology in Health and Disease, H.G. Garg, and C.A. Hales, eds. (Oxford, UK: Elsevier), pp. 323–337.

Gao, L., Chao, L., and Chao, J. (2010). A novel signaling pathway of tissue kallikrein in promoting keratinocyte migration: activation of proteinase-activated receptor 1 and epidermal growth factor receptor. Exp. Cell. Res. 316, 376–389.

Goettig, P., Magdolen, V., and Brandstetter, H. (2010). Natural and synthetic inhibitors of kallikrein-related peptidases (KLKs). Biochimie 92, 1546–1567.

Gueugnon, F., Barascu, A., Mavridis, K., Petit-Courty, A., Marchand-Adam, S., Gissot, V., Scorilas, A., Guyetant, S., and Courty, Y. (2015). Kallikrein-related peptidase 13: an independent indicator of favorable prognosis for patients with nonsmall cell lung cancer. Tumour Biol. 36, 4979–4986.

Guillon-Munos, A., Oikonomopoulou, K., Michel, N., Smith, C.R., Petit-Courty, A., Canepa, S., Reverdiau, P., Heuzé-Vourc'h, N., Diamandis, E.P., and Courty, Y. (2011). Kallikrein-related peptidase 12 hydrolyzes matricellular proteins of the CCN family and modifies interactions of CCN1 and CCN5 with growth factors. J. Biol. Chem. 286, 25505–25518.

Hamilton, B.S. and Whittaker, G.R. (2013). Cleavage activation of human-adapted influenza virus subtypes by kallikrein-related peptidases 5 and 12. J. Biol. Chem. 288, 17399–17407.

Hamilton, B.S., Gludish, D.W., and Whittaker, G.R. (2012). Cleavage activation of the human-adapted influenza virus subtypes by matriptase reveals both subtype and strain specificities. J. Virol. 86, 10579–10586.

Harari, S., Torre, O., and Moss, J. (2011). Lymphangioleiomyomatosis: what do we know and what are we looking for? Eur. Respir. Rev. 20, 34–44.

Hewson, C.A., Haas, J.J., Bartlett, N.W., Message, S.D., Laza-Stanca, V., Kebadze, T., Caramori, G., Zhu, J., Edbrooke, M.R., Stanciu, L.A., et al. (2010). Rhinovirus induces MUC5AC in a human infection model and in vitro via NF-κB and EGFR pathways. Eur. Respir. J. 36, 1425–1435.

Ichinose, M. (2003). Inflamatory mechanisms in bronchial asthma and COPD. Tohoku J. Exp. Med. 200, 1–6.

Johnson, J.J., Miller, D.L., Jiang, R., Liu, Y., Shi, Z., Tarwater, L., Williams, R., Balsara, R., Sauter, E.R., and Stack, M.S. (2016). Protease-activated receptor-2 (PAR-2)-mediated Nf-κB activation suppresses inflammation-associated tumor suppressor microRNAs in oral squamous cell carcinoma. J. Biol. Chem. 291, 6936–6945.

Kalinska, M., Meyer-Hoffert, U., Kantyka, T., and Potempa, J. (2016). Kallikreins – the melting pot of activity and function. Biochimie 122, 270–282.

Kimes, P.K. (2014). SigFuge: single gene clustering of RNA-seq reveals differential isoform usage among cancer samples. Nucleic Acids Res. 42, 1–12.

Kodak, J.A., Mann, D.L., Klyushnenkova, E.N., and Alexander, R.B. (2006). Activation of innate immunity by prostate specific antigen (PSA). Prostate 66, 1592–1599.

Kryza, T., Lalmanach, G., Lavergne, M., Lecaille, F., Reverdiau, P., Courty, Y., and Heuzé-Vourc'h, N. (2013). Pro-angiogenic effect of human kallikrein-related peptidase 12 (KLK12) in lung endothelial cells does not depend on kinin-mediated activation of B2 receptor. Biol. Chem. 394, 385–391.

Kryza, T., Achard, C., Parent, C., Marchand-Adam, S., Guillon-Munos, A., Iochmann, S., Korkmaz, B., Respaud, R., Courty, Y., and Heuzé-Vourc'h, N. (2014). Angiogenesis stimulated by human kallikrein-related peptidase 12 acting via a platelet-derived growth factor B-dependent paracrine pathway. FASEB J. 28, 740–751.

Kryza, T., Silva, M.L., Loessner, D., Heuzé-Vourc'h, N., and Clements, J.A. (2016). The kallikrein-related peptidase family: dysregulation and functions during cancer progression. Biochimie 122, 283–299.

Kurlender, L., Borgono, C., Michael, I.P., Obiezu, C., Elliott, M.B., Yousef, G.M., and Diamandis, E.P. (2005). A survey of alternative transcripts of human tissue kallikrein genes. Biochim. Biophys. Acta 1755, 1–14.

Lai, J., An, J., Srinivasan, S., Clements, J.A., and Batra, J. (2016). A computational analysis of the genetic and transcript diversity at the kallikrein locus. Biol. Chem. 397, 1307–1313.

Lauredo, I.T., Forteza, R.M., Botvinnikova, Y., and Abraham, W.M. (2004). Leukocytic cell sources of airway tissue kallikrein. Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 286, 734–740.

Lee, M.K., Hong, Y., Kim, S.Y., Kim, W.J., and London, S.J. (2017). Epigenome-wide association study of chronic obstructive pulmonary disease and lungfunction in Koreans. Epigenomics 9, 971–984.

Leu, C.H., Yang, M.L., Chung, N.H., Huang, Y.J., Su, Y.C., Chen, Y.C., Lin, C.C., Shieh, G.S., Chang, M.Y., Wang, S.W., et al. (2015).

Brought to you by | Universite de Tours
Authenticated
Download Date | 5/16/19 10:22 AM

Kallistatin ameliorates influenza virus pathogenesis by inhibition of kallikrein-related peptidase 1-mediated cleavage of viral hemagglutinin. Antimicrob. Agents Chemother. 59, 5619–5630.
Liu, C.J., Liu, T.Y., Kuo, L.T., Cheng, H.W., Chu, T.H., Chang, K.W., and Lin, S.C. (2008). Differential gene expression signature between primary and metastatic head and neck squamous cell carcinoma. J. Pathol. 214, 489–497.
Magklara, A., Scorilas, A., Katsaros, D., Massobrio, M., Yousef, G.M., Fracchioli, S., Danese, S., and Diamandis, E.P. (2001). The human KLK8 (neuropsin/ovasin) gene: identification of two novel splice variants and its prognostic value in ovarian cancer. Clin. Cancer Res. 7, 806–811.
Magnen, M., Gueugnon, F., Guillon, A., Baranek, T., Thibault, V.C., Petit-Courty, A., de Veer, S.J., Harris, J., Humbles, A.A., Si-Tahar, M., et al. (2017). Kallikrein-related peptidase 5 contributes to H3N2 influenza virus infection in human lungs. J. Virol. 91, e00421–17.
Masurier, N., Arama, D.P., El Amri, C., and Lisowski, V. (2018). Inhibitors of kallikrein-related peptidases: an overview. Med. Res. Rev. 38, 655–683.
Michel, N., Heuzé-Vourc'h, N., Lavergne, E., Parent, C., Jourdan, M.L., Vallet, A., Iochmann, S., Musso, O., Reverdiau, P., and Courty, Y. (2014). Growth and survival of lung cancer cells: regulation by kallikrein-related peptidase 6 via activation of proteinase-activated receptor 2 and the epidermal growth factor receptor. Biol. Chem. 395, 1015–1025.
Minor, D.M. and Proud, D. (2017). Role of human rhinovirus in triggering human airway epithelial-mesenchymal transition. Respir. Res. 18, 1–16.
Mize, G.J., Wang, W., and Takayama, T.K. (2008). Prostate-specific kallikreins-2 and -4 enhance the proliferation of DU-145 prostate cancer cells through protease-activated receptors-1 and -2. Mol. Cancer Res. 6, 1043–1051.
Monzón, M.E., Manzanares, D., Schmid, N., Casalino-Matsuda, S.M., and Forteza, R.M. (2008). Hyaluronidase expression and activity is regulated by pro-inflammatory cytokines in human airway epithelial cells. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 39, 289–295.
Myers, R.A., Himes, B.E., Gignoux, G.R., Yang, J.J., Gauderman, W.J., Rebordosa, C., Xie, J., Torgerson, D.G., Levin, A.M., Baurley, J., et al. (2012). Further replication studies of the EVE Consortium meta-analysis identifies 2 asthma risk loci in European Americans. J. Allergy Clin. Immunol. 130, 1294–1301.
Nathalie, H.V., Chris, P., Serge, G., Catherine, C., Benjamin, B., Claire, B., Christelle, P., Briollais, L., Pascale, R., Marie-Lise, J., et al. (2009). High kallikrein-related peptidase 6 in non-small cell lung cancer cells: an indicator of tumour proliferation and poor prognosis. J. Cell Mol. Med. 13, 4014–4022.
Naveed, S.U., Clements, D., Jackson, D.J., Philp, C., Billington, C.K., Soomro, I., Reynolds, C., Harrison, T.W., Johnston, S.L., Shaw, D.E., et al. (2017). Matrix metalloproteinase-1 activation contributes to airway smooth muscle growth and asthma severity. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 195, 1000–1009.
Neumann, G. and Kawaoka, Y. (2015). Transmission of influenza A viruses. Virology 1, 234–246.
Oikonomopoulou, K., Hansen, K.K., Saifeddine, M., Tea, I., Blaber, M., Blaber, S.I., Scarisbrick, I., Andrade-Gordon, P., Cottrell, G.S., Bunnett, N.W., et al. (2006). Proteinase-activated receptors, targets for kallikrein signaling. J. Biol. Chem. 281, 32095–32112.
O'Riordan, T.G., Weinstein, M.D., Abraham, W.M., and Forteza, R. (2003). Elevated tissue kallikrein activity in airway secretions from patients with tracheobronchitis associated with prolonged mechanical ventilation. Lung 181, 237–244.
Ozge, C., Bozlu, M., Ozgur, E.S., Tek, M., Tunckiran, A., Muslu, N., and Ilvan, A. (2015). The impact of hypoxemia on serum total and free prostate-specific antigen levels in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Med. Oncol. 32, 156–159.
Pais, F., Fayed, M., and Evans, T. (2017). Lymphangioleiomyomatosis: an explosive presentation of a rare disease. Oxf. Med. Case Reports 6, 92–94.
Pasic, M.D., Sotiropoulou, G., and Yousef, G.M. (2015). The miRNA-kallikrein interactions: adding a new dimension. Cell Cycle 14, 691–692.
Petraki, C.D., Papanastasiou, P.A., Karavana, V.N., and Diamandis, E.P. (2006). Cellular distribution of human tissue kallikreins: immunohistochemical localization. Biol. Chem. 387, 653–663.
Planque, C., de Monte, M., Guyetant, S., Rollin, J., Desmazes, C., Panel, V., Lemarié, E., and Courty, Y. (2005). KLK5 and KLK7, two members of the human tissue kallikrein family, are differentially expressed in lung cancer. Biochem. Biophys. Res. Commun. 329, 1260–1266.
Planque, C., Aïncîburu, M., Heuzé-Vourc'h, N., Régina, S., de Monte, M., and Courty, Y. (2006). Expression of the human kallikrein genes 10 (KLK10) and 11 (KLK11) in cancerous and non-cancerous lung tissues. Biol. Chem. 387, 783–788.
Planque, C., Bléchet, C., Ayadi-Kaddour, A., Heuzé-Vourc'h, N., Dumont, P., Guyétant, S., Diamandis, E.P., El Mezni, F., and Courty, Y. (2008a). Quantitative RT-PCR analysis and immunohistochemical localization of the kallikrein-related peptidases 13 and 14 in lung. Biol. Chem. 389, 781–786.
Planque, C., Li, L., Zheng, Y., Soosaipillai, A., Reckamp, K., Chia, D., Diamandis, E.P., and Goodglick, L. (2008b). A multiparametric serum kallikrein panel for diagnosis of non-small cell lung carcinoma. Clin. Cancer Res. 14, 1355–1362.
Planque, C., Choi, Y.H., Guyetant, S., Heuzé-Vourc'h, N., Briollais, L., and Courty, Y. (2010). Alternative splicing variant of kallikrein-related peptidase 8 as an independent predictor of unfavorable prognosis in lung cancer. Clin. Chem. 56, 987–997.
Prassas, I., Eissa, A., Poda, G., and Diamandis, E.P. (2015). Unleashing the therapeutic potential of human kallikrein-related serine proteases. Nat. Rev. Drug Discov. 14, 183–202.
Proud, D. (1998). The kinin system in rhinitis and asthma. Clin. Rev. Allergy Immunol. 16, 351–364.
Ramachandran, R., Altier, C., Oikonomopoulou, K., and Hollenberg, M.D. (2016). Proteinases, their extracellular targets, and inflammatory signaling. Pharmacol. Rev. 68, 1110–1142.
Ramsay, A.J., Dong, Y., Hunt, M.L., Linn, M., Samaratunga, H., Clements, J.A., and Hooper, J.D. (2008). Kallikrein-related peptidase 4 (KLK4) initiates intracellular signaling via protease-activated receptors (PARs). KLK4 and PAR-2 are co-expressed during prostate cancer progression. J. Biol. Chem. 283, 12293–12304.
Ricciardolo, F.L.M., Sabatini, F., Sorbello, V., Benedetto, S., Dephilippi, I., Petecchia, L., Usai, C., Gnemmi, I., Balbi, B., De Rose, V., et al. (2013). Expression of vascular remodeling markers in relation to bradykinin receptors in asthma and COPD. Thorax 68, 803–811.
Ricciardolo, F.L., Petecchia, L., Sorbello, V., Di Stefano, A., Usai, C., Massaglia, G.M., Gnemmi, I., Mognetti, B., Hiemstra, P.S.,

Brought to you by | Universite de Tours
Authenticated
Download Date | 5/16/19 10:22 AM

Sterk, P.J., et al. (2015). Bradykinin B2 receptor expression in the bronchial mucosa of allergic asthmatics: the role of NF-κB. Clin. Exp. Allergy 46, 428–438.
Sasaki, H., Kawano, O., Endo, K., Suzuki, E., Haneda, H., Yukiue, H., Kobayashi, Y., Yano, M., and Fujii, Y. (2006). Decreased kallikrein 11 messenger RNA expression in lung cancer. Clin. Lung Cancer 8, 45–48.
Seiz, L., Kotzsch, M., Grebenchtchikov, N.I., Geurts-Moespot, A.J., Fuessel, S., Goettig, P., Gkazepis, A., Wirth, M.P., Schmitt, M., Lossnitzer, A., et al. (2010). Polyclonal antibodies against kallikrein-related peptidase 4 (KLK4): immunohistochemical assessment of KLK4 expression in healthy tissues and prostate cancer. Biol. Chem. 391, 391–401.
Sexton, D.J., Chen, T., Martik, D., Kuzmic, P., Kuang, G., Chen, J., Nixon, A.E., Zuraw, B.L., Forteza, R.M., Abraham, W.M., et al. (2009). Specific inhibition of tissue kallikrein 1 with a human monoclonal antibody reveals a potential role in airway diseases. Biochem. J. 422, 383–392.
Shariff, S., Shelfoon, C., Holden, N.S., Traves, S.L., Wiehler, S., Kooi, C., Proud, D., and Leigh, R. (2017). Human rhinovirus infection of epithelial cells modulates airway smooth muscle migration. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 56, 796–803.
Shaw, J.L. and Diamandis, E.P. (2007). Distribution of 15 human kallikreins in tissues and biological fluids. Clin. Chem. 53, 1423–1432.
Shelfoon, C., Shariff, S., Traves, S.L., Kooi, C., Leigh, R., and Proud, D. (2016). Chemokine release from human rhinovirus-infected airway epithelial cells promotes fibroblast migration. J. Allergy Clin. Immunol. 138, 114–122.
Sher, Y.P., Chou, C.C., Chou, R.H., Wu, H.M., Chang, W.S., Chen, C.H., Yang, P.C., Wu, C.W., Yu, C.L., and Peck, K. (2006). Human kallikrein 8 protease confers a favorable clinical outcome in non-small cell lung cancer by suppressing tumor cell invasiveness. Cancer Res. 66, 11763–11770.
Shigemasa, K., Tian, X., Gu, L., Tanimoto, H., Underwood, L.J., O'Brien, T.J., and Ohama, K. (2004). Human kallikrein 8 (hK8/TADG-14) expression is associated with an early clinical stage and favorable prognosis in ovarian cancer. Oncol. Rep. 11, 1153–1159.
Singh, J., Naran, A., Misso, N.L., Rigby, P.J., Thompson, P.J., and Bhoola, K.D. (2008). Expression of kallikrein-related peptidases (KRP/hK5, 7, 6, 8) in subtypes of human lung carcinoma. Int. Immunopharmacol. 8, 300–306.
Sotiropoulou, G. and Pampalakis, G. (2012). Targeting the kallikrein-related peptidases for drug development. Trends Pharmacol. Sci. 33, 623–634.
Stefansson, K., Brattsand, M., Roosterman, D., Kempkes, C., Bocheva, G., Steinhoff, M., and Egelrud, T. (2008). Activation of proteinase-activated receptor-2 by human kallikrein-related peptidases. J. Invest. Dermatol. 128, 18–25.
Straus, M.R. and Whittaker, G.R. (2017). A peptide-based approach to evaluate the adaptability of influenza A virus to humans based on its hemagglutinin proteolytic cleavage site. PLoS One 12, e0174827.
Swarts, D.R., Van Neste, L., Henfling, M.E., Eijkenboom, I., Eijk, P.P., van Velthuysen, M.L., Vink, A., Volante, M., Ylstra, B., Van Criekinge, W., et al. (2013). An exploration of pathways involved in lung carcinoid progression using gene expression profiling. Carcinogenesis 34, 2726–2737.
Tacon, C.E., Wiehler, S., Holden, N.S., Newton, R., Proud, D., and Leigh, R. (2010). Human rhinovirus infection up-regulates MMP-9 production in airway epithelial cells via NF-κB. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 243, 201–209.
Taggart, C., Mall, M.A., Lalmanach, G., Cataldo, D., Ludwig, A., Janciauskiene, S., Heath, N., Meiners, S., Overall, C.M., Schultz, C., et al. (2017). Protean proteases: at the cutting edge of lung diseases. Eur. Respir. J. 49, 1–12.
Talieri, M., Devetzi, M., Scorilas, A., Pappa, E., Tsapralis, N., Missitzis, I., and Ardavanis, A. (2012). Human kallikrein-related peptidase 12 (KLK12) splice variants expression in breast cancer and their clinical impact. Tumour Biol. 33, 1075–1084.
Unal, D., Eroglu, C., Tasdemir, A., Karaman, H., Kurtul, N., Oguz, A., Goksu, S.S., and Kaplan, B. (2016). Is human kallikrein 11 in non-small cell lung cancer treated chemoradiotherapy associated with survival? Cancer Res. Treat. 48, 98–105.
Van Leuven, J.T., Ridenhour, B.J., Gonzalez, A.J., Miller, C.R., and Miura, T.A. (2017). Lung epithelial cells have virus-specific and shared gene expression responses to infection by diverse respiratory viruses. PLoS One 12, e0178408.
Venanzi, S., Malerba, G., Galavotti, R., Lauciello, M.C., Trabetti, E., Zanoni, G., Pescollderungg, L., Martinati, L.C., Boner, A.L., and Pignatti, P.F. (2001). Linkage to atopy on chromosome 19 in north-eastern Italian families with allergic asthma. Clin. Exp. Allergy 31, 1220–1224.
Wadsworth, S., Sin, D., and Dorscheid, D. (2011). Clinical update on the use of biomarkers of airway inflammation in the management of asthma. J. Asthma Allergy 4, 77–86.
Xu, C.H., Zhang, Y., Yu, L.K. (2014). The diagnostic and prognostic value of serum human kallikrein-related peptidases 11 in non-small cell lung cancer. Tumour Biol. 35, 5199–5203.
Yiu, W.H., Wong, D.W., Chan, L.Y., Leung, J.C., Chan, K.W., Lan, H.Y., Lai, K.N., and Tang, S.C. (2014). Tissue kallikrein mediates pro-inflammatory pathways and activation of protease-activated receptor-4 in proximal tubular epithelial cells. PLoS One 9, e88894.
Zhang, Y., Song, H., Miao, Y., Wang, R., and Chen, L. (2010). Frequent transcriptional inactivation of Kallikrein 10 gene by CpG island hypermethylation in non-small cell lung cancer. Cancer Sci. 101, 934–940.
Zhang, Y., Wang, R., Song, H., Huang, G., Yi, J., Zheng, Y., Wang, J., and Chen, L. (2011). Methylation of multiple genes as a candidate biomarker in non-small cell lung cancer. Cancer Lett. 303, 21–28.
Zhu, S.P., Wang, J.Y., Wang, X.G., and Zhao, J.P. (2017). Long intergenic non-protein coding RNA 00858 functions as a competing endogenous RNA for miR-422a to facilitate the cell growth in non-small cell lung cancer. Aging 9, 475–486.

Brought to you by | Universite de Tours
Authenticated
Download Date | 5/16/19 10:22 AM

B. La Bronchopneumopathie Chronique Obstructive

Parmi les pathologies pulmonaires, la Bronchopneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) est une maladie inflammatoire chronique, principalement causée par le tabagisme. Ce syndrome regroupe en réalité la bronchite chronique et l'emphysème, lequel se caractérise par une destruction des alvéoles. La BPCO est multifactorielle et associe inflammation chronique et remodelage qui conduisent à une production excessive de mucus et un épaississement de la paroi des bronches. Ces processus aboutissent à une obstruction progressive et partiellement irréversible des voies aériennes. L'importance et la complexité de cette pathologie, qui est un enjeu de santé publique, supposent une coordination mondiale. Dans ce sens, le groupe GOLD, constitué de spécialistes du monde entier, publie régulièrement un rapport qui vise à partager un ensemble d'informations sur les différents programmes concernant la stratégie pour le diagnostic, la gestion et la prévention de la BPCO (*Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, report 2021*).

I. Epidémiologie de la BPCO

1. La BPCO comme problématique de santé publique

La BPCO est l'une des principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde. Cette pathologie touche environ 44 millions de personnes dans le monde, soit 4 à 10% de la population adulte de plus de 45 ans. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, la BPCO deviendrait la 3ème cause de mortalité dans le monde en 2030. En France, environ 3,5 millions de personnes en sont atteintes, mais ce chiffre est sous-estimé car un grand nombre de patients n'est pas diagnostiqué. Environ 18 000 décès sont attribués à la BPCO tous les ans en France. Ces chiffres font de la BPCO une réelle problématique de santé publique dans le monde et en France.

2. Principales causes et facteurs de risque de la BPCO

De nombreuses études montrent que la BPCO est une pathologie multifactorielle et des facteurs de risque endogènes et exogènes ont été décrits (Alexander et al., 2015; Franssen et al., 2019). Parmi les facteurs exogènes, le tabagisme actif ou chronique est le principal facteur de risque et en France, environ 80% des cas lui sont attribuables. Une étude réalisée dès 1977 a montré qu'un sevrage tabagique trop tardif entraîne une décroissance du Volume Expiratoire Maximal physiologique par Seconde (VEMS) de 50 mL par an alors que

cette décroissance n'est que de 30 mL par an si le sevrage est précoce (Figure 9) (Fletcher & Peto, 1977). D'autres études plus récentes ont également montré l'implication du tabagisme chronique dans le mauvais pronostic et le risque de décès au cours de la BPCO (Omori et al., 2005 ; Bai et al., 2017).

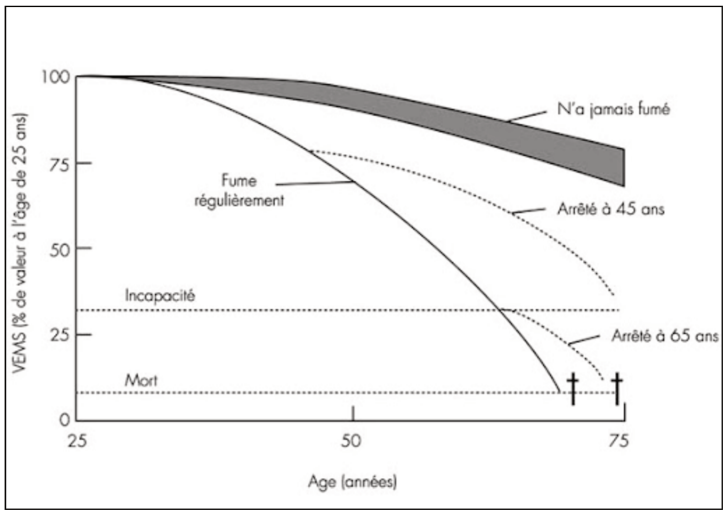


Figure 9 : Impact de l'arrêt du tabac sur le VEMS.
La zone grise représente le déclin physiologique des non-fumeurs ou fumeurs non réceptifs aux effets néfastes de la cigarette. La ligne continue représente le déclin accéléré chez les fumeurs réceptifs. Les lignes discontinues représentent le déclin des ex-fumeurs ayant cessé de fumer à 45 ans ou à 65 ans. L'arrêt précoce du tabac restaure un déclin de la VEMS proche de la normale, soit de 30 mL par an avec l'âge contre 50 mL par an chez les fumeurs (Fletcher & Peto, 1977; Omori et al., 2005).

La pollution atmosphérique, due aux émissions des gaz des usines/voitures, ou de l'air dans les habitations, ainsi que les expositions professionnelles à des polluants, sont des facteurs de risque exogènes mais aussi des éléments aggravants de la BPCO. Cette pathologie atteint les adultes de plus de 45 ans et sa prévalence augmente avec l'âge. Les personnes de plus de 65 ans constituent la population la plus touchée par la maladie. Les hommes sont légèrement plus atteints que les femmes (ratio 0,6), néanmoins avec le développement du tabagisme féminin et de la pollution, la BPCO concerne aujourd'hui presque autant de femmes que d'hommes. La fréquence de la maladie est passée chez la femme de 20 pour 10 000 en 2006 à 41 pour 10 000 en 2015. De plus, les conditions de vie défavorables, la malnutrition, les antécédents néonataux (prématurité), les facteurs génétiques, le tabagisme passif durant la grossesse et l'asthme sont des facteurs favorisant le développement de la BPCO. Dans cette pathologie, le premier facteur de risque endogène identifié a été l'alpha-1 antitrypsine (α1-AT). La mutation du gène *SERPINA1*, codant pour cet inhibiteur de l'élastase neutrophilique, conduit au déficit en α1-AT et au développement de l'emphysème, plus particulièrement chez les fumeurs (Janus et al., 1985 ; Sandford et al., 1997).

Depuis, il a été montré que d'autres gènes contribuent au développement de la BPCO, notamment le gène du récepteur nicotinique neuronal de l'acéthylcholine. Des polymorphismes du gène de l'enzyme de conversion de l'angiotensine ou de NF-κB1 ont également été identifiés (Alexander et al., 2015).

II. Symptômes de la BPCO

La BPCO est caractérisée cliniquement par la présence d'un essoufflement ou dyspnée, d'une toux chronique et des expectorations dans les stades précoces de la maladie. Ensuite, la sécrétion excessive de mucus (crachats), la dyspnée et l'obstruction des bronches s'aggravent progressivement jusqu'aux stades les plus avancés de la maladie, qui reste incurable. Ces signes sont caractéristiques de l'inflammation des bronches et d'une altération de la clairance muco-ciliaire. Ils peuvent être majorés dans le cas de l'exacerbation de la BPCO, associée le plus souvent à la pollution ou bien à des infections virales ou bactériennes. Les complications d'origine infectieuse peuvent être d'intensité légère, modérée ou sévère, conduisant à une détresse respiratoire (Ritchie & Wedzicha, 2020). A titre d'exemple, le risque d'hospitalisation en unité de soins intensifs (Laporte et al., 2018), de ventilation mécanique et de décès des patients atteints de BPCO et touchés par la COVID-19, est plus élevé que celui des malades avec une BPCO seule (Graziani et al., 2020 ; Wu et al., 2020a). Les patients atteints de BPCO ont par ailleurs souvent d'autres pathologies chroniques associées et l'importance de ces comorbidités a un impact sur l'évolution de la maladie. Il s'agit notamment de pathologies cardiovasculaires (André et al., 2019) ou encore de l'asthme (Matsunaga et al., 2020).

III. Diagnostic de la BPCO

Le diagnostic de la BPCO est complexe puisqu'il doit intégrer les signes cliniques, le contexte environnemental, notamment le statut tabagique et les résultats du diagnostic (André et al., 2019). Ce dernier est essentiellement réalisé grâce à la spirométrie avec l'Epreuve Fonctionnelle Respiratoire (EFR). Cet examen permet de rechercher une éventuelle anomalie du souffle à l'aide d'un débit-mètre (speak-flow) ou d'un spiromètre. Le spiromètre avec la courbe débit-volume permet de mesurer le VEMS et la Capacité Vitale Forcée (CVF). Lorsque le rapport VEMS/CVF est inférieur à 70%, le trouble Ventilatoire Obstructif (TVO)

est définit et la BPCO diagnostiquée. La sévérité de la BPCO peut aussi être évaluée à l'aide du VEMS (tableau 1).

Tableau 1 : Evaluation de la sévérité de la BPCO (d'après Santé Publique France, 2019)

Stade I : BPCO légère	VEMS > 80 % de la valeur théorique
Stade II : BPCO modérée	50 % < VEMS < 80 % de la valeur théorique
Stade III : BPCO sévère	30 % < VEMS < 50 % de la valeur théorique
Stade IV : BPCO très sévère	VEMS < 30 % de la valeur théorique Ou VEMS < 50 % associé à une insuffisance respiratoire chronique.

En plus de la spirométrie, d'autres examens peuvent être demandés pour compléter le diagnostic de la BPCO. Il s'agit des gaz du sang pour rechercher l'hypoxémie (diminution de la quantité d'oxygène dans le sang), de la spirométrie avec des tests de réversibilité après administration d'un bronchodilatateur, afin d'identifier une association asthme/BPCO, ou une hyperéactivité bronchique. Des examens comme la radiographie ou le scanner thoracique permettent de rechercher certaines comorbidités telle qu'une atteinte cardiovasculaire ou pleurale ou encore un cancer broncho-pulmonaire. Un dosage de l'α1-AT peut également être réalisé. La recherche de marqueurs est également essentielle, notamment pour suivre l'évolution de la maladie et en particulier d'évaluer sa sévérité. Récemment, Charbonnier et ses collaborateurs ont proposé la tomographie assistée par ordinateur afin de montrer la relation entre l'épaississement de la paroi des voies aériennes (Pil0) et la VEMS. Cette mesure de Pil0 est non seulement pertinente pour prédire le développement de la BPCO chez des fumeurs mais est également un biomarqueur permettant d'évaluer la réversibilité du processus d'épaississement de l'épithélium à l'arrêt du tabac (Charbonnier et al., 2020).

IV. Mécanismes physiopathologiques de la BPCO

Au cours de la BPCO, l'inflammation chronique des voies aériennes modifie la structure et les fonctions bronchiques. En lien avec ce processus inflammatoire, un épaississement de la paroi bronchique, une augmentation du tonus des muscles lisses, une hypersécretion des glandes séro-muqueuses et une perte de la structure élastique du poumon sont ainsi observés. Les facteurs majeurs tels que l'inflammation chronique, le stress oxydant, le déséquilibre de la balance protéases/antiprotéases et une mauvaise réparation de

l'épithélium bronchique sont impliqués dans la physiopathologie de BPCO (Wang et al., 2020).

1. Rôle de l'inflammation et du stress oxydant dans la BPCO

Dans la BPCO, l'infiltration pulmonaire des monocytes, déclenchée par l'hypoxie, et leur différenciation en macrophages alvéolaires ont été décrites comme jouant un rôle majeur dans l'initiation de l'inflammation des voies aériennes et du remodelage dépendant des protéases (Chao et al., 2009 ; Delbrel et al., 2019). Par ailleurs, les macrophages perdent leur capacité à phagocyter les agents pathogènes et à éliminer les cellules en apoptose (Hiemstra, 2019). D'autres cellules comme les lymphocytes B et T CD8+, les polynucléaires neutrophiles (PNN) ou éosinophiles (PNE) et les mastocytes sont également recrutées dans les voies aériennes des malades. De plus, il a été montré, dans des modèles de souris immuno-déficientes, que le recrutement des cellules inflammatoires après leur exposition à la fumée de cigarette pouvait dépendre des récepteurs pro-inflammatoires TLR (*Toll-Like*)-1R1/MyD88 et TLR4. Cette inflammation modifie ainsi la structure et la fonction des bronches et une augmentation des concentrations plasmatiques de marqueurs inflammatoires et d'autres médiateurs non spécifiques est également observée chez les patients atteints de BPCO (Berger et al., 2003 ; Hogg et al., 2004). Parmi ces facteurs, les cytokines de la phase inflammatoire aiguë (TNFα, IL-1β, IL6, leucotriène LTB4 (*Leukotriene B4*), et la chimiokine CXCL8 ou IL-8) et les adipokines (leptine et ghréline) sont retrouvées dans le sérum des patients. De plus, les cytokines de la voie pro-inflammatoire Th17, notamment les IL-17 et -22, sont respectivement sécrétées dans les phases prococes et avancées de la BPCO (Le Rouzic et al., 2017). D'autres protéines comme la CRP (*C Reactive Protein*), le fibrinogène, la protéine sérique amyloïde A ou la protéine D du surfactant sont également détectées dans le sérum des sujets avec une BPCO sévère (Bagdonas et al., 2015; Donaldson et al., 2005). Les médiateurs de l'inflammation libérés aggravent les altérations de l'épithélium et amplifient encore la réaction inflammatoire.

Le stress oxydant tient également une place importante dans la genèse et le développement de la BPCO. Le déséquilibre de la balance entre les oxydants et les anti-oxydants, en faveur des oxydants, est directement impliqué dans les lésions des cellules pulmonaires, dans l'hypersécretion de mucus, dans l'inhibition des anti-protéases et dans l'inflammation pulmonaire (MacNee, 2005). Plusieurs facteurs sont responsables de la génération des espèces réactives de l'oxygène (ROS, *Reactive Oxygen Species*) au cours de la BPCO. Ces facteurs peuvent être environnementaux (tabagisme, ozone, oxyde d'azote,

particules de diesel, etc.), inflammatoires (macrophages alvéolaires et PNN activés) ou intracellulaires en lien avec l'activité mitochondriale. Le stress oxydant généré par ces ROS est capable d'initier la réponse immunitaire *via* l'activation des voies NF-κB et AP-1, et bien d'autres processus *via* de nombreuses autres voies de signalisation (Wang et al., 2020). C'est dans ce contexte qu'une étude a montré une diminution de l'inflammation (macrophages, PNN, IL-6, CXCL1, CXCL2) chez les souris exposées à la fumée de cigarette et déficientes pour la sous-unité de p47 (phox) de l'enzyme NADPH oxydase, laquelle intervient dans la génération des ROS (Lagente et al., 2008). L'intensité du stress oxydant et sa persistance vont altérer l'intégrité et la structure de l'épithélium bronchique ainsi que les fonctions pulmonaires (Stevenson et al., 2006 ; Bagdonas et al., 2015).

2. Déséquilibre de la balance protéases/anti-protéases

Dès 1963, il a été constaté chez les sujets présentant un emphysème précoce et/ou une fibrose hépatique, l'absence de l'inhibiteur de la famille des SERPINES, l'α1-AT, après la mutation de son gène *SERPINA1* (Laurell & Eriksson, 2013). Cette mutation serait responsable d'un mauvais repliement de la protéine et son accumulation hépatique. Chez les individus présentant cette mutation, l'activité anti-protéolytique de l'α1-AT contre l'élastase neutrophilique (EN) est environ 5 fois inférieure à celle observée avec l'α1-AT non mutée (Ogushi et al., 1987 ; Köhnlein & Welte, 2008). De plus, chez les patients deficients en α1-AT, l'équilibre entre les protéases et les antiprotéases est rompu dans le poumon. En effet, la majorité des protéases libérées restent actives, conduisant à la destruction progressive des composants de la MEC, des alvéoles et des vaisseaux sanguins. Au cours des années, cette destruction progressive entraîne la BPCO et l'emphysème (Morse, 1978 ; Needham & Stockley, 2004).

Le déséquilibre de la balance entre les protéases et les inhibiteurs de protéases peut également résulter de l'infiltration de cellules inflammatoires (macrophages, PNN, etc.) qui libèrent des protéases telles que les MMP, l'EN, la cathepsine G (cat G) ou la protéinase 3 (PR3) (Stockley, 1999 ; Dey et al., 2018). Ces protéases dégradent alors les composants de la MEC ce qui libère divers facteurs chimioattractants et/ou pro-inflammatoires qui activent ou attirent en retour les cellules environnantes (cellules épithéliales et endothéliales, PNN, etc.). Il a été montré que le tabac augmente le taux sérique des MMP-1, -7, -10 et -12 et des taux élevés des MMP-1, -3, -7 et -12 sont également retrouvés dans le sérum de patients atteints de BPCO (Kraen et al., 2019).

La production des radicaux libres, augementée lors de l'exposition au tabac, est également impliquée dans l'inactivation des inhibiteurs de protéases. Ce déséquilibre a pour conséquence l'hypersécretion du mucus, le remodelage tissulaire et l'emphysème. Plusieurs études montrent une augmentation de la sécrétion des MMP-2, -9, -12 et -13 et de la MMP-14 membranaire par les macrophages de souris exposées à la fumée de cigarette (Russell et al., 2002 ; Shapiro et al., 2003 ; Churg et al., 2004). Ainsi, dans un modèle de souris invalidées pour la MMP-12 et exposées à la fumée de cigarette, il a été démontré que l'activité de la MMP-12 était nécessaire au recrutement sur site des PNN et à la dégradation de la MEC (Churg et al., 2002). De plus, l'instillation des souris avec la MMP-12 recombinante a permis de reproduire les caractéristiques inflammatoires observées chez les patients atteints de la BPCO (Nénan et al., 2005).

Les protéases sont également capables de dégrader leurs inhibiteurs et ainsi de renforcer le déséquilibre de la balance protéases/antiprotéases. Ainsi, dans un modèle d'emphysème, il a été démontré que l'EN pouvait dégrader un inhibiteur de la MMP-1, le TIMP-1 (*Tissue inhibitor of metalloproteinases 1),* alors que la MMP-12 dégradait l'α1-AT. Les oxydants de la fumée de cigarette sont également capables de dégrader l'α1-AT et le SLPI (Shapiro et al., 2003). En effet, Cavarra et ses collaborateurs ont observé une réduction de 50% de l'activité du SLPI chez les souris exposées à la fumée de cigarette (Cavarra et al., 2001). L'expression des protéases à cystéine, comme les cathepsines K et S ainsi que les caspases 1, 3, 7, 8, 9 et 11, est augmentée dans la BPCO (Dey et al., 2018).

3. Anomalies de la structure et de la réparation de l'épithélium bronchique dans la BPCO

3.1. Structure de l'épithélium bronchique

L'épithélium bronchique, pseudostratifié et polarisé, se compose de 50 à 70% de cellules ciliées, 11% de cellules « clara » sécrétrices et non ciliées, environ 25% de cellules à mucus, ou cellules calciformes, et jusqu'à 30% de cellules basales. Les cellules à mucus sécrètent un mélange de protéines, les mucines, hautement glycosylées (MUC5AC et MUC5B), permettant de recouvrir la surface de la trachée et des bronchioles. Les cellules ciliées sont chargées d'éliminer le mucus des voies respiratoires grâce aux battements extrêmement rapides de leurs cils. Les cellules clara sécrètent une protéine de 10 kDa appelée « clara ou CC10 », douée de propriétés anti-inflammatoire et immunomodulatrice (Boers et al., 1998, 1999 ; Rogers, 2003; Staudt et al., 2014). Les cellules basales indifférenciées, ainsi

que les cellules intermédiaires, ont les caractéristiques de cellules souches et peuvent se différencier en différents types de cellules épithéliales. Ces cellules basales sont situées juste au-dessus de la membrane basale (Figure 10) (Rock et al., 2010).

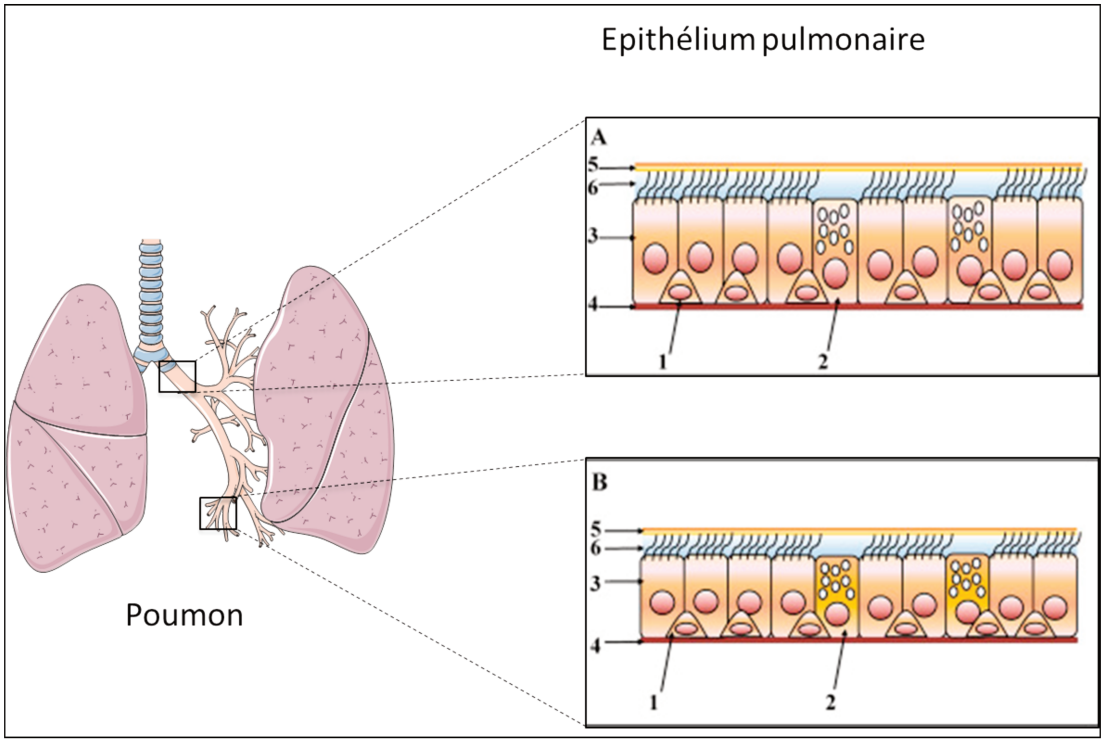


Figure 10 : Structure de l'épithélium des voies respiratoires*. L'épithélium bronchique est constitué des cellules basales (1), des cellules calciformes ou cellules à mucus (2), et des cellules ciliées (3) situées au-dessus de la membrane basale (4). Le mucus sécrété par les cellules calciformes est représenté sous sa phase gel (5), sa phase superficielle, viscoélastique et sa phase sol (6), plus fluide et contenant le surfactant des alvéoles où baignent les cils* (Adam et al., 2014).

L'intégrité de la barrière épithéliale, est maintenue grâce à la formation des jonctions intercellulaires de types adhérentes (jonctions adhérentes, JA) ou de type serrées (jonctions serrées, JS). Les JA, situées du côté basal des cellules, régulent l'adhérence, par des interactions homotypiques entre des molécules d'adhérence, E-cadhérine, fournissant une architecture idéale pour l'installation des jonctions serrées (Gumbiner et al., 1988). Les JS sont plus localisées du coté apicale et comprennent les protéines d'interaction comme les protéines occludines, claudines et ZO-1 (*Zona occludens* 1). Ces protéines des JS rendent imperméable l'épithélium pulmonaire.

3.2. Réparation et régénération de l'épithélium bronchique

Lors des agressions de l'épithélium pulmonaire par des particules polluantes et/ou toxiques ou des microorganismes, ou encore dans les pathologies inflammatoires comme la BPCO, l'épithélium respiratoire peut présenter une desquamation importante. Il a

été démontré que 4 étapes sont nécessaires pour reconstituer l'architecture de l'épithélium pseudostratifié mucociliaire fonctionnel. La première étape est celle de la dé-différenciation des cellules épithéliales bronchiques situées aux abords de la lésion. Ces cellules vont perdre leurs jonctions épithéliales, sous l'effet des facteurs de croissance comme le TGF-β1 (*Transforming Growth Factor-β1*), pour acquérir un phénotype mésenchymateux comme celui des cellules basales, progénitrices de l'épithélium bronchique (Hajj et al., 2007). Ces cellules vont s'étaler sur la lésion et migrer pour recouvrir la membrane basale dénudée (Erjefält et al., 1995, 1997). Une fois que les cellules ont recouvert la lésion, elles prolifèrent pour former une structure épithéliale stratifiée, dite métaplasie malpighienne, formée de plusieurs cellules cuboïdales. Après l'étape de prolifération, les cellules épithéliales vont se re-différencier en cellules ciliées, à mucus, clara ou en cellules basales pour reconstituer un épithélium pseudostratifié fonctionnel (Dupuit et al., 2000).

3.3. *Remodelage de l'épithélium bronchique dans la BPCO*

Dans la BPCO, les particules nocives ou celles de la fumée de cigarette sont impliquées dans le remodelage des voies aériennes par libération de plusieurs médiateurs pro-inflammatoires (Kirkham et al., 2008). L'épaississement de la paroi des voies aériennes distales, observé dans la BPCO sévère (stade 3 et 4), est principalement localisé dans les petites voies respiratoires (< 2mm de diamètre). La gravité de la maladie est souvent déterminée par cet épaississement, causé par la fibrose péri-bronchique et l'infiltration des cellules immunitaires (Jeffery, 2004 ; Baraldo et al., 2012). Dans l'épithélium bronchique, une métaplasie malpighienne et une diminution des cellules ciliées au profit des cellules à mucus sont également retrouvées. L'hypertrophie des glandes séromuqueuses, l'hyperplasie des cellules caliciformes et l'hypersécrétion du mucus sont observées, favorisant aussi l'obstruction des voies aériennes (Figure 11) (Hogg et al., 2004 ; Schamberger et al., 2015). De plus, la libération des médiateurs comme l'acétylcholine, la tachykinines, les prostaglandines (PG) D2 et F2a ou les dérivés des PG comme le thromboxane A2, augmentent la prolifération des cellules musculaires et ainsi le tonus musculaire des bronches (Comandini et al., 2009).

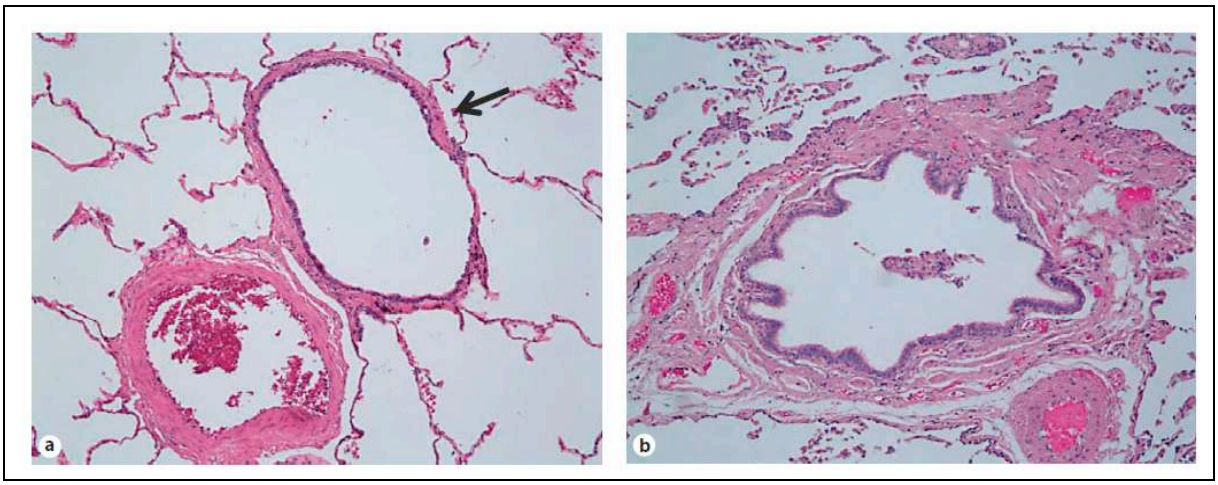


Figure 11 : Morphologie des petites voies aériennes chez un sujet non-fumeur et un patient BPCO. ***a)*** *Chez le sujet non-fumeur on distingue une voie aérienne périphérique (flèche noire) dont la paroi est mince, entourée par des alvéoles intactes. b) Chez le sujet BPCO, la lumière des voies respiratoires est rétrécie, contient du mucus et des débris cellulaires. La paroi des bronches est épaisse, essentiellement constituée de cellules musculaires lisses et d'une fibrose. Les connexions alvéolaires qui entourent la bronche sont absentes ou détruites* (Baraldo et al., 2012)

La fibrose pulmonaire péri-bronchique est également caractéristique du remodelage des bronches dans la BPCO. Une étude réalisée sur des rats exposés à la fumée de cigarette a montré une réduction du calibre des bronches de ces animaux. Les auteurs ont également observé une diminution de la E-cadhérine et une augmentation de l'expression de la vimentine, associée à l'augmentation du nombre de fibroblastes. Ces observations ont suggéré, chez ces rats exposés à la fumée de cigarette, la présence d'une Transition Epithélio-Mésenchymateuse (TEM) associée à une augmentation des MMP-2 et -9 et à une fibrose pulmonaire péri-bronchique (Zou et al., 2014). Il est bien établi que la fibrose est associée à l'accumulation de myofibroblastes dans le stroma, qui résultent de la transition des fibroblastes et des cellules musculaires lisses résidents en myofibroblastes, du recrutement de cellules souches circulantes (fibrocytes) et donc du processus de la TEM (Scotton & Chambers, 2007). Selon le contexte physiologique, la TEM peut être tout d'abord induite par le stress oxydant et les facteurs environnementaux comme l'hypoxie ou les radicaux libres (Rhyu et al., 2005 ; Higgins et al., 2007 ; Delbrel et al., 2019). Ensuite, la libération des facteurs de croissance tels que le TGF-β1, le FGF-2 (*Fibroblast Growth Factor 2*), le CTGF (*Connective Tissue Growth Factor*), l'IGF-2 (*Insulin-like Growth Factor 2*) peuvent induire secondairement la TEM (Willis & Borok, 2007 ; Wu et al., 2020b). Parmi ces facteurs, le TGF-β1 est montré comme responsable de l'induction de la TEM dans plusieurs lignées

cellulaires, y compris dans les cellules alvéolaires et bronchiques pseudostratifiées (Kim et al., 2006 ; Hackett et al., 2009). De plus, il a été démontré que la fumée de cigarette pouvait induire la TEM dans les lignées cellulaires alvéolaires A549 et bronchiques BEAS-2B (Liu et al., 2010 ; Veljkovic et al., 2011). Dans les cellules épithéliales, la TEM induite par TGF-β1 est médiée par plusieurs facteurs comme les ROS, l'activation des voies MAPKinase et Smad. En effet, le traitement des cellules par des anti-oxydants ou par des facteurs augmentant l'AMP cyclique inhibent la TEM induite par le TGF-β1 (Rhyu et al., 2005).

Dans les voies aériennes des fumeurs et des patients atteints de BPCO, une forte fragmentation de la membrane basale réticulaire, caractéristique connue de la TEM, a été rapportée (Sohal et al., 2010 ; Soltani et al., 2010). Les cellules localisées au niveau de ces fissures de la membrane basale co-expriment les marqueurs épithéliaux (cytokératine et S100A4) et mésenchymateux (vimentine, N-cadhérine). Ces données ont démontré une activation partielle de la TEM des cellules d'origine épithéliale chez les patients atteints de BPCO. Ainsi, les auteurs ont suggéré que chez les fumeurs ou les patients souffrant de cette pathologie, la fumée de cigarette induirait la TEM des cellules épithéliales. Ces cellules de phénotype mésenchymateux vont ensuite migrer à travers les fissures de la membrane basale pour se différencier en myofibroblaste dans le stroma. Cette accumulation de myofibroblastes augmente les dépôts de MEC et diminue par conséquent le calibre des bronches (Figure 12) (Sohal et al., 2010, 2011 ; Pain et al., 2014).

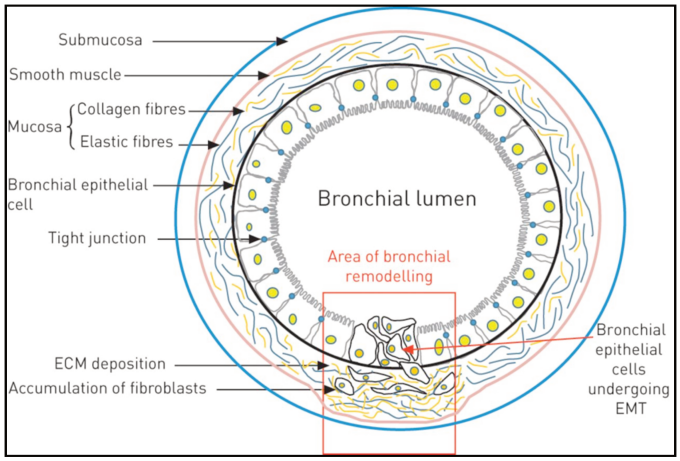


Figure 12 : Remodelage de l'épithélium bronchique dans la BPCO. *Les cellules perdent leurs jonctions épithéliales pour acquérir un phénotype mésenchymateux, par Transition Epithélio-Mésenchymateuse (TEM). Les cellules épithéliales vont alors migrer à travers la membrane basale et se différencier en myofibroblaste dans le stroma. L'accumulation des myofibroblastes et des dépôts de la matrice extracellulaire sont responsables de l'épaississement des bronches et de la réduction de leur calibre (Pain et al, 2014)*

3.4. *Implication des protéases dans le remodelage de l'épithélium bronchique*

Le remodelage de l'épithélium bronchique est associé à la production de médiateurs pro-inflammatoires par cet épithélium ou par les cellules immunitaires, et de nombreuses protéases (Rogers, 2007). Une étude a montré que la diminution du calibre des bronches chez les fumeurs et les patients atteints de BPCO était associée à l'augmentation de l'expression protéique et sérique des MMP-9 et -2 et de TIMP-1 (Zou et al., 2014). En effet, les cellules des petites voies aériennes des fumeurs et des patients souffrant de BPCO sont positives aux marqueurs de la TEM, dont le collagène I, la vimentine et l'α-SMA (*α-Smooth Muscle Actin*). L'expression protéique des marqueurs épithéliaux E-cadhérine et ZO-1 était significativement diminuée alors que l'expression des transcrits était inchangée. Ces résultats contradictoires entre le taux des ARN et l'expression des protéines étaient expliqués par la dégradation des protéines de jonction par la MMP-9 libérée dans le surnageant des cellules basales primaires isolées de patients atteints de BPCO. De plus, chez les fumeurs et les patients souffrant de BPCO, la phosphorylation de ERK1/2 était significativement augmentée comparée à celle retrouvée dans les cellules des sujets sains. Les auteurs ont suggéré que dans la BPCO, la fumée de cigarette favoriserait la TEM des cellules épithéliales suite à l'activation des ROS intracellulaires et leur libération, qui induit la phosphorylation de ERK1/2 et de Smad3. Ce mécanisme d'induction de la TEM serait responsable de la migration des cellules dans le stroma par activation de la voie EGFR (*Epidermal Growth Factor*), ce qui expliquerait l'épaississement de la paroi des bronches chez les fumeurs et les patients BPCO (Soltani et al., 2010 ; Sohal et al., 2011 ; Milara et al., 2013). C'est dans ce contexte que le ciblage de la TEM induite par les protéases sécrétées par l'épithélium des fumeurs ou des patients atteints de BPCO a été proposé par plusieurs auteurs. Ainsi, dans une première étude ont été évalués les effets du propionate de fluticasone, un corticostéroïde inhalé (500 µg deux fois/jour pendant 6 mois), sur la fragmentation de la membrane basale réticulaire, considérée comme un marqueur de la TEM, ainsi que sur l'expression de l'EGFR, de la MMP-9 et du S100A4 dans les cellules épithéliales basales. L'analyse des données a montré que l'ensemble des marqueurs étudiés était considérablement diminué chez les patients ayant subi ce traitement (Sohal et al., 2014). D'autres études ont montré une surexpression de l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) et de son récepteur uPAR, à l'origine de la génération de la plasmine, dans les petites voies aériennes des patients atteints de BPCO et dans les cellules épithéliales des petites voies aériennes (HSAEpiC) traitées avec les extraits de fumée de cigarette (CSE, *Cigarette Smoke Extract*). Cette

expression était associée à l'induction de la TEM accompagnée d'une diminution de la E-cadhérine et de l'α-caténine et d'une augmentation de la N-cadhérine. L'inhibition de la protéase uPA (shARN et l'inhibiteur de l'uPA, l'amiloride) réduisait considérablement la TEM induite par les CSE, montrant l'implication probablement indirecte de l'activité de cette protéase dans le remodelage de l'épithélium pulmonaire (Wang et al., 2013a, 2015a).

Les kallicréines sont aussi décrites pour être impliquées dans le remodelage des voies aériennes, et plus particulièrement dans le contexte de l'asthme (Casalino-Matsuda et al., 2006 ; Monzon et al., 2006 ; Forteza et al., 2007 ; Aubier et al., 2016; Lenga Ma Bonda et al., 2018). Cependant dans la BPCO, très peu de données sont rapportées sur l'implication des kallicréines dans la physiopathologie de la maladie. Parmi les rares études menées, la première a identifié plusieurs éléments de contrôle de la méthylation (*DMR, Diffentially Methylated Regions)* au niveau du gène de la *KLK10* chez les patients souffrant de BPCO, corrélés avec la spiromètrie et le stade de la maladie (Lee et al., 2017). Une seconde étude a montré une hypersécrétion de la KLK3 dans le sérum des patients au cours des phases d'exacerbation aiguë de la BPCO, associée à l'hypoxémie (Ozge et al., 2015). Enfin, la dernière étude a associé la KLK1 et la voie EGFR dans les mécanismes de l'hypersécrétion du mucus dans le contexte de la BPCO (Casalino-Matsuda et al., 2006). A l'heure actuelle, aucune étude n'a montré l'implication d'autres KLK et notamment de la KLK5 dans la physiopathologie de la BPCO et plus particulièrement dans les mécanismes de remodelage associés à cette pathologie.

V. Traitement de la BPCO

La prise en charge de la BPCO est essentiellement axée sur l'administration, par voie inhalée, de bronchodilatateurs (β2-mimétiques et/ou anti-cholinergiques) qui peuvent être associés à des corticostéroïdes et à des bêta-agonistes dans les formes sévères (Tashkin & Strange, 2018 ; van Haarst et al., 2019 ; van Dijk et al., 2020). Ces traitements médicamenteux symptomatiques sont associés au sevrage du tabagisme, à la réhabilitation et/ou à la kinésithérapie, à l'oxygénothérapie de longue durée (OLD) ou au traitement des infections respiratoires (grippe, pneumonie, etc.) pour éviter l'exacerbation de la pathologie (SPLF, Société de Pneumologie de Langue Française, 2003). Les comorbidités associées sont également ciblées par des thérapies appropriées (van Dijk et al., 2020). Dans le cas d'une infection bactérienne associée à la BPCO, les antibiotiques sont administrés chez les patients ayant dépassé le stade 1 de la maladie. Enfin, les vaccinations anti-grippales et anti-

pneumococciques sont conseillées chez les patients âgés de plus de 65 ans ou présentant une BPCO sévère. L'oxygénothérapie de longue durée est réalisée chez les patients présentant une insuffisance respiratoire chronique. Cette thérapie, utilisée pendant une durée quotidienne de 15 heures, a montré une efficacité dans la survie des patients (Marchand, 2010). De nouvelles pistes thérapeutiques sont en développement afin de bloquer les mécanismes impliqués dans la pathogenèse de la BPCO (Figure 13) (Dey et al., 2018 ; Wang et al., 2020).

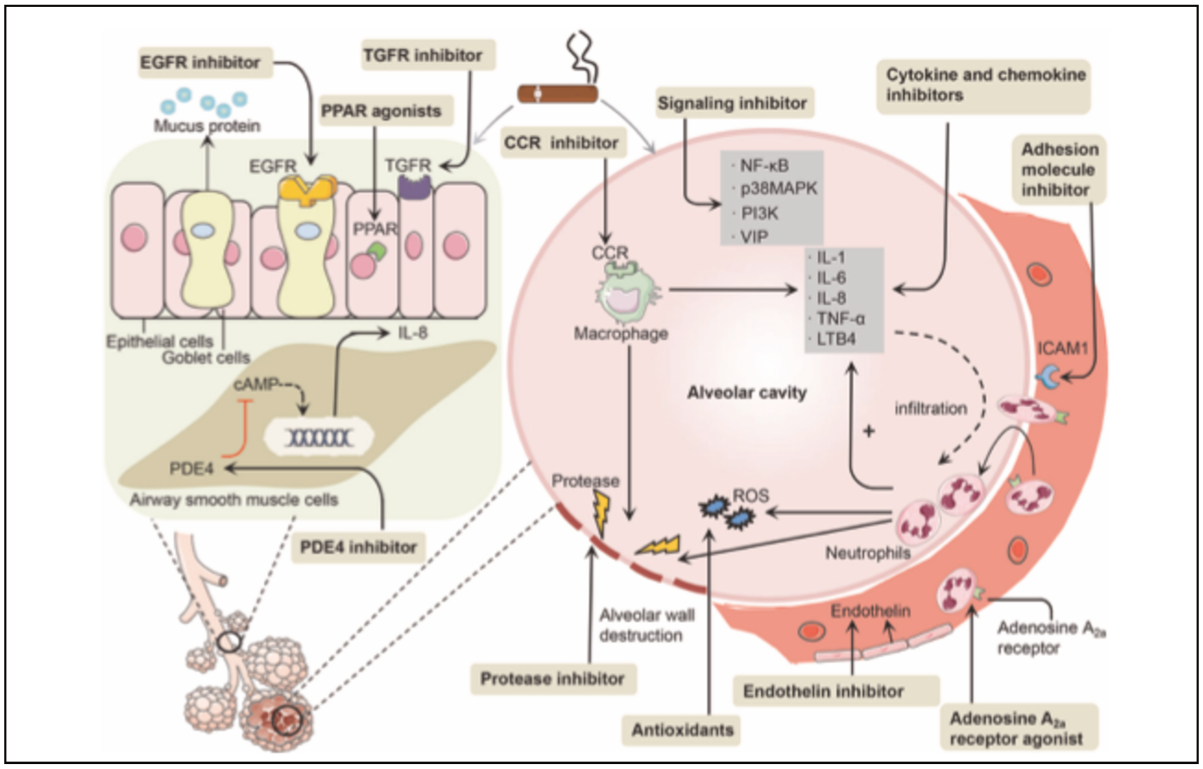


Figure 13 : Nouvelles cibles moléculaires des médicaments dans la BPCO. *Les antioxydants peuvent être utilisés dans la BPCO pour inhiber le stress oxydant dans les poumons. Les inhibiteurs de protéases rétablissent la balance entre les protéases et anti-protéases. Les inhibiteurs des molécules d'adhésion au niveau des cellules endothéliales peuvent empêcher la migration des cellules inflammatoires dans les vaisseaux sanguins. L'inhibiteur de la PDE4 améliore l'activité de l'AMPc dans les cellules. Les voies de signalisation impliquées dans le remodelage des voies aériennes peuvent également être ciblées par des inhibiteurs (NF-κB, p38MAPK, TGFR, PI3K, PPAR et VIP). Enfin, le récepteur de l'adénosine A2a est également ciblé et inhibe la production des oxydants par les PNN et les phagocytes, l'adhésion et la libération des cytokines (Wang et al., 2020).*

Ainsi sont ciblés le stress oxydatif (antioxydants), l'inflammation (inhibiteurs de récepteurs de cytokines), les protéases (inhibiteurs des MMP-9 et -12) ou encore des molécules de signalisation (inhibiteurs des voies PI3K ou NF-κB). La thiorédoxine pourrait également être une nouvelle piste puisque cette molécule, qui régule le potentiel rédox, peut agir sur les différents processus mis en jeu dans la BPCO (Wang et al., 2020).

L'enzyme phosphodiesterase 4 (PDE4) est également décrite pour être une cible potentielle pour traiter les maladies inflammatoires respiratoires comme la BPCO et l'asthme. En effet, les inhibiteurs sélectifs de cette protéase (RP 73-401, CI-1044 ou lecilomilast) réduisent l'expression des MMP-1, -2 et -9, la libération du TGF-1β et l'afflux des PNN dans le contexte de la BPCO (Nénan et al., 2005 ; Ouagued et al., 2005). De plus, une étude récente a montré que le propolis, une substance provenant de la sève/gomme des plantes et métabolisée par les abeilles, améliore la réparation des lésions pulmonaires et restaure les fibres élastiques pulmonaires des souris exposées à la fumée de cigarette (Barroso et al., 2017). Cependant à l'heure actuelle, le ciblage des mécanismes de remodelage structurel associés à la BPCO reste à explorer. Le ciblage des kallicréines en général et plus particulièrement de la KLK5, laquelle intervient dans le remodelage de la peau, pourrait également constituer une piste intéressante pour éviter la survenue de ces mécanismes de remodelage structurel dans la BPCO.

C. La kallicréine tissulaire de type 5

I. Historique de découverte de la kallicréine 5

La kallicréine 5 (KLK5) a été découverte en 1999 par Brattsand et Egelrud à partir des ARNm issus d'une lignée cellulaire de kératinocytes (HaCat) et des ARNm isolés de la peau humaine. Dans les extraits partiellement purifiés de l'épithélium cornéen de la peau plantaire humaine, 3 formes de cette protéase à sérine on été identifiées. Ces formes de 37 kDa, 25 kDa et 33 kDa correspondaient respectivement à la pro-enzyme, à l'enzyme active et à l'enzyme active glycosylée. L'analyse des ARNm de l'enzyme avait montré une forte expression dans la peau et une plus faible dans le cerveau, le placenta et les reins. La fonction de cette enzyme, initialement appelée enzyme de type trypsine de la couche cornée, (*Human Stratum Corneum Tryptic Enzyme* ou HSCTE) était associée à son renouvellement ou plus largement à la desquamation de la peau (Brattsand & Egelrud, 1999). Cette nouvelle enzyme a ensuite été nommée KLK-L2, puis hK5 « *human kallikrein 5*» ou KLK5 « *Kallikrein-related peptidase 5* » par l'équipe de Yousef et ses collaborateurs (Yousef & Diamandis, 1999). KLK5 est dorénavant la dénomination retenue par la communauté scientifique.

II. Gène, variants et isoformes de la KLK5

La transcription de la KLK5 est sous le contrôle des hormones stéroïdiennes, notamment les œstrogènes et la progestérone. Le gène de la KLK5 est long d'environ 9,5 kb

et se compose de 5 introns et 6 exons, dont 5 codent pour l'ARNm classique de la KLK5 (Figure 14).

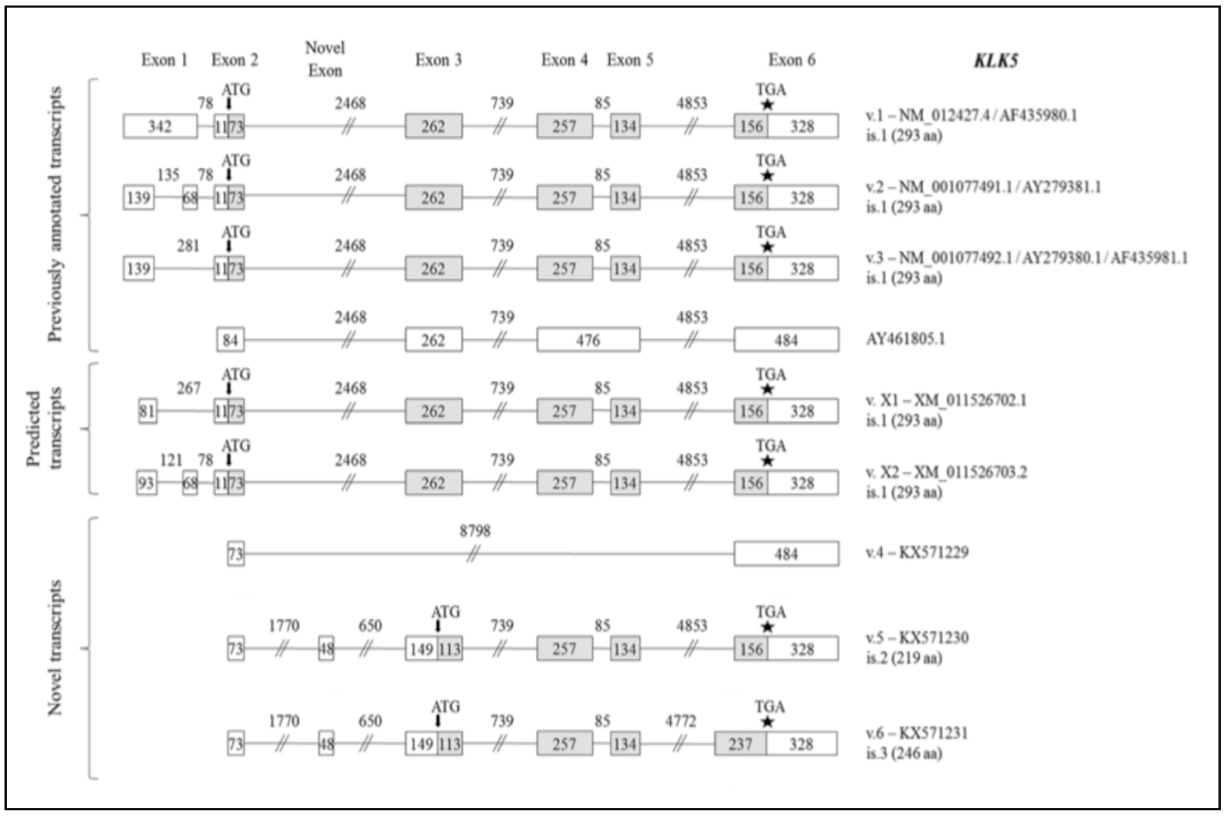


Figure 14 : Structure détaillée des variants d'épissage de la KLK5 et des isoformes protéiques respectivement synthétisées. *Les exons sont représentés sous forme de case et les introns sous forme de ligne. Les cases grises représentent les exons codants et les cases blanches les exons non codants. Les nombres dans les cases et sur les lignes indiquent la longueur de chaque intron et exon en nucléotides. Les flèches (↓) indiquent la position du codon ATG et les astérisques (*) celle du codon « Stop » (Adamopoulos et al., 2017).*

Le gène contient dans sa région 5'UTR, l'exon 1 non codant de 342 pb, un intron de 78 pb et un autre exon non codant de 11 pb situé en amont du codon ATG d'initiation de la traduction. La séquence codante de la KLK5 est quant à elle longue de 882 pb et composée de l'exon 2 (73 pb), de l'exon 4 (262 pb), de l'exon 5 (134 pb) et de l'exon 6 (156 pb). Les exons codants 2-3, 3-4, 4-5 et 5-6 sont séparés par 4 introns ayant respectivement une longueur de 2468 pb, 739 pb, 85 pb et 4853 pb. La région 3'UTR (328 pb) commence en aval du codant TGA d'arrêt de la traduction. Cette région contient un signal de polyadénylation conservé (AATAAA), situé 11 pb en amont de la queue polyA (Yousef & Diamandis, 1999).

La KLK5, comme les autres KLK, présente plusieurs formes d'ARNm. Ces formes peuvent résulter d'un épissage alternatif, d'un site alternatif d'initiation de la transcription ou de la conservation d'un segment intronique (Kurlender et al., 2004). Deux

variants d'épissage ont été identifiés pour le gène de la *KLK5* en plus de la forme classique comme possédant un cadre ouvert de lecture ou ORF. Les variants diffèrent selon le nombre et la longueur des exons non traduits dans la région 5'UTR et/ou des deux derniers exons. Les deux premiers variants d'épissage découverts ont été initialement appelés *KLK5-SV1 et KLK5-SV2* (Kurlender et al., 2004 ; Yousef et al., 2004a). En 2016, Adamopoulous et son équipe ont donné une nouvelle dénomination à ces 3 transcrits, *KLK5* v.1, v.2 et v.3, correspondant respectivement à la forme classique, au variant *KLK5-SV2 et KLK5-SV1* (Adamopoulos et al., 2017). Le variant *KLK5* v.2 a une longueur de 1438 pb et est composé de 7 exons, avec 2 premiers exons non traduits et 6 introns intermédiaires. La séquence d'ARNm du variant *KLK5 v.3* est de 1362 pb, plus courte de 203 pb que l'ARNm classique de *KLK5* en raison d'un site GC qui remplace le site donneur d'épissage GT le plus commun après l'exon non codant. Ces deux variants (KLK5 v.2 et KLK5 v.3), ainsi que l'ARNm classique de *KLK5* partagent un ORF commun, et produisent la même protéine de 293 acides aminés (Adamopoulos et al., 2017 ; Kurlender et al., 2004) (Figure 14).

De plus, d'autres variants d'épissage ont été identifiés plus récemment. Dans un premier temps, un nouveau variant d'épissage non codant (Numéro d'accès : AY461805) par rétention d'un intron entre les exons 4 et 5 (Figure 14) a été mis en évidence. Ce variant d'épissage comprend un codon « Stop » prématuré (PTC, *Premature Termination Codon*) et peut ainsi être ciblé par le mécanisme de dégradation des ARNm non-sens (*Nonsense-Mediated mRNA Decay*, NMD). De plus, Adamopoulos et ses collaborateurs ont identifié de nouveaux évènements d'épissage alternatif des transcrits de *KLK5*. Premièrement, une nouvelle jonction d'épissage, entre les exons 2 et 6, a révélé le nouveau transcrit KLK5 v.4 (numéro d'accession : KX571229). Ce variant n'a pas d'ORF car il contient un codon stop prématuré et sera candidat au mécanisme de dégradation NMD. Les auteurs ont aussi identifié le variant KLK5 v.5 (accession : KX571230), avec un nouvel exon de 48 nucléotides situé entre les exons 2 et 3 (Figure 14). Ce variant devrait coder pour une isoforme de la KLK5, tronquée au niveau N-terminal et constituée de 219 résidus d'acides aminés. Enfin, un nouveau transcrit KLK5 v.6 (accession : KX571231), contenant à la fois cette extension en 5' et une extension de 81 nucléotides dans l'exon 6, a été mis en évidence. Il est prédit pour coder un nouveau polypeptide avec la même extrémité C-terminale que les autres isoformes de la KLK5 (Adamopoulos et al., 2017).

Les ARNm de la *KLK5* sont exprimés dans plusieurs types de tissus tels que la peau, les testicules, le cerveau, les seins, la thyroïde, les glandes salivaires et les organes génitaux féminins. De nombreux tissus fœtaux expriment également les ARNm de *KLK5*,

notamment les os, la peau et les reins. L'expression protéique de la KLK5 a été retrouvée dans de nombreux liquides biologiques, y compris les sécrétions vaginales, le lait maternel et le liquide séminal (Yousef & Diamandis, 1999). En plus des ARNm de la forme classique de *KLK5*, les variants d'épissage (KLK5-SV1 et KLK5-SV2) sont également exprimés dans certains tissus sains (KLK5-SV2) et cancéreux (KLK5-SV1).

III. Régulation de la KLK5 par les miARN

L'équipe de Chow et ses collaborateurs ont prédit *in silico*, plusieurs *miARNs* qui pourraient potentiellement cibler les transcrits de la KLK5 (Chow et al., 2008). De plus, une étude récente a montré dans les tissus rénaux que les ARNm de la KLK5 pouvaient être ciblés par le miR-382. En effet, le miR-382 cible directement le promoteur du gène de la KLK5 et régule négativement son expression dans un contexte de la fibrose interstitielle rénale. L'inhibition du miR-382 augmente l'expression de la KLK5 ce qui empêcherait l'obstruction urétérale unilatérale (Kriegel et al., 2012).

IV. Structure protéique et localisation de la KLK5

Dans sa forme complète, la KLK5 est composée de 293 acides aminés. Elle est constituée d'un peptide signal de 29 acides aminés (Met1-Gly22), d'un pro-peptide de 37 acides aminés (Val23-Arg66) et d'une enzyme mature constituée de 227 acides aminés (Ile67-Ser293). La forme mature active contient la séquence conservée de la triade catalytique des protéases à serine (Ser195, Asp102 et His57) et 4 sites potentiels de N-glycosylation (résidus 3, 107, 147 et 186). L'aspartate en position 173 est positionné au fond de la poche S1 et donne la spécificité du substrat (Brattsand & Egelrud, 1999).

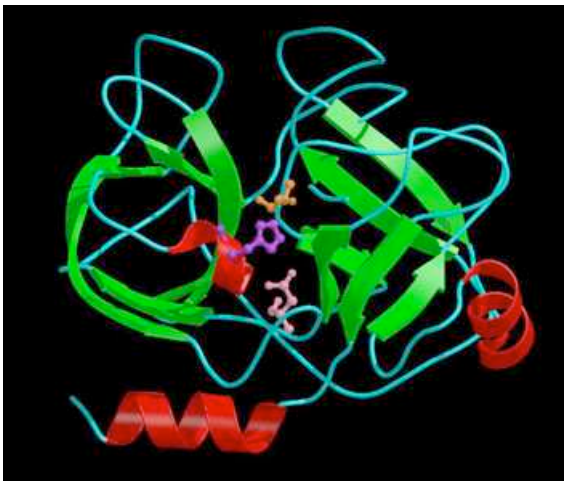


Figure 15 : structure tridimensionnelle de la KLK5 (MEROPS S01.037). *Les feuillets β sont représentés en vert, les hélices α en rouge. Les résidus du site actif sont également représentés : l'histidine 57 en mauve, l'acide aspartique 102 en rose et la serine 195 en orange.*

La conformation tridimensionnelle de la KLK5, comme celle de cinq autres KLK (KLK1-4 et KLK6), montre un repliement de feuillets β (vert) constitués de 6 brins anti-parallèles. A cette disposition s'ajoute deux hélices α (rouge) qui forment la boucle des KLK permettant l'exposition du site catalytique (Figure 15) (Kalinska et al., 2016) (MEROPS S01.037).

L'enzyme KLK5 purifiée a une activité de type trypsine et clive ses substrats de préférence après une Arginine ou une Lysine en position P1. La KLK5, comme toutes les KLK, est synthétisée sous forme de pré-pro-enzyme. C'est dans l'étape de sécrétion que le peptide signal est clivé et que le zymogène (ou pro-enzyme) est alors libéré dans le milieu extracellulaire. Lors de son activation, le pro-peptide est clivé pour générer l'enzyme mature active. La pro-KLK5 produite en levure a présenté 4 bandes correspondant aux masses moléculaires de 44, 40, 35 et 30 kDa. La séquence N-terminale (Ile-Ile-Asn-Gly-Ser-Asp) des 4 bandes correspond à celle de la forme active, suggérant la capacité de la KLK5 à s'auto-cliver. De plus, la dé-glycosylation de ces 4 bandes de KLK5 a généré une seule bande de 26 kDa, démontrant une glycosylation différentielle de la KLK5 (Michael et al., 2005b). La KLK5 recombinante, produite dans un système de cellules de mammifère, montre une masse moléculaire de 50 kDa. Dans les liquides biologiques, en plus de la forme libre de 40 kDa, la KLK5 forme des complexes avec certains inhibiteurs, notamment avec l'α2AP et l'AT qui sont des inhibiteurs de type SERPINE (Michael et al., 2006).

V. Autoactivation et activation par d'autres KLK

Les kallicréines, sécrétées sous forme de zymogènes inactifs (Pro-KLK), sont activées après le clivage protéolytique de leur pro-peptide à l'extremité N-terminale, ceci *via* un auto-clivage ou *via* le clivage par une autre KLK ou par une autre protéase (Borgoño & Diamandis, 2004). Il a été tout d'abord montré que la KLK5 était capable d'activer son propre précurseur à un pH situé entre 7 et 9. Cette auto-activation à partir de la proforme sécrétée, représente la phase initiale de la cascade protéolytique qui déclenche l'activation de plusieurs autres KLK, dont les KLK2, 3, 6, 7, 11, 12 et 14. L'activation des KLK7 et 14 par la KLK5 est souvent optimale aux pH acides, proches de ceux de la couche cornée de la peau (Figure 16) (Caubet et al., 2004).

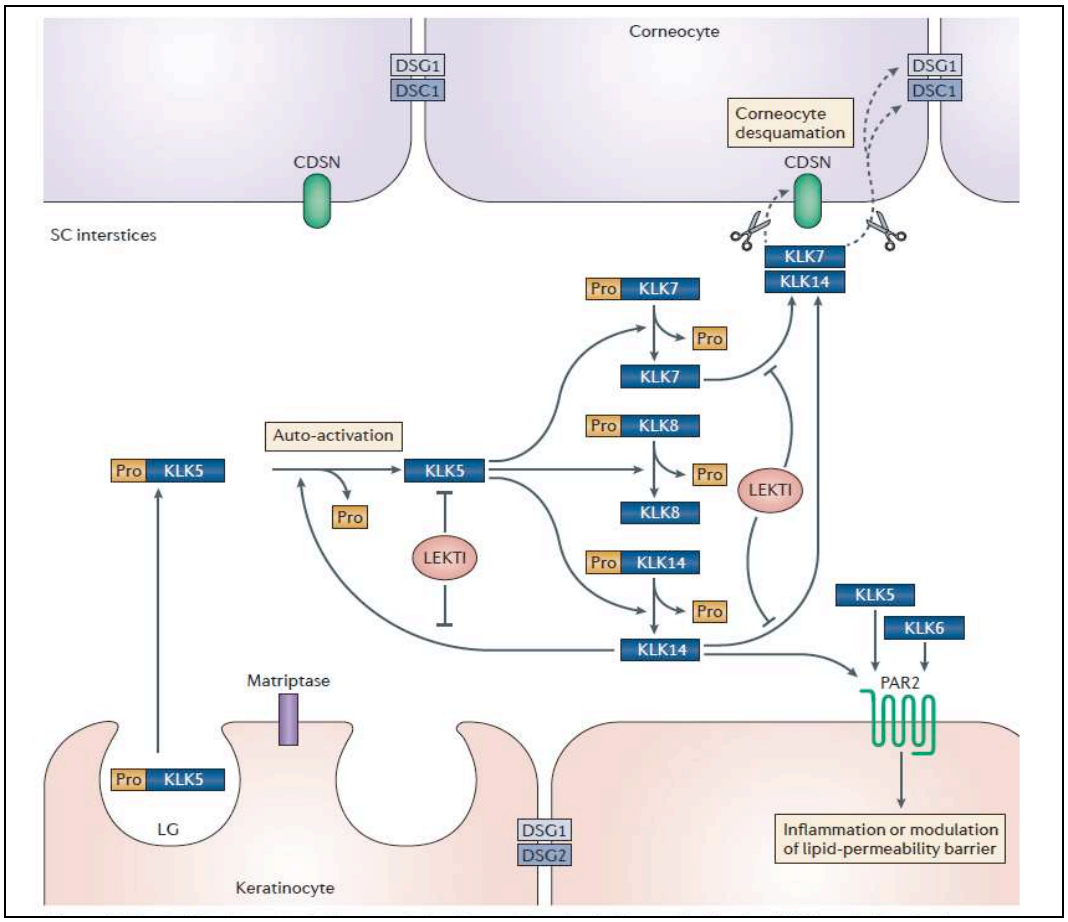


Figure 16 : Cascade protéolytique initiée par la KLK5 lors de la desquamation de la peau. *La pro-kallicréine 5 est produite par les granules lamellaires (LG) des kératinocytes et sécrétée dans l'espace interstitiel de la couche cornée (stratum corneum, SC). La KLK5 s'autoactive et active les proformes des KLK7, 8 et 14. La KLK14, par une boucle de régulation positive, active la pro-KLK5. Les KLK5 et 7 clivent les cadhérines desmosomales comme la desmogléine 1(DSG1), la desmocolline 1(DSC1) et la cornéodesmosine (CDSN) conduisant à un détachement des cornéocytes et à la desquamation de la peau. Des inhibiteurs comme LEKTI (Lympho-epithelial Kazal-type-related inhibior) régulent l'activité des kallicréines. Les KLK5, 6 et 14 activent le récepteur PAR2 (Protease Activated Receptor 2) pour moduler l'inflammation et la perméabilité de la membrane lipidique (Prassas et al., 2015).*

L'activation de ces KLK joue un rôle important dans plusieurs processus physiologiques. Par conséquent, la KLK5 est considérée comme le régulateur clé de la cascade protéolytique extracellulaire des KLK au sein du microenvironnement (Michael et al, 2006). Dans la prostate, la KLK5 peut efficacement activer les pro-KLK2 et 3 par clivage, avec un ratio de 10 :1. Cependant, ce clivage n'est pas toujours activateur, car il a été montré que la KLK5 peut aussi inactiver ces deux KLK. Le clivage inhibiteur de la KLK3 se fait entre les résidus Arg85-Phe86 et Lys182- Ser183 tandis que celui de la KLK2 a lieu entre les résidus Arg145- Ser146 et Arg226-Lys227 (Brattsand et al., 2005). Bien que la KLK5 soit considérée, de par sa capacité d'auto-activation, comme un initiateur de la cascade protéolytique des KLK, elle peut aussi être activée par d'autres protéases telles que la mésotrypsine et la matriptase. D'autres membres des kallicréines comme les KLK14 et 6 peuvent également l'activer en retour (Miyai et al., 2014 ; Kishibe, 2019)

VI. Régulation de l'activité de la KLK5

1. *Cations*

L'activité de la KLK5, comme celle d'autres KLK, est connue pour être régulée par certains cations présents dans les milieux physiologiques ($Zn^{2+,}$ Ca^{2+}, Mg^{2+} et K^{+}) et par le citrate. Alors que le citrate anionique à forte concentration semblait améliorer l'activité de la KLK5, il a été montré que cette activité était efficacement inhibée par l'ion métallique Zn^{2+}, ceci à des niveaux inférieurs à sa concentration physiologique, notamment dans la prostate (Michael et al., 2006). Le zinc a été par la suite présenté pour inhiber d'autres KLK comme les KLK2-5, 7-8, 12 et 14 à de faibles concentrations et ceci avec une constante d'inhibition (Ki) comprise entre 2 et 8 μM (Brattsand et al., 2005; Goettig et al., 2010). Le mécanisme d'inhibition des KLK par le Zn^{2+} est généralement de type non-compétitif. Ce sont des résidus histidines avoisinant le site catalytique qui rendent possible cette inhibition. Pour la KLK5, en l'absence du Zn^{2+} la triade catalytique (His57, Asp102 et Ser195) est connectée par des liaisons hydrogènes. Lors de la fixation du Zn^{2+}, une coordination de l'inhibiteur avec les résidus histidines 96 et 99 est observée. Cette interaction aboutit à une rotation de la chaine latérale de l'His57 lui permettant de servir de 3e ligand au Zn^{2+} en dehors du site actif, ce qui perturbe alors le site catalytique et inhibe l'enzyme (Figure 17). Néanmoins, la poche enzymatique reste toujours disponible pour fixer le substrat, mais la mauvaise orientation de ce dernier explique ainsi l'inhibition non compétitive de la KLK5. En plus, une étude a montré qu'en présence du Zn^{2+} (12 nM), une activité résiduelle de type

trypsine de la KLK5, de 25%, a été retrouvée avec les substrats tripeptidyl-AMC (Debela et al., 2007b; Goettig et al., 2010).

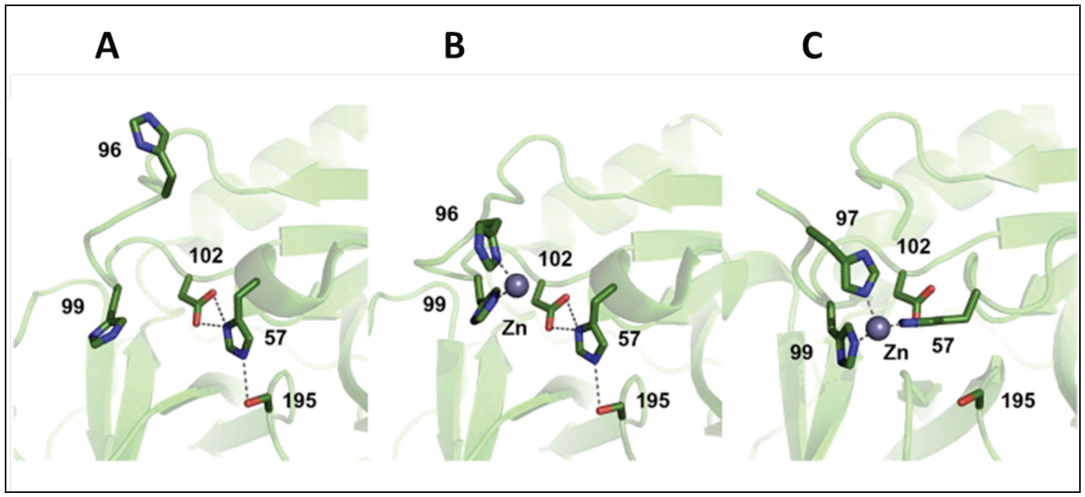


Figure 17 : Liaison du Zn^{2+} au niveau du site actif de la KLK5 dans l'orientation standard.
A) le site actif libre de KLK5 composé des histidines 96 et 99 situées loin de la poche S2. La triade catalytique est constituée de la sérine 195, de l'histidine 57 et de l'aspartate 102, acides aminés qui sont reliés par des liaisons hydrogènes. B) L'ion Zn^{2+} (sphère grise) s'est lié aux His96 et 99 de la KLK5 par des liaisons hydrogènes. C) L'His57 de la KLK2 a quitté la triade catalytique pour faire une 3e liaison avec le $Zinc^{2+}$, lui-même relié aux histidines 99 et 97. Cette conformation montrée avec la KLK2 serait probablement similaire pour la KLK5 et représente l'état inhibé de la KLK par le $Zinc^{2+}$. Ce modèle est en accord avec le fait que l'inhibition de la KLK5 par le $Zinc^{2+}$ est non compétitive (Goettig et al., 2010)

2. Inhibiteurs de type künitz

A l'heure actuelle, le seul inhibiteur de type Künitz rapporté pour inhiber la KLK5 est l'inhibiteur de l'activateur de l'hormone HGF, appelé inhibiteur HGFA (*Hepatocyte growth factor activator*) de type 1. Cet inhibiteur inhibe efficacement l'activité de la KLK5 mais aussi celle de la KLK4 dans le foie (Mukai et al., 2008). Dans la partie D, un autre inhibiteur de type Künitz, *le Tissue Factor Pathway Inhibitor 2* (TFPI-2), sera plus amplement décrit puisque nous avons démontré pour la première fois qu'il est également un inhibiteur efficace de la KLK5.

3. Inhibiteurs de type SERPINE

Les SERPINES sont une famille d'inhibiteurs qui ciblent presque exclusivement les protéases de la famille S1. Elles sont les inhibiteurs les plus impliqués dans le contrôle de l'activité des KLK. Parmi les SERPINES, l'AT, l'α2-AP et l'α2-macroglobuline inhibent l'activité de la KLK5. L'inhibition de la KLK5 par l'α2-AP est 24 fois plus rapide que celle

obtenue avec l'AT. La KLK5 forme un complexe de 97 kDa avec les deux SERPINES (AT et α2-AP). Bien que la KLK5 se présente sous 4 formes de glycosylation (position $NGSD^{69}$, $NVSS^{173}$, $NISV^{208}$ et $NGSL^{252}$), toutes actives, seules deux formes (36,5 kDa et 31 kDa) sont capables de former des complexes avec l'AT et l'α2-AP. Il est donc possible que certaines formes de glycosylation affectent l'interaction entre la KLK5 et les inhibiteurs. La KLK5 réagit notamment avec l'α2-AP à la fois par la « voie inhibitrice », *via* la formation de complexes, et par la « voie substrat », en clivant l'inhibiteur, générant ainsi deux bandes avec des masses moléculaires autour de 8 kDa et 54 kDa (Michael et al., 2005b). Aucune inhibition de la KLK5 n'a été observée avec l'α1-AT et l'ACT, tandis que l'α2M est capable d'inhiber 50% de l'activité de la KLK5 lorsqu'elle est mise 100 fois en excès par rapport à l'enzyme (Michael et al., 2005b).

4. Inhibiteur de type Kazal

4.1. Inhibiteur SPINK5/LEKTI-1

Les inhibiteurs de type Kazal sont plus spécifiques d'un tissu et sont principalement connus pour inhiber de manière réversible l'activité de la KLK5. Ces inhibiteurs ont un domaine Kazal constitué de deux courtes hélices α, maintenues par des ponts disulfures et un feuillet β double brin. Ce domaine Kazal interagit *via* une boucle, avec le site actif de la protéase (Goettig et al., 2010). Parmi ces inhibiteurs, le premier décrit est le groupe des inhibiteurs canoniques de type kazal de la famille LEKTI (*Lympho-Epithelial Kazal-Type Inhibitor*), codés par les gènes de la famille *SPINK (Serine Proteinase INhibitor Kazal-type*). Ce groupe d'inhibiteurs a été initialement décrit sur la base de la découverte de SPINK5/LEKTI-1, une protéine de 120 kDa, qui joue un rôle important dans le développement de la peau. La structure primaire de cette protéine se compose de 15 domaines Kazal de structure différente (Mägert et al., 1999). Les domaines 6-8 et 9-12 ont été identifiés pour inhiber la KLK5 à pH 8 avec un Ki de 1,2 à 5 nM et à pH 5 avec un Ki de 10 à 20 nM. Les faibles Ki et les constantes de dissociation (1/2 de 20-25 min) indiquent une association étroite et spécifique de ces domaines avec l'enzyme KLK5 (Egelrud et al., 2005; Schechter et al., 2005). Il a été montré par la suite que tous les domaines de SPINK5/LEKTI-1 étaient capables d'inhiber efficacement la KLK5, hormis le domaine D2, qui l'inhibe faiblement. Ceci a permis de montrer que SPINK5/LEKTI-1 n'est pas un inhibiteur spécifique de la KLK5 mais peut également inhiber l'activité de plusieurs autres protéases telles que la KLK6 (domaine 6), la KLK7 (domaine 6-9), la KLK14, la plasmine, la subtilisine A, la cathepsine

G, l'elastase et la trypsine (Mitsudo et al., 2003 ; Egelrud et al., 2005 ; Jayakumar et al., 2004 ; Miyai et al., 2014).

4.2. Inhibiteur SPINK6

Un autre inhibiteur de type Kazal, nommé SPINK6, a été identifié à partir des extraits de la couche cornée plantaire humaine. Cet inhibiteur est similaire à SPINK5/LEKTI-1 mais contrairement à ce dernier, SPINK6 possède un seul domaine de type Kazal. L'inhibiteur SPINK6 s'est avéré être un inhibiteur puissant de la KLK5 (Ki : 1,33 nM) ainsi que des KLK7 et 14, avec des Ki respectifs de 1070 nM et 0,5 nM. Une inhibition d'autres KLK (KLK2, 4, et 6) par SPINK6 a également été obtenue (Fischer et al., 2014). Finalement, seules les KLK 1 et 8 ne sont pas inhibées par SPINK6. Ces données suggèrent que SPINK6 est un inhibiteur très puissant et sélectif des KLK 5 et 14 et pourrait présenter un intérêt thérapeutique pour moduler leurs activités (Meyer-Hoffert et al., 2010).

4.3. Inhibiteur SPINK9/LEKTI-2

Un nouvel inhibiteur, appelé LEKTI-2, codé par le gène *SPINK9* a été récemment identifié pour inhiber spécifiquement la KLK5 et sans effet sur les KLK7 et 14. Cet inhibiteur est exclusivement exprimé au niveau de l'épiderme palmo-plantaire alors qu'il l'est faiblement dans les autres zones cutanées. Une faible expression des ARNm de LEKTI-2 est aussi observée dans le thymus, le pancréas, le foie et le cerveau mais il n'est pas décelable dans d'autres tissus. Les études réalisées avec la protéine recombinante SPINK9/LEKTI-2 ont montré une inhibition spécifique de la KLK5 (Ki : 65 nM) alors que l'activité des KLK14 et 7, de la trypsine et de la chymotrypsine n'était pas modulée par cet inhibiteur (Meyer-Hoffert et al., 2009). De plus, la dégradation du fibrinogène par la KLK5 a été légèrement inhibée par de fortes concentrations SPINK6/LEKTI-2. L'analyse par résonnance plasmonique de surface a montré une liaison de SPINK9 avec les KLK5 et 8 alors qu'elle n'est pas mise en évidence avec les KLK7 ou 14 (Brattsand et al., 2009). Cette liaison se fait au niveau de la boucle réactive formée par les résidus Histidine 48 et 49 de SPINK9 et est dépendante d'un pH similaire à celui de la peau (Brännström et al., 2012). Contrairement à LEKTI-1, qui présente 15 domaines Kazal, l'inhibiteur LEKTI-2 n'en possède qu'un seul mais qui présente des analogies de séquence avec ceux de LEKTI-1. La spécificité d'inhibition de la KLK5 par LETKI-2 par rapport à LETKTI-1 pourrait donc s'expliquer par leur différence structurelle.

5. Inhibiteurs chimiques/Autres inhibiteurs de la KLK5

Dans le but d'apporter une perspective thérapeutique pour traiter les pathologies associées à la KLK5, plusieurs inhibiteurs chimiques de l'activité de cette enzyme ont été décrits ces dernières années. Par exemple, une série de nouveaux acides 3-acyltétramiques ont été développés en tant que nouvelle classe d'inhibiteurs de la KLK5, mais aussi de la KLK7 et de la trypsine (de Souza et al., 2019). A partir du criblage des banques de molécules chimiques, une molécule extraite du bois de *Caesalpinia sappan*, la brasiline, a ainsi été identifiée comme un nouvel inhibiteur de la KLK5 (IC50 : 20 μM, Ki : 6,4 μM). Les études de *docking* ont suggéré que la partie phénolique de la molécule brasiline se lie à la poche S1 de la KLK5 et forme une liaison hydrogène avec la sérine 195 (Di Paolo et al., 2019). D'autres inhibiteurs beaucoup plus sélectifs de la KLK5, devraient être découverts à l'aide de nouvelles méthodes de cristallographie et de modélisation (X-Ray) de la KLK5 (Thorpe et al., 2019 ; White et al., 2019).

VII. Implication de la KLK5 dans les processus physiologiques

1. Remodelage de la matrice extracellulaire

L'activité protéolytique de la KLK5 a déjà été prouvée sur un grand nombre de composants de la MEC et de certaines molécules plasmatiques. La KLK5 digère en effet efficacement et rapidement la fibronectine, la laminine et les collagènes de type I, II, III et IV de la MEC. La digestion de la vitronectine par la KLK5 génère 4 fragments principaux, deux d'environ 50 kDa et deux d'environ 25 kDa. Le séquençage du fragment N-terminal, généré en 15 minutes, a révélé que la KLK5 clive la vitronectine dans son domaine somatomédine B, lequel est le site de liaison de cette molécule au récepteur de l'urokinase et à l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène, le PAI-1 (Michael et al., 2005b). La KLK5 clive également la fibronectine, générant deux fragments de 40 et 70 kDa.

Les KLK sont aussi impliquées dans le remodelage des protéines matricielles de la famille des CCN. Ces protéines sont impliquées dans la régulation de la croissance, la différenciation cellulaire, l'inflammation et dans la régulation des mécanismes de réparation tissulaire (Jun & Lau, 2011). Parmi les 6 membres de la famille des CCN, il a été montré que la KLK5 clive les protéines CCN3 (NOV, *Nephroblastoma Overexpressed*) ; CCN4 (WISP1, *WNT1 Inducible signaling pathway protéin-1*) et CCN6 (WISP3, *WNT1 Inducible signaling pathway protéin-3*) (Guillon-Munos et al., 2011).

La dégradation par la KLK5 de composants plasmatiques tels que le plasminogène, le kininogène, et le fibrinogène a également été démontrée. Le clivage du plasminogène par la KLK5 génère deux fragments, P1 de 50 kDa et P2 de 30 kDa. Le premier fragment clivé représente une isoforme de l'angiostatine, nommée angiostatine 4.5 (AS4.5), un puissant inhibiteur de l'angiogenèse (Soff, 2000). Le fragment P2, comprenant le site catalytique de la plasmine, est similaire à la microplasmine, une protéine recombinante utilisée en thérapeutique (Wu et al., 1987). De plus, la KLK5 clive rapidement le fibrinogène au niveau de la chaine Bβ pour générer 3 fragments : le fibrinopeptide B (β1-15 avec les acides aminés de 1 à 15), β15-53 (avec les acides aminés de 15 à 53) et le carboxyl restant de la chaine Bβ. Le fibrinopeptide B, libéré sous l'action de la KLK5, est identique à celui obtenu lors du clivage du fibrinogène par la thrombine, générant alors des monomères de fibrine qui s'assemblent pour former le caillot. Enfin, la KLK5 est capable de libérer le domaine 3, de type cystatine, du kininogène, un puissant inhibiteur des protéases à cystéine. Contrairement à la KLK1, la KLK5 est incapable de libérer les fragments de type bradykinine à partir du kininogène de faible poids moléculaire (Michael et al., 2005b).

2. Maintien de l'intégrité et desquamation de la peau

Comme évoqué précédemment, les KLK5 et 7 ont initialement été extraites et identifiées à partir de la couche cornée et granuleuse de la peau et à ce jour, l'activité totale des protéases à serine de la peau a été attribuée aux KLK5, 8 et 14. Ces KLK, produites par les granules lamellaires des kératinocytes, sont transportées en même temps que d'autres protéines de la barrière cutanée (Brattsand et al., 2005). Après sécrétion dans le milieu interstitiel de la couche cornée, ces KLK participent à la cascade protéolytique initiée par l'auto-clivage de la proforme de la KLK5. Une fois active, cette dernière clive ensuite les pro-peptides des KLK7 et 14 après les résidus d'arginine et de lysine. La KLK14 active, peut en retour, activer la pro-KLK5 réalisant ainsi une boucle de régulation positive (Stefansson et al., 2006 ; Brattsand et al., 2009). Lors de la desquamation, cette cascade protéolytique déclenchée par la KLK5 a pour but de maintenir l'efficacité de la barrière cutanée grâce à son renouvellement et au maintien de son épaisseur et/ou par la prolifération des kératinocytes. La KLK5 permet également de moduler la perméabilité de la barrière cutanée, riche en lipides, en activant le récepteur PAR2 (Kirihara et al., 2003 ; Brattsand et al., 2005).

2.1. Dégradation des jonctions intercellulaires

Au sein de la couche cornée de la peau, la cohésion intercellulaire est assurée par les cornéodesmosomes qui sont des jonctions cellulaires dérivées des desmosomes (Skerrow et al., 1989 ; Chapman et al., 1991). La cornéodesmosine, la desmogléine 1 et la desmocolline 1 sont des protéines qui assurent les jonctions cellulaires entre les cornéocytes. La dégradation de ces protéines à la surface de l'épiderme est nécessaire à la desquamation de la peau, mécanisme dans lequel il a été montré que la KLK5 était très impliquée. En effet, Caubet et ses collaborateurs ont montré qu'à un pH acide, proche de celui de la couche cornée, la KLK5 (avec la KLK7) était capable de dégrader les 3 composants cornéodesmosomaux que sont les deux cadhérines desmosomales DSC1 et la DSG1, et la CDSN (Caubet et al., 2004 ; Descargues et al., 2006 ; Fortugno et al., 2011 ; Furio et al., 2014).

2.2. Libération du peptide antimicrobien LL37

Les cathélicidines sont des peptides antimicrobiens qui jouent un rôle important dans l'inflammation et la prévention contre l'agression d'une grande variété d'agents pathogènes. Plusieurs études ont démontré que la KLK5 était l'une des protéases impliquée dans la production du peptide antimicrobien LL-37 obtenu par clivage de la proforme hCAP18 (De Ménonville et al., 2017 ; Yamasaki et al., 2006). Ce peptide antimicrobien est libéré chez l'homme par les PNN au cours de l'inflammation ou de lésions tissulaires (Frohm et al., 1997 ; Dorschner et al., 2001).

2.3. *Activation des récepteurs des protéases*

Les récepteurs PAR (*Protease Activated Receptor*) sont des récepteurs cellulaires couplés aux protéines G. Ils sont activés, après clivage de leur extrémité N-terminale, essentiellement par des protéases à sérine à activité de type trypsine comme les KLK (Hollenberg et al., 2014 ; Dong et al., 2014a). Il est prouvé que la KLK5 active directement le récepteur PAR2, mobilise le calcium intracellulaire et active la voie de signalisation pro-inflammatoire NF-κB (Briot et al., 2009 ; Johnson et al., 2016).

3. Liquéfaction du sperme et physiologie prostatique

Dans la physiologie normale de la prostate, les KLK (principalement les KLK2 et 3) sont inhibées à des concentrations élevées de zinc. Lors de l'éjaculation, la diminution des ions Zn^{2+} va lever l'inhibition des KLK, déclenchant alors la cascade protéolytique dépendante de ces enzymes (Emami & Diamandis, 2007 ; Avgeris et al., 2011). Au cours de cette dernière, la KLK5 s'auto-active puis active les KLK2 et 3. La KLK3 dégrade ensuite la fibronectine ainsi que les séménogélines I et II avec pour conséquence la liquéfaction du caillot séminal et la libération des spermatozoïdes (Figure 18). De plus, d'autres études ont montré que les KLK5 et 14 peuvent directement dégrader les séménogélines. Ces données suggèrent que des dysfonctionnements de cette cascade d'activation peuvent conduire à des problèmes de liquéfaction du sperme et ainsi expliquer certains phénomènes d'infertilité masculine (Michael et al., 2006 ; Laflamme & Wolfner, 2013 ; Prassas et al., 2015).

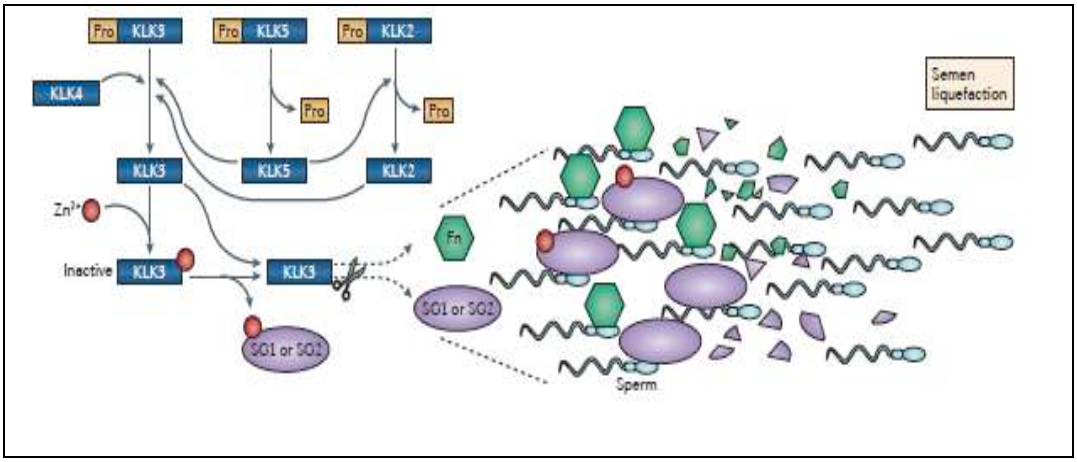


Figure 18 : Implication de la KLK5 dans la liquéfaction du caillot séminal. *Dans la prostate, les kallicréines sont inactivées par le Zn^{2+}. A l'éjaculation, les protéines seménogléines captent les molécules de zinc levant ainsi l'inhibition des KLK. La KLK5 qui s'autoactive, active les pro-KLK2 et 3. La KLK4 peut elle aussi activer la KLK3. Cette dernière clive la fibronectine (Fn) et les séménogélines I ou II pour liquéfier le caillot séminal et libérer les spermatozoïdes mobiles (Laflamme & Wolfner, 2013)*

VIII. Implication de la KLK5 dans les processus pathologiques

1. Pathologies cutanées

1.1. Syndrome de Netherton

Le syndrome de Netherton (SN) est une maladie cutanée autosomique récessive rare et sévère. Il est caractérisé par la présence d'une peau extrêmement sèche et rugueuse (ichtyose), un défaut spécifique de la tige pilaire (trichorrhexie ou « cheveux en

forme de bambou ») et des manifestations atopiques sévères. Ces manifestations sont également associées à une dermatite atopique, un rhume des foins avec des taux élevés d'IgE et une hyperéosinophilie (Eady, 1990). Les nourrissons atteints de cette pathologie ont un développement anormal et les complications telles que la déshydratation et l'hypernatrémie entrainent souvent une mortalité postnatale élevée. Par cartographie d'homozygotie et des analyses de liaison, une première étude a localisé le locus du gène impliqué dans ce syndrome entre la D5S463-D5S2013 sur le chromosome 5q32, une région où se situe le gène codant pour l'inhibiteur de protéase LEKTI (Chavanas et al., 2000).

Le fait que LEKTI ait été décrit dans le thymus et les épithéliums muqueux comme précurseur de deux fragments, dont l'un possédait des effets anti-trypsine et régulait l'activation, la communication cellulaire et la voie de signalisation pro-inflammatoire NF-κB, a permis de suggérer que LETKI serait impliqué dans la pathogenèse du SN. De plus, les analyses de *northern blot* sur des biopsies cutanées de 5 patients atteints de ce syndrome ont montré une réduction marquée de l'expression de LEKTI, suggérant des anomalies au niveau transcriptionnel du gène. L'analyse des mutations sur le gène *SPINK5,* codant LEKTI, a montré 11 mutations sur les 13 patients étudiés. Ces mutations comprenaient 1 mutation non-sens (R790X), 4 insertions mononucléotidiques (238insG, 720insT, 2258insG, 2468ins1), 2 suppressions mono/dinucléotide (153delT, 1086delAT) et 4 mutations des sites d'épissage (81G→A, 283-2A→T, 1888-1G→A, 2313G→A). Environ 9 de ces mutations généraient des codons d'arrêt de traduction prématurés, prédisant une instabilité de l'ARNm de *SPINK5*. Ces données sur les allèles mutés de *SPINK5* prédisaient une absence totale de protéine suite à une dégradation accélérée de l'ARNm de *SPINK5* ou à une perte de fonction de LEKTI par production d'une protéine tronquée (Chavanas et al., 2000).

Plusieurs études ont ensuite montré que les souris KO pour *SPINK5* reproduisaient les caractéristiques du SN telles que la desquamation de la peau, l'ichtyose sur les poils des souris, l'hyperkératinisation et la perte de l'intégrité de la barrière cutanée. L'invalidation de *SPINK5*/LEKTI a conduit à une activité protéolytique accrue des KLK5 et 7, aboutissant à une dégradation anormale des cornéodesmosomes, notamment de la desmogléine-1 (Descargues et al., 2005). De plus, l'élastase E2 (ELA2) a été également identifiée par spectrométrie de masse dans les tissus de ces souris avec le gène *SPINK5* invalidé. Cette protéase, spécifiquement localisée au niveau de la couche granulaire de l'épiderme, présentait une activité protéolytique augmentée vis-à-vis de son substrat, la pro-fillagrine. Les auteurs ont ensuite montré que l'activité de ELA2 était induite par la KLK5 et régulée par le SLPI (Bonnart et al., 2010). L'équipe de Descargues a par la suite démontré

que l'expression de la DSC1 et de la DSG1 des cornéodesmosomes était considérablement réduite chez les patients atteints du SN et que cette perte d'expression était associée à une forte activité des KLK5 et 7 dans la couche granulaire de la peau. Les patients avec une activité résiduelle de LETKI, présentaient une plus faible dégradation de la cadhérine et développaient une maladie moins sévère. Ces données ont ainsi établi une corrélation entre l'intensité de la dégradation de la cadhérine desmosomale et la gravité de la maladie (Descargues et al., 2006). La perte de SPINK5/LEKTI dans le SN a ensuite été associée avec l'activité de la KLK5 et l'installation de l'inflammation dans cette pathologie. En effet, les auteurs ont observé la présence de cellules immunitaires infiltrant les greffes de peau des souris SPINK5 KO, associée à une surexpression des médiateurs de l'inflammation tels que TSLP (*Thymic Stromal LymphoPoietin*), ICAM-1 (*IntraCellular Adhesion Molecule 1*), PAR2 et IL-1β. Ainsi, l'hyperactivité de la KLK5 a directement induit la surexpression des cytokines TSLP, IL-8 et du TNFα *via* l'activation du récepteur PAR2 et la voie NF-κB. Ces cytokines stimulent ensuite la sécrétion des chimiokines TARC (*Thymus and Activation-Regulated Chemokine*) et MDC (*Macrophage-Derived Chemokine)* par les kératinocytes et les fibroblastes du derme, lesquelles vont déclencher le recrutement des PNN et des mastocytes infiltrant la peau (Briot et al., 2009).

De manière intéressante, les souris transgéniques surexprimant KLK5, sous contrôle du promoteur de l'involucrine, au niveau de la couche granulaire de l'épiderme ont montré une forte activité de la KLK5 et de ses protéases cibles (KLK7, 14 et ELA2) et des MMP-9 et -2. Ces souris ont reproduit les caractéristiques du SN, particulièrement une barrière cutanée défectueuse, un retard de croissance, des anomalies capillaires, des blessures constantes, un détachement de la couche cornée en lien avec le clivage des desmosomes. La surexpression de KLK5 était également associée à une augmentation des cytokines proinflammatoires (TSLP, TNFα, IL1β, ICAM-1, les IL-18, -4, -17, -22 et -23-p19), des chimiokines (CXCL1, S100a7, a8 et a9) et celle des molécules proallergiques (TSLP, IgE, IgG, IgG1 et IgG2a) (Furio et al., 2014). De plus, la génération de souris KLK5 KO ou KLK7 KO sur des animaux déjà SPINK5 KO n'a pas permis d'inhiber complètement les caractéristiques du SN. Seule la génération des souris triple KO SPINK5-KLK5-KLK7 permettait de restaurer les fonctions et l'intégrité de la barrière cutanée, d'inhiber l'inflammation et d'empêcher la mort prématurée observée chez les souris SPINK5 KO. Cette étude a permis de démontrer que la KLK5 seule n'était pas responsable des manifestations du SN. La KLK7 était aussi un facteur majeur dans l'installation et le maintien des caractéristiques de cette pathologie (Kasparek et al., 2017).

1.2. Dermatite atopique

La dermatite atopique (DA), aussi appelée eczéma atopique, est une maladie chronique inflammatoire de la peau. Elle est caractérisée par une sécheresse cutanée associée à des lésions de type eczéma (rougeurs et démangeaisons), qui évoluent par poussée. Une augmentation de l'activité de la KLK5 a été rapportée dans cette pathologie dont les conséquences sont similaires à celles décrites dans le SN. Une étude a montré que l'activité de la KLK5 et la dégradation de la protéine de jonction DSG1 étaient augmentées, alors que l'expression de PAR2 était normale. L'activité de PAR2 n'était augmentée que lors de la surexpression transitoire de la KLK5 tandis que si elle était permanente une dégradation de la DSG1, de la filaggrine et la production des cytokines IL-8, IL-10 et TSLP, étaient induites sans changement de l'activité de PAR2. Contrairement au SN, il a été suggéré que l'installation de l'inflammation par production des cytokines était, dans la DA, indépendante de l'activité du récepteur PAR2 (Walley et al., 2001; Zhu et al., 2017). Le pH cutané, qui contribue à l'homéostasie de la barrière cutanée, à l'adhérence de la couche cornée et à l'activité des protéases, a également été incriminé dans cette pathologie. En effet, le pH dans la peau est régulé par plusieurs facteurs tels que l'acide urocanique, produit lors de la dégradation de la filaggrine, ou par l'échangeur d'ion sodium/hydrogène appelé NHE1 (*Na+/H+ exchanger 1*). En effet, Jang et son équipe ont montré que l'alcalinisation de la peau dans la DA était due à un dysfonctionnement de l'échangeur d'ions NHE1 et à une accumulation de filagrinne, induisant une surexpression de la KLK5 indépendante de PAR2 (Jang et al., 2016).

1.3. La rosacée ou Acné rosacée

L'acné rosacée est une maladie inflammatoire qui se caractérise par un érythème, des papulopustules et des télangiectasies. L'étiologie de la maladie est inconnue, bien qu'elle soit exacerbée par la libération de cathélicidine (Yamasaki et al., 2007). Les kératinocytes de patients atteints de rosacée produisent de manière anormalement élevée le fragment bioactif LL-37, issu du clivage de la cathélicidine par la KLK5. De plus, une augmentation des cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et TNFα) et du récepteur TLR2 a été rapportée (Meyer-Hoffert & Schröder, 2011). L'acide tranexamique, un inhibiteur de la fibrinolyse, utilisé en thérapie anti-hémorragique, peut neutraliser les mécanismes pro-inflammatoires (cytokines, KLK5, etc.) observés dans la rosacée (Li et al., 2019).

2. Implication de la KLK5 dans les cancers

2.1. Cancer de la peau

Une étude récente a montré, à partir de coupes de peau, que les souris KLK5 KO présentaient une augmentation de la longueur de leurs desmosomes, une augmentation de l'expression de la DSG1, une amélioration de la résistance et de l'intégrité cutanée. Une meilleure réparation des lésions cutanées et une résistance au développement de cancer cutané induit chimiquement ont également été observées chez ces souris. Les auteurs ont suggéré que l'augmentation du nombre de desmosomes, due à la plus faible activité protéolytique chez les souris KLK5 KO, permettrait une localisation membranaire de la β-caténine, inhibant ainsi son implication dans la progression tumorale. Une augmentation de l'apoptose des kératinocytes dans la peau inflammée de ce modèle murin expliquait également la résistance à la formation de cancer (Pampalakis et al., 2019).

2.2. Cancer des ovaires

Le cancer des ovaires est l'un des cancers les plus agressifs chez la femme et se distingue par un très mauvais pronostic. L'équipe de Kim et ses collaborateurs ont rapporté pour la première fois dans le cancer de l'ovaire que les ARNm de *KLK5* étaient fortement exprimés dans 41% des échantillons analysés, alors que l'expression de la *KLK5* était très faible dans les tissus normaux. Une corrélation positive était établie, entre l'expression de la *KLK5,* le grade de la tumeur et le stade de la maladie. A partir de ces données, une analyse univariée a révélé que les patients avec des tumeurs positives pour KLK5 avaient un risque accru de rechute et de décès (Kim et al., 2001). Une autre étude a analysé l'expression des transcrits des *KLK5* et *7* dans les tissus de cancers ovariens bénins, malins et dans les cellules de culture primaire de l'ovaire. L'expression des transcrits et de la protéine KLK5 était augmentée plus spécialement dans les cancers ovariens de type séreux (Dong et al., 2003 ; Yousef et al., 2003 ; Gong et al., 2019). Deux variants d'épissage de la KLK5 (KLK5-SV1 et KLK5-SV2) sont aussi surexprimés dans les tissus du cancer de l'ovaire par rapport aux tissus normaux (Kurlender et al., 2004). La KLK5 a également été décrite comme un biomarqueur circulant pouvant être corrélé à la survie des patients atteints de cancer de l'ovaire. Les auteurs ont ainsi comparé les taux de KLK5 dans les sérums et les liquides d'ascite de 52 patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire à différents stades avec ceux des patientes atteintes des tumeurs ovariennes benignes. Des concentrations plus élevées de la

KLK5 ont été retrouvées dans le sérum de 69% des patientes atteintes d'un cancer et dans 55% des tissus cancéreux par rapport aux tissus normaux. Les liquides d'ascite des cancers ovariens contenaient des taux plus élevés de KLK5 que dans les liquides d'ascite ou d'épanchement bénins d'autres types de cancers. De plus, l'expression de la KLK5 était faible dans les cancers bénins, suggérant la KLK5 comme biomarqueur de détection précoce de ce cancer (Yousef et al., 2003 ; Dorn et al., 2011). Une autre équipe a montré la présence des anticorps sériques (IgG et IgM) dirigés contre la KLK5 chez les patientes présentant des niveaux indétectables de la KLK5 dans le sang. Ces auteurs ont alors suggéré la KLK5 comme une cible thérapeutique pour développer une immunothérapie anti-cancéreuse (Bandiera et al., 2009). Dans une nouvelle étude, Dorn et ses collaborateurs ont observé que les tissus cancéreux ovariens (KLK5-Tc) exprimaient plus fortement la KLK5 comparés aux cellules stromales (KLK5-sc) chez les patientes avec un cancer de stade avancé. De plus, les patientes avec la KLK5-sc élevée présentaient un risque 2x plus faible de récidive par rapport aux patientes avec la KLK5-sc faible. Ces résultats suggèrent l'expression de la KLK5-sc comme un facteur pronostic favorable dans le cancer de l'ovaire (Dorn et al., 2015). Prezas et ses collaborateurs ont montré l'implication des KLK4, 5, 6 et 7 dans les mécanismes d'agressivité des cellules cancéreuses ovariennes. En effet, la surexpression simultanée de ces kallicréines dans les cellules cancéreuses ovariennes OV-MZ-6 rendait les cellules beaucoup plus invasives *in vitro*. Une augmentation de 92% de la taille de la tumeur a également été observée lorsque ces cellules OV-KLK4-7 étaient inoculées à des souris, suggérant fortement l'implication de ces KLK dans les mécanismes de progression tumorale (Wang et al., 2018a). L'expression combinée de ces 4 KLK a aussi été associée à l'agressivité tumorale et à la chimiorésistance dans le cancer ovarien. En effet, l'adhérence des cellules OV-KLK4-7 à la fibronectine et à la vitronectine était réduite comparée à celles des cellules parentales. Ces résultats s'expliquaient par la diminution de l'expression des intégrines α5β1 (récepteur de la fibronectine) et αvβ3 (récepteur de la vitronectine). De plus, les cellules OV-KLK4-7 ont présenté une augmentation de la chimiorésistance au paclitaxel par rapport aux cellules contrôles, résistance associée à l'activation de la voie des MAPKinases *via* l'augmentation de la phosphorylation de ERK1/2 (Loessner et al., 2012). Les cellules surexprimant les KLK4-7, ont également présenté une expression augmentée des ARNm de plusieurs gènes impliquées dans la progression cancéreuse tels que *MSN (Moesin)* et *KRT19 (Cytokeratin 19),* qui sont suggérés comme des cibles thérapeutiques intéressantes dans le cancer de l'ovaire (Wang et al., 2018a).

2.3. Cancer du sein

La KLK5 est connue comme étant régulée par les hormones stéroïdiennes, c'est pourquoi plusieurs études ont montré l'implication de la KLK5 dans le cancer du sein. Cependant, selon les sous-types de cancers, l'action de la KLK5 est associée soit à une activité pro-tumorale soit à une activité anti-tumorale. Par exemple, une étude chez 179 patientes, à différents stades du carcinome épithélial du sein a montré une expression élevée de la *KLK5*, plus fréquemment chez les patientes présentant des tailles de tumeur supérieures à 2 cm et celles avec des atteintes ganglionnaires. L'expression de la KLK5 était plus élevée chez les patientes pré/périménopausées, présentant des ganglions envahis, et négatives aux récepteurs des œstrogènes (RE) (Yousef et al., 2002a). De manière cohérente, des concentrations plus élevées de KLK5 ont été trouvées dans le sérum de 49% des patientes atteintes d'un cancer du sein (Yousef et al., 2003). Cependant, le variant d'épissage KLK5-SV2, relativement exprimé dans les tissus mammaires normaux, n'était pas détecté dans les tissus cancéreux. Ceci suggère ce variant comme un biomarqueur diagnostique potentiel du cancer du sein (Yousef et al., 2004a). Talieri et son équipe ont également montré une forte expression des KLK5 et 7 dans les échantillons tumoraux. Cette expression était significativement associée à celle des récepteurs aux œstrogènes. Cependant, les auteurs ont observé que l'expression de la KLK5 était un facteur pronostic indépendant de la survie globale et de la survie sans rechute de la maladie (Talieri et al., 2011). Les KLK5, 6 et 10 ont aussi été retrouvées par ELISA et par une approche protéomique dans les surnageants des cellules cancéreuses mammaires (MCF-10A, BT474 et MDA-MB-468) (Kulasingam & Diamandis, 2007).

D'autres études ont par la suite présenté la KLK5 comme un gène suppresseur de tumeur. En effet, l'analyse de l'expression de la KLK1 et des KLK4-15 dans 21 cancers du sein et 3 lignées cellulaires normales du sein a montré que l'expression des KLK5 et 7-11 était significativement plus faible dans les cellules cancéreuses comparée à celle des cellules normales. Cette sous-expression des KLK était liée à la présence des récepteurs androgènes (Watrowski et al., 2020). Une régulation négative de l'expression de la KLK5 et des KLK6, 8, 10 a été mise en évidence dans les tumeurs malignes et dans les lignées cellulaires de cancer de sein, par rapport aux tumeurs bénignes. Une corrélation avec le statut pré-ménauposique et la négativité pour les RE était toujours retrouvée (Yousef et al., 2004b ; Avgeris et al., 2011). De même, l'expression protéique de la KLK5 dans les cellules épithéliales de tissus mammaires normaux était environ 21 fois plus élevée que dans les

cellules épithéliales des tissus cancéreux HER+ (*Human Epidermal growth factor Receptor*) (Zubor et al., 2015). De plus, il a été montré dans les tissus métastatiques du cancer du sein, que la KLK5 était faiblement exprimée, comparée aux tissus de la tumeur primaire. Les ARNm des *KLK5* et *7* étaient également significativement corrélés avec le statut post-ménauposique et le statut positif des RE (Li et al., 2009). La réexpression de la KLK5 dans différentes lignées cellulaires de cancer du sein, exprimant faiblement la KLK5 a considérablement réduit leur l'agressivité. Ainsi, dans les cellules MDA-MB-231, réexprimant KLK5, l'agressivité était réduite par une inhibition de la transcription des gènes impliqués dans l'adhérence et l'invasion de la MEC *via* les laminines, les collagènes 4A2, 6A1, 5A2, et 5A1, les MMP-2, -9 et -15, et par une activation de la voie du mevalonate impliquée dans la synthèse du cholesterol (Sidiropoulos et al., 2014). Un autre mécanisme a été décrit dans les cancers de sein luminaux, dont les cellules sont proches des cellules épithéliales et expriment fortement les RE (Luminal A, bon pronostic) ou faiblement (Luminal B, mauvais pronostic). En effet, dans ces sous-types de cancer la surexpression de la KLK5 induit une augmentation de miARN-183-5p et une réduction de l'expression du gène *ITGB1* de l'intégrine β1. De plus, dans les cancers du sein triple négatifs (Récepteurs Œstrogènes (RE), à la progestérone (RP) et HER2 négatifs), une forte expression de la KLK5 a été corrélée avec une forte expression de miARN-183-5p et une faible expression du gène *ITGB1*. En revanche, dans le cancer luminal A ou B, une faible expression de la KLK5, du miARN-183-5p et une forte expression de l'intégrine β1 ont été mises en évidence. Ces études ont suggéré la KLK5 comme un biomarqueur du cancer de sein (Sidiropoulos et al., 2014). Enfin, une étude a proposé la KLK5 comme marqueur prédictif des réponses à la chimiothérapie dans le cancer du sein. Les auteurs ont constaté que l'expression de la KLK5 était augmentée de 12 fois dans des cellules BT-20 traitées avec du docétaxel et de 10 fois en présence de methotrexate et qu'elle était associée à la diminution de la viabilité de ces cellules (Papachristopoulou et al., 2013).

2.4. Cancer de la prostate

Le cancer de la prostate est le plus fréquent chez l'homme et la 2ème cause de mortalité par cancer, après celui du poumon. Le biomarqueur du cancer de la prostate le plus établi est la PSA, codé par le gène de la *KLK3* dont l'expression est élevée au cours de la maladie. La KLK5 étant également impliquée dans la physiologie prostatique, des études ont suggéré cette protéase comme un second biomarqueur du cancer de la prostate.

Une étude a montré que l'expression des ARNm de la KLK5 est significativement plus faible dans les tissus cancéreux prostatiques par rapport aux tissus sains. Les niveaux d'expression sont plus bas dans les stades les plus avancés par rapport aux stades de bas grades (Yousef et al., 2002b). De même, dans une autre étude, les échantillons de patients avec une hyperplasie bénigne de la prostate ont montré des niveaux plus élevés des ARNm de la KLK5 comparés à ceux des patients atteints du cancer prostatique. Une autre corrélation négative a été également établie entre l'expression des ARNm de la KLK5 et la concentration sérique de PSA (Korbakis et al., 2009). Enfin, contrairement au transcrit classique de KLK5, le variant d'épissage KLK5-SV1 est, quant à lui, surexprimé dans les lignées cellulaires prostatiques (Kurlender et al., 2004). De plus, il a été rapporté que le traitement des cellules prostatiques par le docétaxel et la mitoxantrone augmente l'expression de la KLK5, ce qui suggère la KLK5 comme biomarqueur de la surveillance du traitement chez les patients atteints du cancer de la prostate (Mavridis et al., 2010).

2.5. Carcinome de la vessie

Dans le carcinome de la vessie, une des tumeurs urogénitales malignes les plus fréquentes, une technique d'hybridation comparative a montré des niveaux d'expression élevés des KLK5, -6, -8 et -9 dans 3 lignées cellulaires de carcinome de la vessie. Une expression des transcrits de la KLK5 a été retrouvée dans 14,3% des tumeurs invasives de la vessie alors qu'elle est inexistante dans les tumeurs superficielles. Ces données ont suggéré l'implication de la KLK5 dans la progression et l'invasion des cellules cancéreuses de la vessie (Shinoda et al., 2007). De plus, une équipe a montré une association entre l'expression élevée des KLK5, 6 et 8 et le taux de mortalité des patients atteints de tumeurs urothéliales de la vessie (Tailor et al., 2018).

2.6. Cancer des testicules

L'expression de la KLK5 est élevée dans les testicules (Debela et al., 2008). Une étude a montré que chez 93% des patients atteints de cancer testiculaire, l'expression de la KLK5 était plus faible dans les zones cancéreuses par rapport aux tissus sains. Cette expression était aussi plus faible dans les tumeurs de stades avancés ou dans les tumeurs invasives, comparée aux tumeurs de stades précoces (Yousef et al., 2002c).

2.7. Autres cancers

La KLK5 a été également identifiée dans le cancer colorectal (CCR) où il a été montré que l'expression des transcrits et les taux de la protéine KLK5 étaient significativement plus élevés dans le tissu tumoral que dans le tissu non tumoral adjacent prélévé chez des patients atteints de CCR. Des niveaux élevés de KLK5 étaient aussi retrouvés dans le sérum des patients atteints de ce cancer comparés à ceux des patients sains. De plus, l'expression de la KLK5 dans le sérum était associée à la présence d'une atteinte des ganglions lymphatiques et de métastases (Wu et al., 2016).

Dans les carcinomes épidermoïdes de la cavité buccale, qui sont des cancers avec un mauvais pronostic, une perte simultanée de l'expression des KLK5 et 7 a été corrélée à un mauvais pronostic avec dans ce cas une survie globale moins bonne (Leusink et al., 2015). De plus, la surexpression de KLK5 dans des cellules de ce cancer épidermoïde induit le clivage de la DSG1, rompant les jonctions cellules-cellules, ce qui désagrège la monocouche cellulaire et favoriserait la formation des métastases (Jiang et al., 2011). De plus, la surexpression de PAR2 dans les cellules de cancer épidermoïde oral a montré une augmentation de l'activité de la KLK5 et une réduction significative des miARN suppresseurs de tumeurs let-7d, miR-23b et miR-200c. L'analyse des tumeurs obtenues chez la souris après injection dans la langue de cellules tumorales, dont l'expression de la KLK5 a été inhibée, a montré une réduction de l'infiltration des cellules inflammatoires, des lésions tumorales réduites et une réduction de l'agressivité tumorale. Les auteurs ont donc suggéré un modèle dans lequel l'activation de PAR2 par la KLK5 régule l'expression des miARN associés à l'inflammation et favorise la progression tumorale (Johnson et al., 2016).

Dans les carcinomes vaginaux induits par le virus HPV (*Human Papillomavirus*) de type 16, l'expression de la KLK5 est considérablement réduite. Dans les souris KLK5 KO, le nombre de tumeurs vaginales induites chimiquement est augmenté par rapport aux souris contrôles. Ainsi, la KLK5 pourrait exercer un rôle anti-tumoral dans la carcinogenèse vaginale (Pampalakis et al., 2018).

2.8. Cancer broncho-pulmonaire

Le cancer du poumon est l'un des cancers le plus mortel dans le monde et la première cause de décès par cancer chez les hommes. Le taux de survie du cancer de poumon à 5 ans est de 19 % et diminue à 5% en présence de métastases. Les cancers du poumon comprennent deux types principaux : le cancer bronchopulmonaire non à petites

cellules (CBPNPC) et le cancer à petites cellules (CBPPC). Récemment, il a été montré que la surexpression de la protéase PRSS33 (*protease serine 33*)/mésotrypsine augmentait l'expression de la KLK5, facteur de mauvais pronostic chez les patients atteints d'un adénocarcinome pulmonaire. L'inhibition de la KLK5 ou de la PRSS3 par des shARN a permis de réduire l'invasion et la prolifération des cellules d'adénocarcinomes pulmonaires. Les auteurs ont suggéré cette nouvelle voie de signalisation impliquant la KLK5 et la PRSS3/mésotrypsine dans l'agressivité des cancers pulmonaires (Ma et al., 2019). La KLK5 a également été impliquée dans la résistance aux thérapies anticancéreuses pulmonaires. En effet, l'expression des ARNm de la KLK5 et de L1CAM était significativement plus élevée dans les cellules cancéreuses pulmonaires résistantes à l'anlotinib, un inhibiteur de plusieurs tyrosines kinases. Les auteurs ont suggéré que l'augmentation de KLK5 et L1CAM était associée à un mauvais pronostic du CBPNPC et permettait de prédire la reponse à cette thérapie. De plus, le ciblage de la KLK5 et L1CAM par des siARN a permis de rendre les cellules à nouveau sensible à l'apoptose induite par l'anlotinib (Lu et al., 2019). La KLK5 (transcrits et protéine) est plus exprimée dans les tissus de cancers épidermoïdes que dans les tissus normaux alors que l'expression de KLK7 est diminuée (Planque et al., 2005). En revanche, en comparant l'expression de 11 KLK dans 50 échantillons de sérum de patients atteints de CBPNPC et de 50 volontaires, seules les KLK5, 8, 10 et 12 étaient diminuées en situation de cancer. De plus, seule l'expression de la KLK5 présentait une corrélation avec le statut fumeur (Planque et al., 2008).

3. Implication de la KLK5 dans les pathologies virales

Plusieurs études ont montré l'implication de la KLK5 dans les infections grippales dûes à des virus hautement infectieux et responsables de 250 à 500 000 décès/an dans le monde. Les virus de type A, appartiennent aux sous-types H1N1 et H3N1 (H=Hémagglutinine ; N=Neuraminidase) et sont responsables des grippes saisonnières. L'hémagglutinine virale (HA) joue un rôle important dans la production des virions ou virus infectieux par clivage du précurseur HA0 par des protéases à sérine (Neumann & Kawaoka, 2015). La KLK5 ainsi que les KLK1 et 12 ont été identifiées pour cliver les protéines HA0 *in vitro* et/ou *in vivo* (Hamilton et al., 2013 ; Leu et al., 2015 ; Magnen et al., 2017 ; Straus & Whittaker, 2017). En plus de leur action directe sur le clivage de HA0, ces KLK peuvent indirectement activer les virus *via* le clivage de HA0 par d'autres protéases. Les KLK5 et 12 activent préférentiellement les virus saisonniers du sous-type

H3. Ces données sont corrélées à une forte expression de la KLK5 dans les aspirations trachéales recueillies chez les patients grippés. Ainsi, les cellules épithéliales des voies respiratoires et des glandes sous-muqueuses produisent la KLK5 qui active les particules virales non infectieuses du H3N2. De plus, l'inhibition de KLK5 par un inhibiteur sélectif, le peptide cyclique SFTI-1 (*SunFlower Trypsin Inhibitor-1*) réduit significativement l'activation de ces particules virales non infectieuse H3N2 (Magnen et al, 2017). L'ensemble de ces données suggère les inhibiteurs naturels ou synthétiques de la KLK5 comme de potentiels candidats médicaments dans le traitement de cette infection virale. Parmi ces inhibiteurs, les inhibiteurs de type künitz, incluant le TFPI-2 (*Tissue Factor Pathway Inhibitor 2*) pourraient aussi présenter un potentiel thérapeutique dans les pathologies où les kallicréines sont impliquées.

D. Inhibiteur de type künitz, « *Tissue Factor Pathway Inhibitor-2* »

Les inhibiteurs de protéases à sérine, de type künitz, kazal et les SERPINES, jouent un rôle essentiel dans la régulation de plusieurs processus biologiques comme la coagulation du sang, la fécondation, l'embryogenèse, etc. La famille des inhibiteurs de type Künitz représente plus de 20 membres, constitués de un ou plusieurs domaines « Künitz ». Parmi ces membres, on distingue l'inhibiteur de la trypsine pancréatique bovine (aprotinine ou BPTI, *Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor*), la bikunine, le TFPI-1 (*Tissue Factor Pathway Inhibitor 1*) et son homologue, le TFPI-2 (Chand et al., 2004). Le TFPI-2, initialement appelé Protéine Placentaire (PP5) a été isolé dans le tissu placentaire trophoblastique (Seppala et al., 1979). Cette glycoprotéine de 30 à 36 kDa a été ensuite appelée TFPI-2, en raison de l'analogie de séquence avec celle du TFPI-1 (Kisiel et al., 1994). Finalement, d'autres études ont montré que le TFPI-2 n'était pas uniquement produit par le placenta, mais aussi par les fibroblastes, les cellules endothéliales et de nombreuses autres cellules. Les transcrits du *TFPI-2* ont été détectés dans différents tissus humains tels que le foie, les muscles squelettiques, les vésicules séminales, le côlon, l'endomètre, le cœur, les reins, le pancréas, le cerveau, le larynx et dans les épithéliums ciliés (Miyagi et al., 1994 ; Sierko et al, 2007). Le TFPI-2 est d'ailleurs détecté en grande quantité au pôle apical des cellules épithéliales bronchiques (Rollin et al., 2005).

I. Structure du gène du TFPI-2

Le gène qui code pour le TFPI-2 humain est situé sur le chromosome 7, dans la région 7q22. Long de 8164 pb, il est composé de 5 exons et 4 introns. Chacun des domaines de type Künitz est codé par un seul exon comme observé pour d'autres inhibiteurs de cette famille.

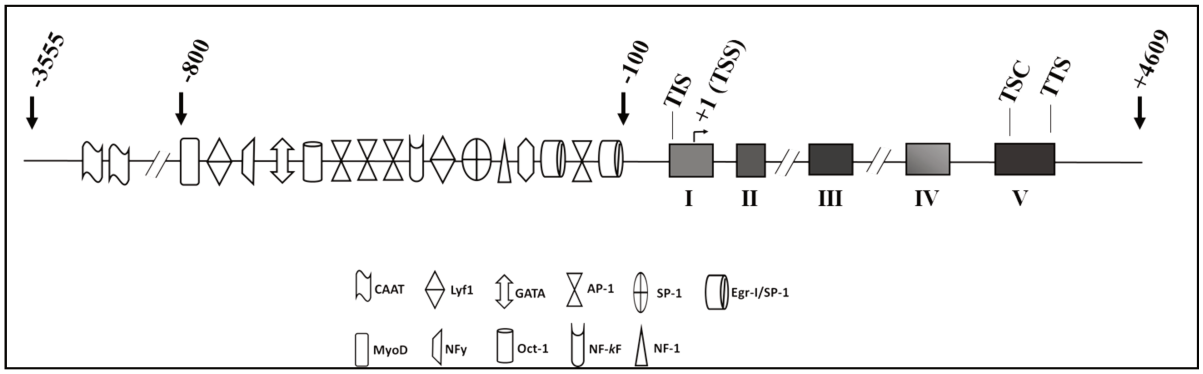


Figure 19 : Structure du gène du TFPI-2. *Dans la région 5'UTR, les sites de liaison des facteurs de transcription (Lyf1, GATA, AP-1, SP-1, Ergr-1/SP-1, MyoD, NFy, Oct-1, NF-kB et NF-1) et la boîte CAAT sont représentés. TIS représente le site d'initiation de transcription et TSS le site de démarrage de la traduction. Les 3 domaines Künitz (KD1-3) sont codés individuellement par les exons II, III et IV. Au niveau 3'UTR, TSC/TSS représente le codon d'arrêt de la traduction. Les chiffres sur le schéma représentent les paires de bases (d'après Chand et al., 2005).*

Dans la partie 5'UTR (-313 et +1), la région promotrice avec le promoteur minimal du *TFPI-2*, situé entre -166 et -111, est critique pour l'activité promotrice et inductible du gène. Cette région englobe 3 sites d'initiation de la transcription et de nombreux sites de fixation des facteurs de transcriptions NF-1 (Nuclear Factor-1), NF-κB, egr-1 (*early growth response gene-1*)/SP-1 (*Specificity Protein 1*) ou encore NF-Y, le Lyf1, GATA, Oct-1, MyoD (Kamei et al., 2001 ; Hubé et al., 2003a). Aucune boite « TATA » n'a été identifiée pour le promoteur du gène *TFPI-2* ; seules deux boites dites « CAAT » ont été observées. C'est pour cette raison que le gène *TFPI-2,* comme les autres gènes sans boîte « TATA » possèdent plusieurs sites de liaison AP-1 ; régulateurs du promoteur en amont du codon « ATG ». Enfin, la région 3'UTR de *TFPI-2* contient deux sites de polyadénylation probables (AATAAA) entre + 4297 et + 4314 et un codon stop (Figure 19) (Kamei et al., 2001).

II. Régulation de l'expression du TFPI-2

1. Régulation du TFPI-2 par la méthylation du promoteur

Le promoteur du gène *TFPI-2* contient une région riche en îlots CpG, d'au moins 220 pb, qui couvre l'exon 1 et les 3 sites d'initiation de la transcription. La teneur en C+G de cette région est de 77% et cette région coïncide avec le promoteur minimal du *TFPI-2* (Hubé et al, 2003b). Dans les cellules normales, les îlots CpG sont protégés de la méthylation. Cependant, l'hyperméthylation dans la région promotrice des gènes suppresseurs de tumeur (GST) est un mécanisme d'inhibition génique bien connu qui contribue à la progression de nombreuses tumeurs (Herman & Baylin, 2003). La transcription du gène *TFPI-2* est régulée par deux mécanismes épigénétiques : la méthylation du promoteur et la méthylation K4 de

l'histone 3 (H3). Ces deux évènements vont altérer la structure de la chromatine et réprimer l'expression du TFPI-2 (Lewis et al., 1992 ; Hubé et al., 2003b). La répression du gène *TFPI-2* par hyperméthylation a été mise en évidence dans les cellules humaines de gliomes, de choriocarcinomes et de nombreux autres cancers, incluant les cancers bronchopulmonaires (Hubé et al., 2003a ; Hubé et al., 2003b ; Rollin et al., 2005 ; Sato et al., 2005).

2. Régulation de l'expression du TFPI-2 par des miARN

Plusieurs études ont suggéré que l'expression de TFPI-2 pouvait être régulée négativement ou positivement par les miARN. Il a été montré *in vitro* que les miR-23a, miR-616 et miR-130a ciblent le TFPI-2 pour inhiber son expression (Ma et al., 2011 ; Gao et al., 2017). Une autre étude, réalisée à partir des Fibroblastes Associés au Cancer (CAF, *Cancer Associated Fibroblast*) du col de l'utérus, a montré que le *TFPI-2* était l'un des gènes les plus réprimés dans ces cellules comparées aux fibroblastes normaux. Le promoteur du gène *TFPI-2* n'étant hyperméthylé que dans les cellules tumorales et pas dans les CAF, les auteurs ont démontré que la répression de l'expression du *TFPI-2* dans ces cellules était uniquement due à l'expression du miR-23a (Fullar et al., 2020). En situation de pré-éclampsie, l'expression protéique de TFPI-2 était élevée et les transcrits de miR-616-3p diminués dans les tissus placentaires. Le miR-616-3p se liait à la région 3'UTR de l'ARNm du TFPI-2, diminuant l'expression de ce dernier (Xu et al., 2018).

Un mécanisme de régulation positive du TFPI-2 par les miARN a également été mis en évidence. Par exemple, la transfection du miR-494 dans les cellules cancéreuses du sein (MCF-7) augmente l'expression des ARNm et de la protéine TFPI-2. Alors qu'aucun site spécifique de liaison du miR-494 n'a été trouvé dans la région 3'UTR de *TFPI-2*, cette augmentation de l'expression de *TFPI-2* se ferait par un mécanisme indirect. En effet, le miR-494 cible les facteurs de transcription AHR (*Aryl Hydrocarbon Receptor*) et ELF-1 (*E74 Like ETS Transcription Factor 1*) (Andresen et al., 2020). De plus, sur les cellules de glioblastomes, les auteurs d'une autre étude ont démontré qu'une surexpression stable du lncRNA AC003092.1 (*long non-codind RNA*) augmente l'expression des transcrits du TFPI-2, par l'intermédiaire du miR-195 (Xu et al., 2018).

3. Régulation du TFPI-2 par les médiateurs de l'inflammation

L'expression du TFPI-2 peut être régulée par le médiateur de l'inflammation qu'est le TNFα, des agents d'origine infectieuse comme le LPS et la toxine cholérique ou

encore des esters de phorbol tels que le *12-myristate 13-acetate* (PMA) et le *12-O-tétradécanoylphorbol* (Bützow et al., 1988 ; Iino et al, 1998 ; Horrevoets et al., 1999 ; Konduri et al, 2003. Dans les cellules endothéliales, les ARNm et la protéine TFPI-2 sont d'ailleurs significativement augmentés par le VEGF, le FGF-2, l'IL-1β et le TNFα (Xu et al., 2006). L'ajout de ces médiateurs inflammatoires ou des interférons (IFN)-α et –γ, a augmenté l'activité du promoteur du gène *TFPI-2* et l'expression de sa protéine. Les mutations sur les sites de fixation des facteurs de transcription AP-1 et SP1 ont empêché les effets de ces stimulations, suggérant la fixation de IFN-α et IFN-γ sur ces sites au niveau du promoteur du *TFPI-2* (Konduri et al., 2003). Enfin, le TFPI-2 a également été montré pour être le gène cible direct de IL-6 dans les cellules hépatiques, après activation de la voie ERK (Khouri et al., 2011). D'autres voies de signalisation sont également impliquées dans l'expression du TFPI-2 comme cela avait été suggéré par les premières études menées sur cet inhibiteur dans les cellules stromales de l'endomètre. Dans ce contexte, la prostaglandine E2 (PGE2) augmentait l'expression de TFPI-2 *via* la libération de l'AMP cyclique après activation de la voie PKC (*Protein Kinase C*) (Bützow et al., 1988). D'autres auteurs ont également confirmé cette hypothèse en montrant que l'expression du TFPI-2 était augmentée dans les monocytes de patients atteints d'hyperlipidémie. L'hypothèse émise était que la thrombine pouvait induire cette expression associée à l'activation des voies de signalisation JNK, NF-κB, MAPKinases dont MKK7, ou de la voie de l'EGFR (Shinoda et al., 1999 ; Neaud et al., 2000 ; Chand et al., 2005; Pou et al., 2011).

III. Structure protéique et localisation du TFPI-2

Le TFPI-2 est constitué d'un peptide signal de 22 acides aminés et d'une séquence de 213 acides aminés pour la protéine mature. L'analyse de la séquence du TFPI-2 mature a montré une courte région amino-terminale, trois domaines de type « Künitz » (*Kunitz Domain* : KD; KD1, KD2, KD3) en tandem et une queue carboxy-terminale très riche en acides aminés basiques. Cette extrémité C-terminale permet les interactions ioniques entre le TFPI-2 et les glycosaminoglycanes des membranes plasmiques ou de la MEC (Liu et al., 1999). La séquence du TFPI-2 mature possède 18 cystéines formant 3 ponts disulfures par KD et 2 sites de N-glycosylation (Asn-116 et Asn-170), localisés respectivement au niveau des KD2 et 3 (Figure 20) (Sprecher et al., 1994). Le TFPI-2 migre sur un gel de SDS-PAGE sous trois formes différemment glycolysées, représentées par 3 bandes de 33 kDa, de 31 kDa et de 27 kDa et également appelées TFPI-2-α, TFPI-2-β et TFPI-2-γ (Rao et al., 1995 ; Rao et al., 1996 ; Iino et al., 1998).

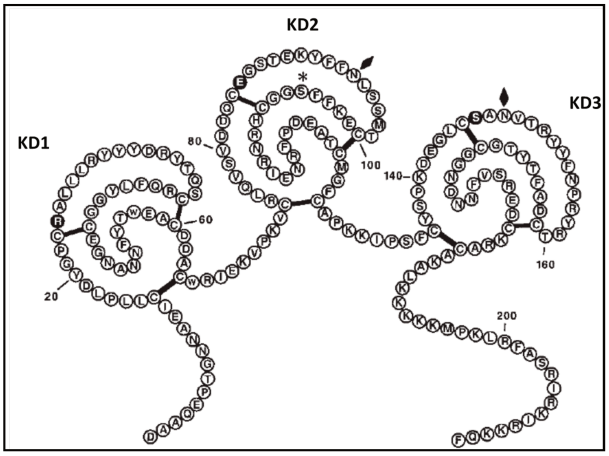


Figure 20 : structure protéique du TFPI-2. *Les résidus P1 des domaines de künitz (KD pour Kunitz Domain) 1, 2 et 3 sont représentés sous forme de cercle plein (Arginine pour KD1, Glutamine pour KD2 et sérine pour KD3). Les liaisons disulfures sont en lignes pleines et les sites de N-glycosylation en losange sur les KD2 et 3. L'astérisque est marqué sur le seul site de phosphorylation du domaine KD2 (Chand et al., 2005).*

Le domaine KD1, avec son arginine dans le site de réaction en P1, a été initialement décrit pour porter l'activité inhibitrice du TFPI-2. D'autres résidus en position P1 et P5' ont également été montrés pour avoir une influence sur l'activité et la spécificité de TFPI-2 (Petersen et al., 1996 ; Chand et al., 2004). Le TFPI-2 est essentiellement synthétisé par différentes cellules endothéliales, de la veine ombilicale, de l'aorte, de la veine saphène et du derme. Ce sont les cellules microvasculaires dermiques qui sécrètent le plus de TFPI-2 (4 à 7x plus). Il a été montré que 60 à 90% de TFPI-2 synthétisé est principalement déposé dans la MEC, ce qui a suggéré son rôle dans le maintien de l'intégrité de la MEC (Iino et al., 1998). De plus, le TFPI-2 est retrouvé dans le plasma, le liquide folliculaire pré-ovulatoire et dans le mucus de l'utérus. Dans le plasma humain des hommes et des femmes non enceintes, la concentration de TFPI-2 est très faible, de l'ordre de 0,43 à 0,49 ng/mL (Bützow et al., 1988). Chez la femme enceinte le taux sanguin de TFPI-2 augmente à partir de la 7ème semaine pour atteindre un taux maximum de 54 ng/mL vers la 36ème semaine de grossesse (Nisbet et al., 1981).

IV. Activité inhibitrice du TFPI-2

Initialement, l'activité inhibitrice du TFPI-2 a été montrée vis-à-vis de la trypsine et du complexe FT-VIIa (Kisiel et al., 1994) avec une activité inhibitrice similaire pour les trois formes de TFPI-2. L'équipe de Petersen a ensuite déterminé, pour de nombreuses protéases, les capacités inhibitrices du TFPI-2. Ainsi, il était capable d'inhiber fortement les activités du facteur XIa (avec un Ki de 15 nM), de la kallicréine plasmatique (Ki de 25 nM) et

de la plasmine (Ki de 3 nM). En revanche, une faible inhibition de l'activité protéolytique des complexes FT-VIIa, du facteur IXa/Polylysine et de la cathepsine G par le TFPI-2 a été mesurée. L'ajout de l'héparine était capable d'augmenter son activité inhibitrice. Aucune inhibition n'a été retrouvée lorsque le TFPI-2 était incubé avec le plasminogène, l'uPA, la thrombine humaine, la protéine C réactive ou l'élastase des PNN (Petersen et al., 1996). Le domaine KD1 du TFPI-2, à lui seul, était capable d'inhiber l'activité de la trypsine (Ki de 10 nM) et de la plasmine (Ki de 7 nM), suggérant une interaction directe avec le site catalytique de ces deux enzymes (Kong et al., 2004). Il a été également rapporté que le TFPI-2 pouvait efficacement inhiber l'activité des MMP, qui sont également impliquées dans la dégradation de la MEC. Le TFPI-2 était cependant incapable de former des complexes avec les MMP-1, -2, -9, suggérant une action indirecte de l'inhibiteur (Du et al., 2003). Cette inhibition indirecte des MMP s'effectue en effet par l'inhibition de la plasmine, elle-même activatrice des MMP-1 et -3 (Kong et al., 2004). Ce mécanisme d'inhibition de la plasmine par le TFPI-2 peut aussi limiter la production de MMP-2 active dans les cellules HT-1080 (Figure 21) (Rao et al., 1999 ; Izumi et al., 2000).

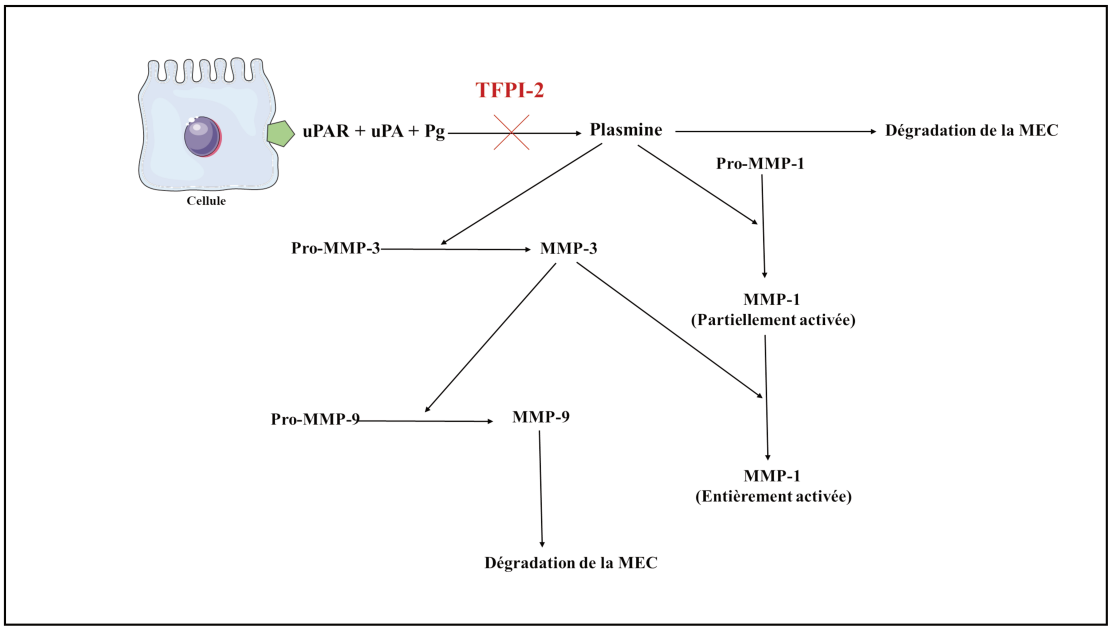


Figure 21 : Représentation de l'action du TFPI-2 sur la cascade d'activation des MMP. *Le TFPI-2 inhibe l'activation des pro-MMP-1 et -3 en MMP-1 et -3 par la plasmine. Cette inhibition empêche l'activation de la MMP-9 par la MMP-3. uPA = urokinase, uPAR= Récepteur de l'Urokinase et Pg = plasminogène (d'après Rao et al., 1999).*

D'autres équipes, comme celle d'Herman, ont en revanche décrit une inhibition directe du TFPI-2 vis-à-vis de certaines MMP, comme celles des MMP-1 et -13. Il limitait également la dégradation de la triple hélice du collagène par des MMP-2 et -9 lorsque les

deux protéines étaient incubées ensemble (Herman et al., 2001). De plus, une augmentation de l'expression des MMP-1 et -3 a été observée dans la lignée NCI-H460, issue d'un CBPNPC, dans laquelle l'expression du TFPI-2 avait été inhibée par ARN interférence (Iochmann et al., 2009 ; Gaud et al., 2011). Enfin, nous avons récemment montré au sein de l'équipe que le TFPI-2 peut efficacement inhiber l'activité protéolytique des KLK12 et 5, alors qu'aucune inhibition n'a été observée pour les KLK1, 7, 8 et 14. Les études *in silico* ont démontré que le domaine KD1 du TFPI-2 pourrait interagir avec la triade catalytique de la KLK12. Cette inhibition de la KLK12 par le TFPI-2 permettait de réduire la cascade d'activation des MMP-1 et -9 et le clivage de la protéine matricielle CCN1 médiée par la KLK12 (Lavergne et al, soumis). Un autre mécanisme de régulation de la MMP-2 par le TFPI-2 a été suggéré dans une lignée du cancer du sein où la translocation du TFPI-2 dans le noyau et sa fixation sur les facteurs de transcription AP-2α, empêche la fixation de ces facteurs sur le promoteur du gène *MMP-2,* réduisant ainsi sa transcription (Wang et al., 2017).

V. Implication du TFPI-2 dans les processus physiopathologiques

1. Rôle du TFPI-2 dans la coagulation

Le TFPI-2 présentant des analogies de séquence avec le TFPI-1 intravasculaire, sa capacité à inhiber les protéases de la cascade de coagulation a été étudiée. Les activités amidolytiques et protéolytiques du complexe FT-VIIa et du facteur XIa ont également été inhibées par le TFPI-2 mais dans une moindre mesure qu'avec le TFPI-1 (Petersen et al., 1996). Chez les sujets normaux et chez la femme enceinte, il a été suggéré que le TFPI-2, fortement exprimé dans les plaquettes, se lie au Facteur V/Facteur Va pour réguler la coagulation et la fibrinolyse (Vadivel et al., 2014). Des peptides de type KD1, dérivés du TFPI-2, pourraient inhiber l'effet pro-coagulant de l'héparanase, qui induit l'activité du facteur tissulaire et le relargage du TFPI-1 (Crispel et al., 2017).

2. Rôle du TFPI-2 dans les cancers

L'inhibition du *TFPI-2* est souvent associée à un mauvais pronostic dans de nombreux cancers. Dans les cellules de gliomes, les niveaux des ARNm et de la protéine TFPI-2 étaient fortement exprimés dans les tissus cérébraux normaux tandis que le TFPI-2 était indétectable dans les gliomes de haut-grade (Konduri et al., 2001a). L'absence de détection du TFPI-2 dans les cancers canalaires pancréatiques était par ailleurs associée à l'hyperméthylation aberrante de son promoteur (Sato et al., 2005). Wong et ses collaborateurs

ont montré que les ARNm du *TFPI-2* étaient 7 fois moins exprimés dans 90% des tissus humains d'hepatocarcinome (HCC), comparés aux tissus sains (Wong et al., 2007). Notre équipe s'est particulièrement intéressée au rôle du TFPI-2 dans le cancer bronchopulmonaire et a montré que dans les prélèvements réalisés au cœur de la tumeur, 37% des patients avec un CBPNPC présentaient une expression des ARNm du TFPI-2 4 à 120 fois plus faible que dans le tissu pulmonaire adjacent non cancéreux. Une hyperméthylation du promoteur du *TFPI-2* était associée à cette faible expression et ceci a été observé à la fois dans les prélèvements de tissus cancéreux mais aussi dans des lignées de cellules tumorales (Rollin et al., 2005, 2007).

2.1. Rôle de TFPI-2 dans le remodelage de la MEC

Le fait que le TFPI-2 soit synthétisé et déposé essentiellement dans la MEC a suggéré son importance dans l'inhibition du remodelage induit par différentes protéases, initialement la plasmine. Ainsi, le TFPI-2 permet d'empêcher la dégradation de la MEC par inhibition de la plasmine et de MMP (*Matrix MetalloProteinase)* (Rao et al., 1998). En inhibant ces deux protéases, le TFPI-2 régule le remodelage de la MEC (Herman et al., 2001 ; Kong et al., 2004). De plus, du TFPI-2 recombinant humain est capable de se lier directement aux cellules endothéliales microvasculaires et à leur MEC, de manière spécifique, dose dépendante et saturable (Rao et al., 1999). Le TFPI-2 interagit plus spécifiquement avec les protéoglycanes, les sulfates d'héparane ou les sulfates de chondroïtine matriciels. De plus, la capture du TFPI-2 dans la MEC par un anticorps IgG anti-TFPI-2, reproduit le détachement des cellules endothéliales induit par la plasmine ou l'urokinase. Ces résultats ont suggéré que le TFPI-2 pourrait jouer un rôle dans le maintien de l'intégrité des monocouches de cellules endothéliales (Iino et al, 1998 ; Rao et al, 1999 ; Herman et al, 2001). La fixation du TFPI-2 à la MEC et aux membranes plasmiques des cellules immunitaires a été confirmé sur les monocytes, les macrophages et les lymphocytes T (Crawley et al., 2002). Le TFPI-2 est aussi capable d'inhiber l'héparanase, qui clive les sulfates d'héparane présents à la surface des cellules et ceux de la MEC, favorisant alors la progression tumorale et la dissémination des cellules cancéreuses (Nadir & Brenner, 2016).

2.2. Rôle du TFPI-2 dans invasion cellulaire et l'agressivité tumorale

Le potentiel invasif des cellules cancéreuses dépend de leur potentiel protéolytique, qui leur permet de dégrader la MEC et la membrane basale (Caroll & Binder,

1999). Le fait que le TFPI-2 protège la MEC de la dégradation médiée par la plasmine et d'autres protéases, pourrait justifier son rôle dans la régulation de l'invasion et de la formation des métastases qui témoignent du caractère agressif d'une tumeur.

De nombreux travaux ont montré, sur plusieurs lignées cellulaires cancéreuses, que le TFPI-2 pouvait limiter leur potentiel invasif. Ainsi, la surexpression du TFPI-2 dans les cellules HT-1080 a inhibé la dégradation de la MEC et l'invasion *via* une diminution de la sécrétion de la MMP-2 (Rao et al., 1998). De plus, le traitement des cellules invasives NIH3T3-v-K-ras avec du milieu conditionné de cellules HT-1080, surexprimant le TFPI-2, a permis d'augmenter l'adhérence des cellules au support de culture. Ces résultats ont fortement montré l'implication du TFPI-2 dans le maintien de l'intégrité de la MEC et du tapis cellulaire (Izumi et al., 2000). L'équipe de Jin a par ailleurs montré que la réexpression de TFPI-2 dans les cellules de choriocarcinome améliorait l'adhérence des cellules et inhibait leur potentiel invasif à travers un insert recouvert de Matrigel™ (Jin et al., 2001). Dans les cellules de gliome, le traitement des cellules avec le TFPI-2 recombinant a considérablement réduit de manière dose-dépendante, l'invasion de ces cellules (Konduri et al., 2001a). Dans des cellules issues de cancers pancréatiques, la restauration de l'expression du TFPI-2 permet d'inhiber la prolifération, la migration et l'invasion (Sato et al., 2005 ; Wong et al., 2007). Ces effets du TFPI-2 ont également été montrés dans de nombreuses autres cellules cancéreuses comme les cellules de fibrosarcome HT-1080 (Rao et al., 1998), les cellules cancéreuses prostatiques LNCaP (Konduri et al., 2001b) et les cellules de mélanome C-32 (Konduri et al., 2000).

Dans les cancers bronchopulmonaires, plusieurs investigations ont été menées pour étudier le rôle de TFPI-2. Dans les cellules A549, qui produisent beaucoup de TFPI-2 à l'état basal, l'inhibition de son expression a significativement augmenté leur potentiel invasif (Lakka et al., 2000). Notre équipe a montré que dans les cellules cancéreuses NCI-H460, l'inhibition transitoire ou stable du TFPI-2 (siARN ou miARN) a augmenté la migration, l'invasion et l'agressivité des cellules *in vivo* chez des souris *nude*. Ces effets étaient associés à l'augmentation de l'adhérence des cellules au collagène IV et à la laminine *via* l'intégrine α1 et à la régulation des MMP-1 et -3 (Gaud et al., 2011 ; Iochmann et al, 2009). Une autre étude a montré que la surexpression du TFPI-2 dans les cellules cancéreuses pulmonaires NCI-H209, issues d'un CBPPC particulièrement agressif, réduisait *in vivo* la croissance tumorale. Le TFPI-2 régule en effet négativement l'expression des MMP-1 et -3, l'expression des intégrines et la voie de signalisation des MAPKinases (Lavergne et al.,

2013). Toutes ces études démontrent clairement un rôle suppresseur de tumeurs du TFPI-2 dans de nombreux cancers.

2.3. Rôle du TFPI-2 dans l'apoptose

Le rôle d'inhibiteur de l'invasion tumorale du TFPI-2 peut également s'expliquer par l'induction de l'apoptose. La surexpression du TFPI-2 dans les cellules SNB-19, isolées d'un gliome et U-251, issues d'un glioblastome, a d'ailleurs induit une forte augmentation de l'apoptose, associée à une expression importante des protéines pro-apoptotiques BAX, des caspases, du cytochrome C, d'Apaf-1 et de PARP ainsi qu'une diminution de la protéine anti-apoptotique BCL-2 (Tasiou et al., 2001 ; George et al., 2007). Cette induction de l'apoptose par le TFPI-2 a également été retrouvée dans les cellules cancéreuses bronchiques. Chez des souris *nude*, la croissance des tumeurs, constituées à partir de cellules tumorales pulmonaires NCI-H209 surexprimant le TFPI-2 et implantées en orthotopique, était considérablement réduite par rapport à celle développée avec les cellules sauvages. Cette inhibition de la croissance tumorale s'expliquait par une augmentation de l'apoptose de ces cellules (Lavergne et al., 2013).

2.4. Rôle du TFPI-2 dans la prolifération

Dans les cellules musculaires lisses aortiques bovines, le TFPI-2 a été identifié comme un facteur mitogène responsable de leur prolifération. En effet, le TFPI-2 recombinant a stimulé la synthèse de l'ADN *via* l'activation de la voie de signalisation des MAPKinases et l'activité du promoteur *c-fos*. Cette prolifération des cellules musculaires suggère que le TFPI-2 pourrait être impliqué dans l'athérogenèse (Shinoda et al., 1999). A l'opposé, une étude récente a montré un rôle plutôt anti-mitogène du TFPI-2 en situation de cancer. En effet, la surexpression du TFPI-2 dans des cellules cancéreuses mammaires inhibait la prolifération et la migration *via* l'inhibition de la phosphorylation de ERK1/2 (Wang et al, 2018c). Dans les cellules trophoblastiques, la surexpression de TFPI-2 inhibe la prolifération cellulaire (Zheng et al., 2020) et c'est aussi le cas avec les cellules endothéliales (Xu et al, 2006) et les cellules musculaires lisses vasculaires (Ekstrand et al., 2010).

2.5. Rôle du TFPI-2 dans la régulation de la vascularisation de la tumeur

L'angiogenèse est un processus de formation des nouveaux vaisseaux qui participe à l'agressivité des tumeurs. Ainsi, la surexpression de TFPI-2 dans les cellules endothéliales réduit significativement la migration cellulaire, la formation de sphéroïdes et de nouveaux vaisseaux dans des systèmes de co-culture de cellules cancéreuses et de cellules

endothéliales dans du Matrigel™ (Yanamandra et al., 2005 ; Ivanciu et al., 2007). Dans les cancers, l'expression du TFPI-2 est corrélée négativement avec l'expression du VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), inducteur majeur de l'angiogenèse (Zhai et al., 2015). De plus, le VEGF augmente l'expression de TFPI-2 dans les cellules endothéliales. En retour, le TFPI-2 inhibe la prolifération des cellules endothéliales, empêchant ainsi la formation de nouveaux vaisseaux. Ce mécanisme est décrit comme une boucle de régulation négative de l'angiogenèse (Xu et al., 2006). Il a également été suggéré que le TFPI-2 participerait à la plasticité cellulaire associée au mimétisme vasculaire, un phénomène de vascularisation par réarrangement cellulaire utilisé par les cellules cancéreuses pour vasculariser la tumeur, et qui est indépendant de l'angiogenèse (Ruf et al., 2003).

VI. Implication de TFPI-2 dans les pathologies inflammatoires

Un rôle du TFPI-2 a aussi été suggéré dans la régulation des protéases péricellulaires impliquées dans l'inflammation. En effet, le TFPI-2 a été retrouvé associé au kininogène de haut poids moléculaire et à la protéine gC1qR/p33 (gC1qR) dans l'athérosclérose. Cette protéine gC1qR est une protéine multimodale exprimée de manière ubiquitaire et impliquée dans la modulation du système du complément, de la coagulation et du système des kinines. Ainsi, il a été montré que le TFPI-2 interagirait de manière directe et saturable avec la protéine gC1qR, avec un Kd de 70 nM et cette interaction dépendrait fortement du domaine KD2 du TFPI-2 (Peerschke et al., 2004). Une autre équipe a également associé l'activité anticoagulante du TFPI-2 avec l'inhibition de l'inflammation (Crispel et al., 2017). Une étude réalisée sur les souris a démontré que le TFPI-2 murin, qui présente 50% d'analogie avec le TFPI-2 humain, est induit dans les cellules hépatiques murines lors de l'inflammation médiée par le LPS (Hisaka et al., 2004).

Contexte du travail

L'épithélium bronchique joue un rôle crucial dans le développement de plusieurs pathologies inflammatoires dont l'asthme ou la BPCO. En situation physiologique, l'épithélium forme une barrière physique imperméable contre les agressions extérieures (particules de l'air ambiant, fumée de cigarette, pathogènes, etc.) grâce, notamment aux jonctions intercellulaires (serrées ou adhérentes) qui lient les cellules épithéliales entre elles. Au cours de ces agressions, l'épithélium pulmonaire est endommagé et une perte des jonctions épithéliales est observée, en partie en lien avec une altération de la E-cadhérine et la β-caténine (De Boer et al., 2008 ; Trautmann et al., 2005). Dans le cas d'un poumon sain, la régénération ou la réparation complète de l'épithélium bronchique nécessite une migration des cellules épithéliales, devenues partiellement et transitoirement mésenchymateuses (dé-différenciation), au niveau des sites de lésion. Une phase de prolifération de ces cellules aboutit ensuite à la fermeture de la lésion puis une étape de re-différenciation des cellules épithélio-mésenchymateuses en cellules épithéliales permet de reconstituer les jonctions cellulaires et un épithélium pseudostratifié. Cependant, dans des conditions pathologiques, l'épithélium bronchique a souvent déjà été endommagé lors de précédentes agressions et des anomalies structurelles et un remodelage épithélial sont alors présents à cause d'une mauvaise réparation. Les mécanismes essentiellement impliqués dans ces anomalies structurelles sont la présence accrue de médiateurs de l'inflammation, du stress oxydant et d'un déséquilibre de la balance des protéases et des anti-protéases, en faveur des protéases. Parmi celles-ci, la famille des kallicréines, et plus particulièrement la kallicréine 5 (KLK5), pourrait être impliquée à la fois dans la phase de dégradation et de remodelage de l'épithélium bronchique mais aussi dans l'étape de réparation de cet épithélium. Une meilleure compréhension du rôle de la KLK5 dans ces processus physiologiques permettrait de mieux appréhender l'implication de cette protéase en situation pathologique.

Partie II :
Caractérisation des modèles cellulaires pour l'étude des effets de la KLK5 sur l'épithélium bronchique.

1. Introduction

Pour étudier les mécanismes de réparation ou de régénération de l'épithélium bronchique de manière pertinente, il est essentiel de disposer de modèles cellulaires qui soient le plus proche possible de la réalité physiologique. A l'heure actuelle, l'utilisation de lignées cellulaires épithéliales bronchiques sont des modèles indispensables pour étudier les anomalies structurelles observées dans les pathologies comme la BPCO. Ainsi, les lignées cellulaires disponibles actuellement (BEAS-2B et 16HBE14o-), sont souvent utilisées pour répondre à des questions scientifiques bien spécifiques (Heijink et al, 2010). C'est pour cette raison que nous avons caractérisé ces deux lignées cellulaires afin de pouvoir étudier les effets de la protéase KLK5 sur différentes fonctions de ces cellules bronchiques.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel

2.1.1. Cellules étudiées

- **Lignée cellulaire BEAS-2B**

Les cellules BEAS-2B sont des cellules dérivées d'un épithélium bronchique sain, obtenu lors de l'autopsie d'un individu non cancéreux. Ces cellules ont été immortalisées avec l'antigène T/SV40 de l'adénovirus de type 12. Elles nécessitent une culture en dessous de la confluence afin d'empêcher leur différenciation en cellules squameuses. Cette lignée a été décrite pour étudier les mécanismes impliqués dans la physiopathologie des voies respiratoires (Reddel et al., 1989).

- **Lignée cellulaire 16HBE14o-**

Les cellules 16HBE14o- sont des cellules épithéliales bronchiques humaines, isolées à partir du prélèvement cœur-poumon d'un enfant âgé de 1 an. Ces cellules ont été ensuite immortalisées avec un plasmide SV40 muté à l'origine de réplication (pSVori-). Cette lignée présente des caractéristiques de cellules épithéliales bronchiques différenciées avec une morphologie en pavé, la présence de jonctions serrées et de transporteurs d'ions. Il a été décrit que la différenciation de ces cellules en Interface Air-Liquide (ALI) permettait la formation des cils (Cozens et al., 1994).

2.1.2. Protéines recombinantes et substrats fluorogéniques

La kallicréine recombinante (rhKLK5) et le TFPI-2 recombinant (rhTFPI-2), commercialisés par R&D systems (Lille, France) ont été produits dans la lignée de cellules murines de myélome NS0 avec une étiquette de 10 histidines du côté de l'extrémité C-terminale. La plasmine a été obtenue chez American Diagnostica Inc (Neuville sur Oise, France). L'activité de la rhKLK5 et son inhibition par le TFPI-2 ont été vérifiées pour chaque nouveau lot de la KLK5 utilisé, à l'aide du substrat fluorogénique Boc-V-P-R-AMC ES011 (R&D systems) à pH 8. L'activité enzymatique de la plasmine et son inhibition par le TFPI-2 ont été mesurées à l'aide du substrat fluorogénique Boc-A-L-K-AMC (I-1040) commercialisé chez Bachem AG (Weil am Rhein, Allemagne).

2.2. Méthodes

2.2.1. Tests immunoenzymatiques sandwich sur membrane de nitrocellulose

Le criblage de 35 protéases et 32 inhibiteurs de protéases a été réalisé dans les lysats cellulaires totaux, à l'aide de deux membranes de nitrocellulose sur lesquelles sont fixés, en duplicat, des anticorps de capture spécifiques (*Proteome Profiler™ Array, Human Protease/Protease Inhibitor Array Kit, R&D Systems*). Ainsi, les membranes recouvertes d'anticorps de capture sont réhydratées et saturées pendant 1 heure avec le tampon « *buffer 6* ». Chaque membrane criblant les protéases ou les inhibiteurs de protéases est incubée avec 200 µg de protéines de lysat cellulaire qui ont été préalablement mélangées pendant 1 heure à température ambiante avec les cocktails d'anticorps de détection biotinylés dans le tampon de saturation « *buffer 6* ». Ce mélange permet de réaliser un sandwich avec les anticorps fixés sur les membranes. Les préparations ont été ensuite incubées à 4°C pendant 24 heures sous agitation.

Le criblage de 46 protéines kinases phosphorylées a également été effectué par la même technique (*Proteome Profiler™ Array, Human Phospho-kinase Array Kit*). Les membranes contenant les anticorps de capture ont été réhydratées et saturées pendant 1 heure avec le tampon « *Array buffer 1* » avant d'incuber les lysats cellulaires à 4° C pendant 24 heures sous agitation. Après 3 lavages de 10 minutes, les membranes sont incubées pendant 2 heures à température ambiante avec le cocktail d'anticorps de détection biotinylés en tampon "array buffer 2/3" approprié à chaque membrane.

La suite de la technique était similaire pour le criblage des phospho-kinase et des protéases/inhibiteurs de protéases. Ainsi, après 3 lavages, la streptavidine-HRP 1X a été

incubée pendant 30 minutes à température ambiante, sous agitation pour chacune des membranes puis les membranes ont été à nouveau lavées 3 fois. Les protéines ont été révélées par luminescence après avoir incubé le mélange 1 :1 des révélateurs « *Chemireagent 1 et 2* » contenant respectivement le peroxyde d'hydrogène et le luminol. L'expression relative des protéines a été déterminée en fonction de la condition contrôle après quantification, à l'aide du logiciel image J, de l'intensité des spots obtenus à partir des dépôts réalisés en double et le seuil a été fixé à 1,8x.

2.2.2. Expression génique et protéique

Les expressions géniques ont été évaluées par RT-PCR en temps réel. Les expressions protéiques ont été déterminées par immunoempreinte et immunofluorescence. La proportion de la KLK5 dans le surnageant, le culot cellulaire et dans la MEC a été déterminé par ELISA. Les études morphologiques et ultrastructurales ont été réalisées par microscopie électronique à balayage et à transmission. Toutes ces méthodes ont été détaillées dans la partie III (article) de la thèse.

2.2.3. Mesure de l'activité enzymatique de la KLK5 et de son inhibition par le TFPI-2

Les mesures de l'activité de la KLK5 et de la plasmine ont été réalisées dans des plaques 384 puits (VWR, Fontenay-sous-Bois, France) dans un volume final de 30 µL, à l'aide d'un spectrofluorimètre *Spectramax Gemini EM* (Molecular Devices, Ouessant, France) durant 20 minutes avec des acquisitions toutes les 30 secondes. Les réactions enzymatiques sont réalisées à 37°C en tampon d'activité NaH_2PO4 0,1 M, pH 8,0 pour la KLK5 et en tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 pour la plasmine.

Les tests d'inhibition de la KLK5 et de la plasmine par le TFPI-2 sont réalisés après incubation pendant 20 minutes de l'enzyme (50 nM) avec l'inhibiteur (100 nM) à température ambiante. Après cette incubation, les substrats de la plasmine (Boc-A-L-K-AMC) ou de la KLK5 (Boc-V-P-R-AMC) sont ajoutés et la mesure de la fluorescence est effectuée à des longueurs d'onde d'excitation de 355 nm et d'émission de 460 nm.

3. Résultats

3.1. Expression de la KLK5 dans les cellules BEAS-2B et 16HBE14o-

Pour étudier l'implication de la KLK5 dans les mécanismes de remodelage de l'épithélium bronchique, et sa régulation par le TFPI-2, il est indispensable de connaître les niveaux d'expression basale de ces deux protéines dans nos modèles cellulaires, BEAS-2B et 16HBE14o- sauvages.

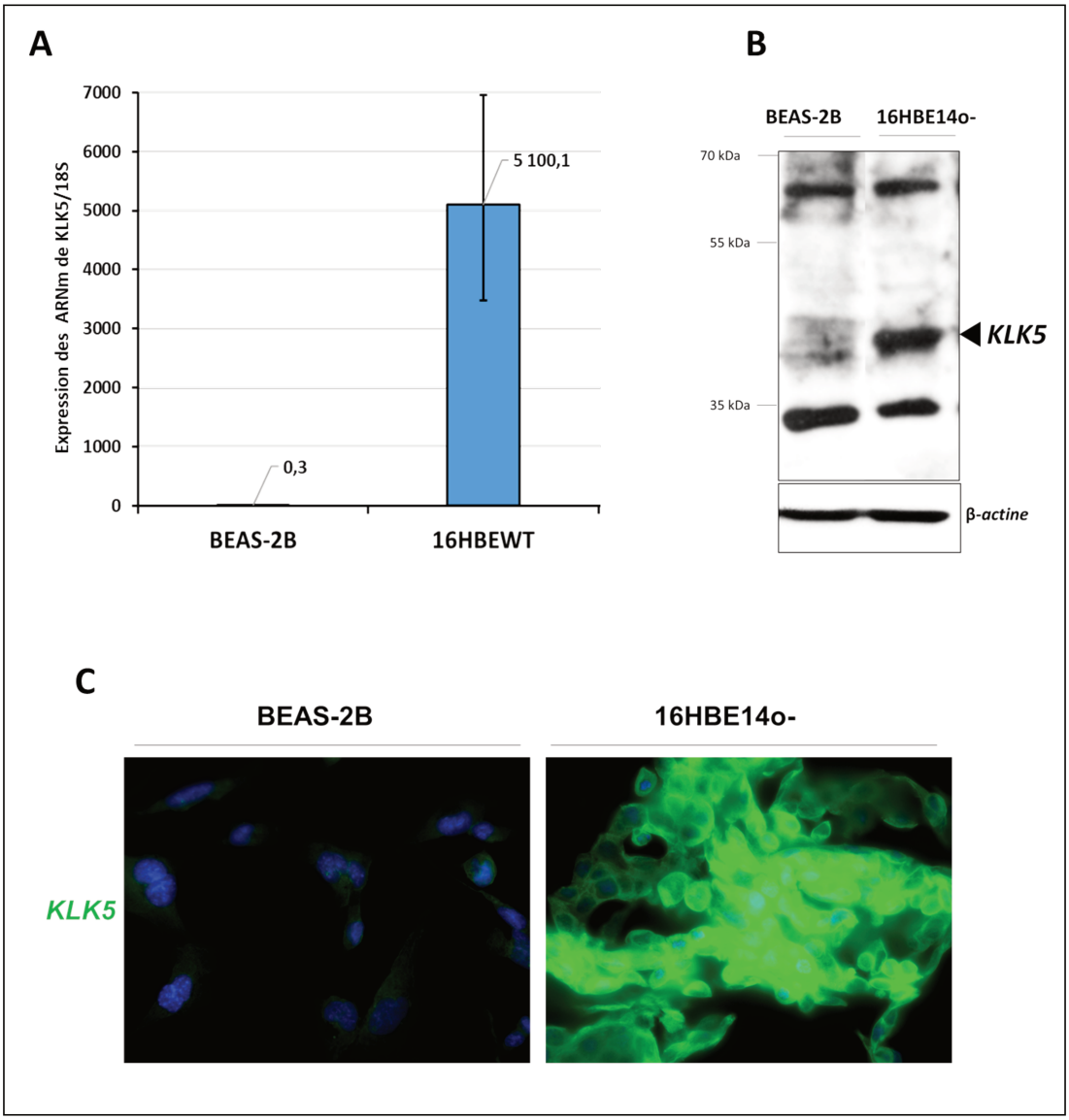


Figure 22 : Expression de la KLK5 dans les cellules BEAS-2B et 16HBE14o- WT *A) Quantification relative des ARNm de la KLK5. Les résultats représentent la médiane ± Q1/Q3 de 7 expériences indépendantes. B) Expression protéique de la KLK5 par technique d'immunoempreinte. C) Expression protéique de la KLK5 par immunofluorescence. La barre d'échelle est de 20 µm et les résultats sont représentatifs de 4 expérimentations.*

Les résultats de la RT-qPCR représentés dans la figure 22A montrent que les cellules BEAS-2B expriment faiblement les transcrits de la *KLK5* endogène (0,3x par rapport au

calibrateur composé d'un mélange d'ADNc de différentes lignées cellulaires et en utilisant les transcrits *18S* comme gène de ménage) comparées aux cellules 16HBE14o- qui l'expriment très fortement (environ 5100x) (Figure 22A). Nous avons également étudié l'expression de la protéase dans ces deux lignées cellulaires. Nos résultats en immunoempreinte (Figure 22B) ont montré la présence d'une bande de 40 kDa correspondant à la protéase mature. Ainsi, la KLK5 est fortement exprimée dans les cellules 16HBE14o- alors qu'elle est indétectable dans les BEAS-2B. L'expression de la KLK5 par les cellules 16HBE a été confirmée par immunofluorescence (Figure 22C). Les résultats ont en effet montré une forte intensité de marquage de la KLK5 dans les cellules 16HBE14o- alors que ce marquage est très faible dans les cellules BEAS-2B. La quantité de KLK5 dans le lysat cellulaire, le surnageant de culture ou encore libérée vers la MEC a ensuite été déterminée par ELISA. Les résultats montrent que la KLK5 synthétisée par les cellules 16HBEWT est majoritairement sécrétée dans le surnageant (83,93%). Une faible proportion de la KLK5 a également été retrouvée dans la MEC (0,26%) et dans le culot cellulaire des 16HBE14o- (15,82 %). Pour les BEAS-2B, une faible proportion de la KLK5 a été retrouvée dans le culot cellulaire (2 %). Cependant, la protéase n'a pas été détectée dans le surnageant de ces cellules BEAS-2B.

3.2. Activité enzymatique de la KLK5

L'étude des effets de la KLK5 sur les cellules nécessite que les quantités de protéase ajoutées dans le milieu de culture soient toujours identiques et surtout que l'activité de l'enzyme soit similaire d'une expérience à l'autre. Pour chaque lot utilisé, l'activité enzymatique de la rhKLK5 a été déterminée à l'aide d'un substrat fluorogénique clivé par la protéase. La fluorescence émise (rfu : *relative fluorescent unit*), mesurée par le spectrofluorimètre (λex=355 nm et λem=460 nm), permet de déterminer la vitesse maximale (Vmax) à partir des vitesses initiales de la réaction enregistrées pendant 20 minutes. Pour l'ensemble des lots de rhKLK5 utilisés la Vmax variait entre 2,05 et 3,28. Par ailleurs, avant l'ajout de la rhKLK5 sur les cellules, le milieu complet contenant 10% de SVF était remplacé par du milieu contenant 1% de Nutridoma, un substitut de sérum ne contenant pas d'inhibiteur de protéases contrairement au SVF.

3.3. Régulation de l'activité de la KLK5 par le TFPI-2

Afin de montrer la capacité du TFPI-2 à réguler l'activité de la KLK5, des tests d'inhibition ont été effectués en incubant la KLK5 (53 nM) ou la plasmine (50 nM) avec

100 nM de TFPI-2. La plasmine a été choisie comme référence car cette enzyme est connue pour être efficacement inhibée par le TFPI-2 (Petersen et al, 1996). Afin de calculer la constante d'inhibition (Ki'ou Ki apparent) par le TFPI-2, les enzymes ont été incubées dans leur tampon d'activité respectif pendant 20 minutes en présence de différentes concentrations de TFPI-2 (ratio TFPI-2 : enzyme de 0,5 : 1 à 15 : 1). Le Ki' a été déterminé à l'aide de l'équation de Henderson : [I] / 1 – vi / v0 = Ki' (v0 / vi) + [E], avec [I], la concentration d'inhibiteur, [E] la concentration de l'enzyme, vi la vitesse moyenne de la réaction et v0 la vitesse de la réaction sans l'inhibiteur (Copeland & Kleanthous, 2005).

L'inhibition de 63,5% de l'activité de la plasmine par le TFPI-2 a permis de vérifier les données de la littérature et nous permettent de montrer que le TFPI-2 inhibe également l'activité de la KLK5. En effet 88% de l'activité de cette enzyme est neutralisée par le TFPI-2 avec un Ki' de 5,10 nM (Figure 23).

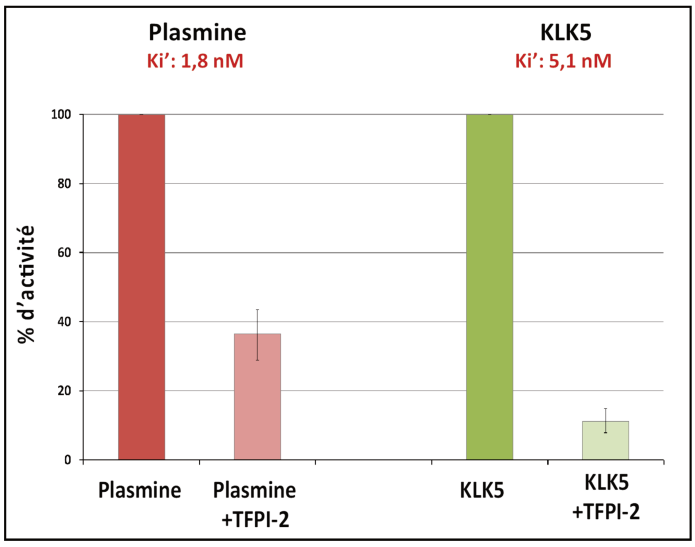
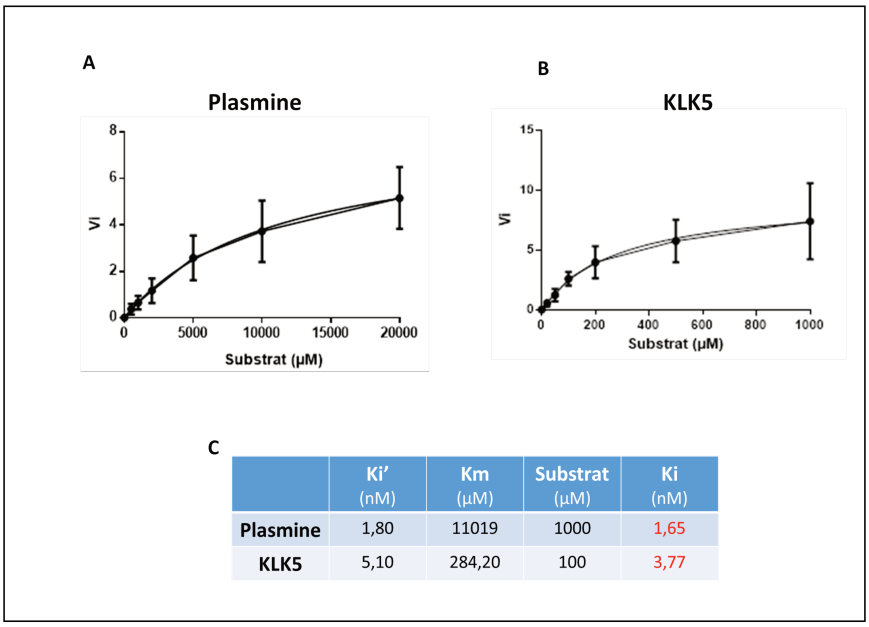


Figure 23 : activité enzymatique de la KLK5 et de la plasmine en présence ou non de TFPI-2. *La KLK5 (53 nM) ou la plasmine (50 nM) a été incubée avec du TFPI-2 (100 nM) pendant 20 minutes. L'activité de la KLK5 ou de la plasmine a été mesurée à l'aide de la fluorescence émise par leur substrat respectif. Les Ki' (Ki apparent) ont été mesurés à l'aide de l'équation [I] / 1 – vi / v0 = Ki' (v0 / vi) + [E]. [I]= la concentration d'inhibiteur, [E]= la concentration de l'enzyme, vi=vitesse moyenne de la réaction, v0= vitesse de la réaction sans l'inhibiteur. Les résultats représentent la moyenne ± écart type de 12 expériences indépendantes réalisées en triplicat.*

Pour corriger l'effet du substrat, nous avons déterminé les constantes d'inhibition réelle (Ki) à partir des Ki' déterminés précédemment. Le Km a tout d'abord été calculé à l'aide de l'équation de Hanes (S/Vi = f([E]). Cette équation a été obtenue à partir des vi de la KLK5 (Figure 24B) et de la plasmine (Figure 24A) en fonction des concentrations des substrats respectifs Boc-V-P-R-AMC (0 à 1000 µM) et Boc-A-L-K-AMC (0 à 20 000 µM).

Le Km nous a en effet permis de calculer le Ki réel ou Ki en utilisant l'équation Ki'=Ki (1+So/Km). Les Ki réels ainsi obtenus sont donc de 3,77 nM pour la KLK5 et de 1,65 nM pour la plasmine (Figure 24C). Ces résultats confirment l'inhibition de la plasmine par le TFPI-2 et démontrent que cet inhibiteur est également capable d'inhiber efficacement la KLK5.



C

	Ki' (nM)	Km (µM)	Substrat (µM)	Ki (nM)
Plasmine	1,80	11019	1000	1,65
KLK5	5,10	284,20	100	3,77

Figure 24 : détermination du Ki réel (Ki) de la KLK5 et la plasmine. *Détermination des vitesses initiales (Vi) de la plasmine (A) et de la KLK5 (B) à partir de différentes concentrations de leur substrat respectif. C) Calcul du Km à l'aide de l'équation de Hanes (*S/Vi = f([E]) et du Ki réel par l'équation Ki'=Ki (1+So/Km). *Les résultats représentent la médiane ± Q1/Q3 de 4 expériences indépendantes*.

3.4. Expression des transcrits du TFPI-2 dans les cellules BEAS-2B et 16HBE14o-

La KLK5 étant exprimée dans les cellules 16HBE14o- mais peu dans les cellules BEAS-2B, nous avons étudié l'expression transcriptionnelle du TFPI-2 dans ces mêmes cellules. Les résultats ont montré que les transcrits de TFPI-2 sont 10x plus représentés dans les cellules BEAS-2B que dans les cellules 16HBE14o- (Figure 25). Pour les transcrits du TFPI-2, les Ct étaient compris entre 17 et19 pour les BEAS-2B et entre 22 et 24 pour les 16HBE14o-.

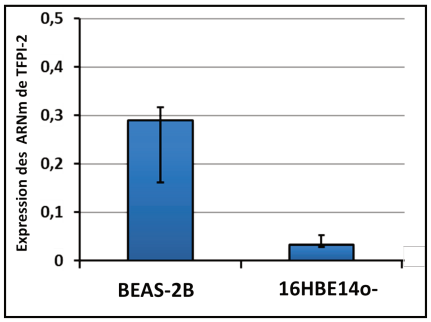


Figure 25 : Expression relative des ARNm du TFPI-2. *L'expression du TFPI-2 a été exprimée en fonction d'un calibrateur et du gène de ménage 18S. Les résultats représentent la mediane et quartiles (Q1 et Q3) de 5 expériences indépendantes.*

3.5. Inducteurs de la KLK5 dans un contexte inflammatoire

Au cours de la BPCO, une augmentation des médiateurs de l'inflammation dans le plasma, particulièrement les cytokines pro-inflammatoires telles que l'Interleukine-6 ou IL-6 (cytokine de la phase aiguë), le TNF-α, la chimiokine CXCL8 (IL-8) et IL-1β a été précédemment démontrée. Ces cytokines jouent un rôle majeur dans le développement et la progression de la maladie. Le stress oxydant est également décrit pour être impliqué dans l'altération de l'épithélium bronchique. Afin de savoir si l'expression de la KLK5 pouvait être induite dans les cellules épithéliales sous l'effet de ces cytokines pro-inflammatoires ou du stress oxydant, nous avons stimulé les cellules BEAS-2B, exprimant faiblement la KLK5 basale, avec ces médiateurs de l'inflammation et étudié l'expression des ARNm de la KLK5 par RT-qPCR ainsi que son expression protéique par immunofluorescence.

Le traitement des cellules BEAS-2B avec les différentes cytokines pro-inflammatoires a augmenté l'expression des ARNm de la *KLK5* avec un pic atteint entre 30 minutes et 4 heures selon la molécule considérée. Ainsi avec le TNF-α (57 ng/mL), dès 30 minutes l'augmentation des transcrits de *KLK5* est d'environ 5 fois alors qu'il est de 3 fois pour l'IL-8 (30 ng/mL) et d'environ 3,5 fois pour l'IL-1β (2,25 ng/mL) à ce même temps de stimulation. Pour l'IL-6 (50 ng/mL) une augmentation des transcrits de 3 fois est observée après 4 heures de stimulation (Figure 26A). Nos résultats ont également montré que le peroxyde d'hydrogène, un des composants libérés dans la fumée de cigarette et inducteur du stress oxydant, a induit d'environ 6 fois la synthèse des ARNm de *KLK5* après 4 heures de traitement (Figure 26A). L'expression protéique de la KLK5 était fortement augmentée dans les cellules BEAS-2B à partir de 6 heures de traitement avec le TNF-α et à partir de 4 heures de traitement avec les cytokines IL-8, IL-1β, IL-6 et l'H_2O_2 comme montré par immunofluorescence (Figure 26B).

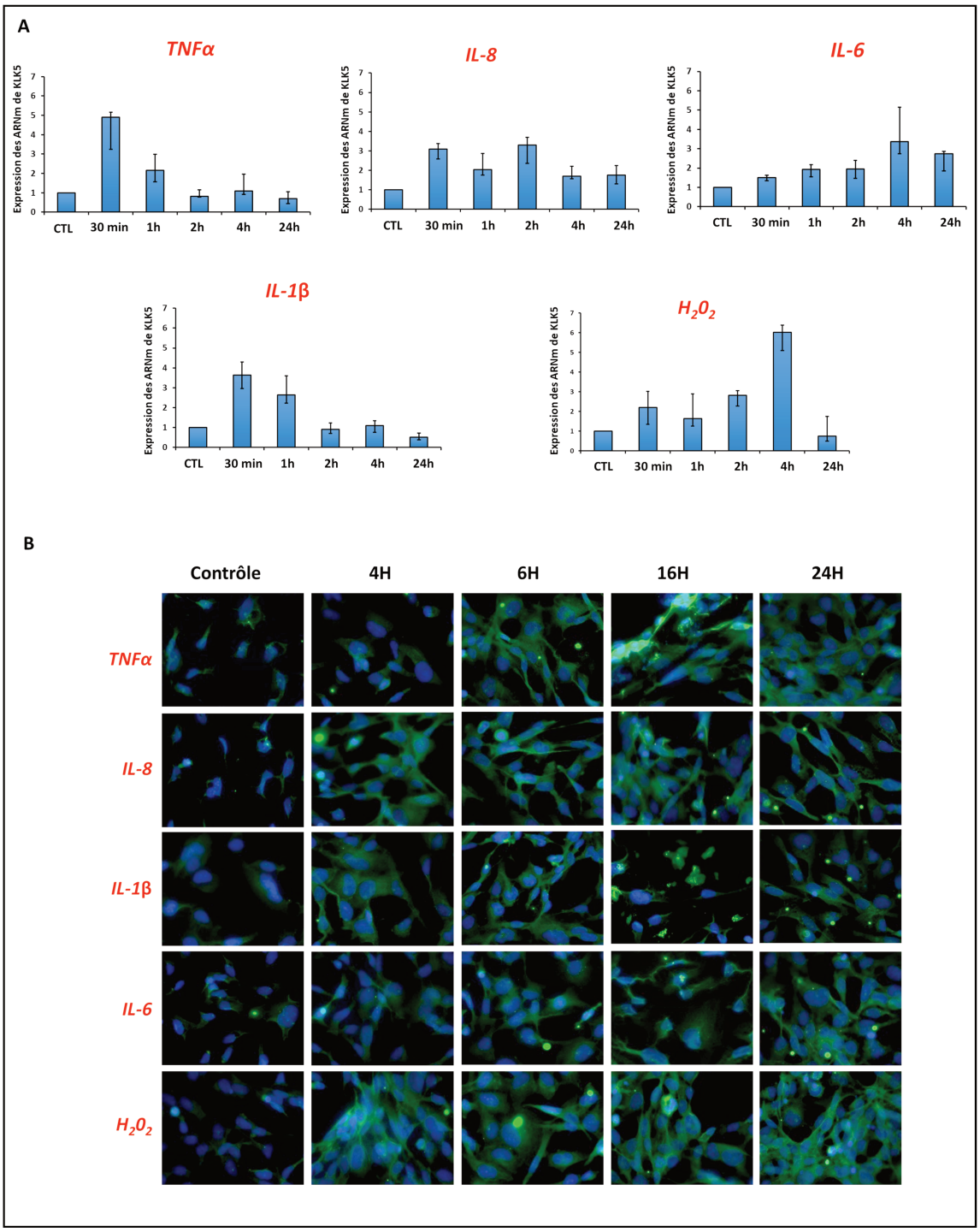


Figure 26 : Induction de la KLK5 par les cytokines pro-inflammatoires et le stress oxydant. *A) Expression des ARNm KLK5 des cellules BEAS-2B non traitées (contrôle, CTL) ou traitées avec TNF-α (57 ng/mL), IL-8 (30 ng/mL), IL-1β (2,25 ng/mL), IL-6 (50 ng/mL) et H_2O_2 (150 µM) pendant 30 minutes, 1, 2 et 4 heures. La quantification relative des ARNm a été déterminée par RT-qPCR et les résultats représentés en fonction de la condition contrôle arbitrairement fixée à 1. Les résultats représentent la médiane et quartiles (Q1 et Q3) d'au moins 4 expériences indépendantes). B) Expression protéique de la KLK5 déterminée par immunofluorescence après stimulation des cellules par les cytokines pro-inflammatoires et H_2O_2 pendant 0, 4, 6, 16 et 24 heures. Les images ont été prises à l'objectif 63x. Les résultats sont représentatifs de 2 expérimentations.*

3.6. Impact de l'addition de KLK5 exogène sur les cellules BEAS-2B

3.6.1. Effets de différentes concentrations de la rhKLK5 sur l'expression de la vimentine.

Les cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF-α et les interleukines 1β, 6 et 8 ou encore le peroxyde d'hydrogène, sont capables d'induire l'expression de la KLK5 dans les cellules BEAS-2B. En situation inflammatoire ou de stress oxydant, la KLK5 pourrait être sécrétée par les cellules épithéliales agressées. Pour étudier les effets potentiels de cette protéase sur les cellules épithéliales environnantes, des cellules BEAS-2B ont été incubées avec des concentrations croissantes de KLK5 recombinante. Etant donné que les cytokines pro-inflammatoires ont induit un changement morphologique, avec un allongement des cellules BEAS-2B, observé surtout après 6 heures de contact, nous avons choisi d'étudier l'expression de la vimentine, un marqueur mésenchymateux, après exposition des cellules à la rhKLK5. De plus, pour maintenir la rhKLK5 active tout au long du traitement, nous avons remplacé le milieu de croissance cellulaire contenant 10% de SVF, par un milieu de traitement avec 1% de Nutridoma. Ce changement de milieu permet de s'affranchir des effets des inhibiteurs présents dans le SVF.

Les cellules ont été traitées avec 0, 0,025, 0,05, 0,1 et 0,2 µM de rhKLK5 pendant 48 heures avant de détecter, en immunofluorescence, la vimentine. Les résultats présentés dans la figure 27 confirment l'allongement des cellules observé précédemment à partir de 0,025 µM de rhKLK5. Une augmentation de l'expression de la vimentine apparaît nettement à partir de 0,05 µM de rhKLK5 avec un effet sur la morphologie des cellules beaucoup plus marqué. Avec les plus fortes concentrations de la KLK5 utilisées (0,1 et 0,2 µM) une augmentation marquée de la fluorescence associée à la vimentine est observée ainsi que la formation d'amas cellulaires et leur détachement du support. Ces résultats nous ont conduits à choisir la concentration de 0,05 µM comme concentration optimale induisant un effet marqué mais ayant moins de toxicité pour les cellules BEAS-2B.

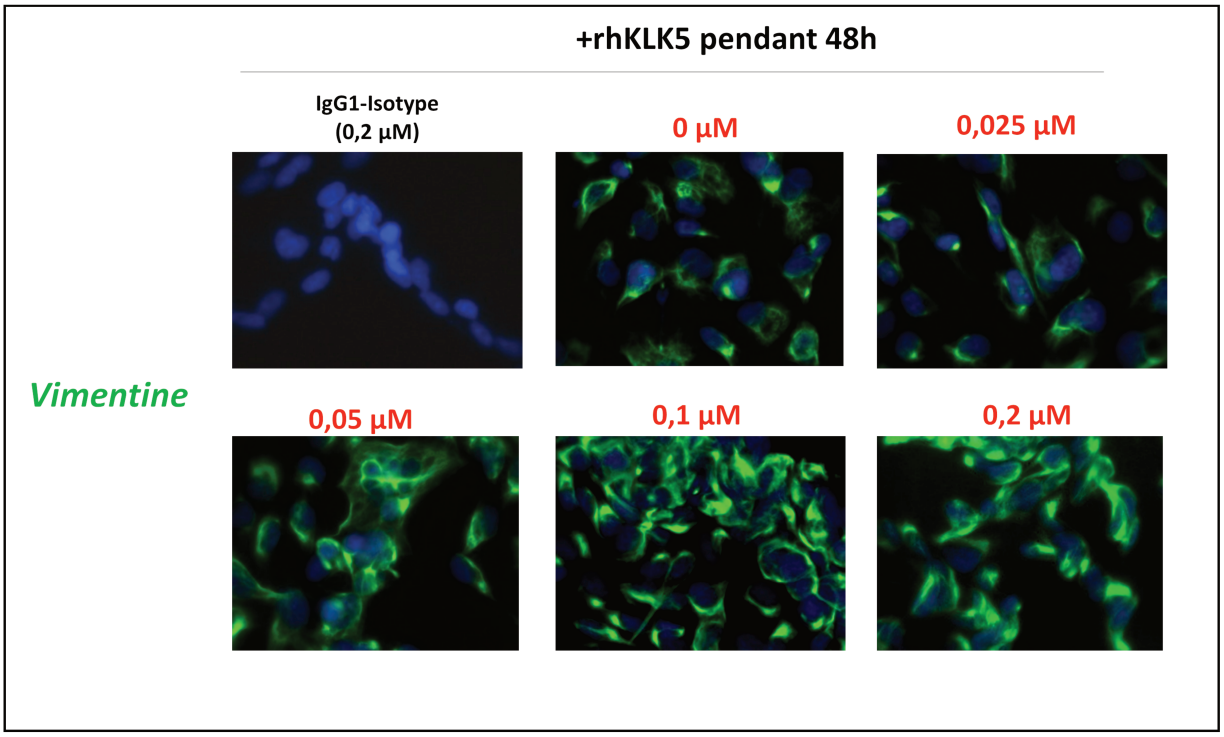


Figure 27 : Effets de différentes concentrations de rhKLK5 sur l'expression de la vimentine par les cellules BEAS-2B. *Expression de la vimentine observée par immunofluorescence. 0 µM représente la condition contrôle des cellules sans traitement et 0,2 µM la plus forte concentration de la rhKLK5 dans le milieu de culture contenant 1% de Nutridoma. Le contrôle de marquage a été réalisé avec un anticorps IgG isotypique à la plus forte concentration (0,2 µM). Images prises à l'objectif x63. Les résultats sont représentatifs de 3 expérimentations.*

3.6.2. Effet de la rhKLK5 sur l'expression de la vimentine en fonction du temps

Après avoir sélectionné la concentration de 0,05 µM comme optimale pour le traitement des cellules BEAS-2B, ces dernières ont été exposées à la rhKLK5 pendant 30 minutes, 1, 2, 4, 6, 24 et 48 heures. Après chacun de ces temps de contact, la vimentine a été détectée par immunofluorescence.

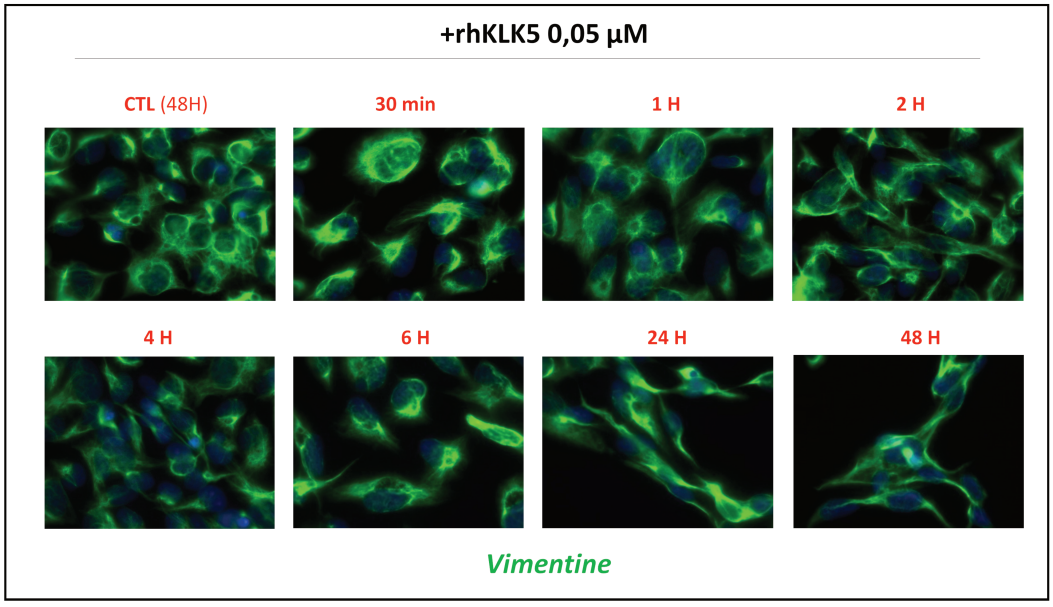


Figure 28 : Expression de la vimentine induite par 0,05 µM de rhKLK5 en fonction du temps. *L'expression de la vimentine par les cellules BEAS-2B a été détectée par immunofluorescence. CTL représente la condition contrôle des cellules cultivées en milieu avec 1% de Nutridoma sans traitement pendant 48 heures, le temps de traitement maximal. Images prises à l'objectif x63. Les résultats sont représentatifs d'au moins 2 expérimentations indépendantes.*

Les cellules BEAS-2B expriment de la vimentine à l'état basal comme montré dans la condition contrôle (Figure 28). L'ajout de 0,05 µM de rhKLK5 provoque un allongement des cellules dès 2 heures de traitement, sans changement notable de l'expression de la vimentine. A partir de 6 heures de traitement des cellules avec 0,05 µM de rhKLK5, une légère augmentation de l'expression de la vimentine est constatée. Lorsqu'elles sont incubées pendant 24 et 48 heures avec la rhKLK5, les cellules BEAS-2B présentent un phénotype très allongé, avec une forte expression de la vimentine. De plus, un détachement des cellules est observé après 48 heures de traitement. Ces résultats démontrent un effet optimal du traitement des cellules BEAS-2B avec 0,05 µM de rhKLK5 et 24 heures de traitement. Ainsi dans la suite de l'étude, ces conditions ont été choisies pour étudier les effets de la protéase sur les mécanismes de remodelage de l'épithélium bronchique.

3.6.3. Effet de la rhKLK5 sur l'expression de la KLK5 par les cellules BEAS-2B

Les cellules BEAS-2B ont été incubées avec 0,05 µM de KLK5 exogène pendant 24 heures puis le lysat cellulaire a été déposé sur des membranes de nitrocellulose recouvertes d'anticorps de capture spécifiques de 35 protéases différentes, dont la KLK5 (Figure 29A).

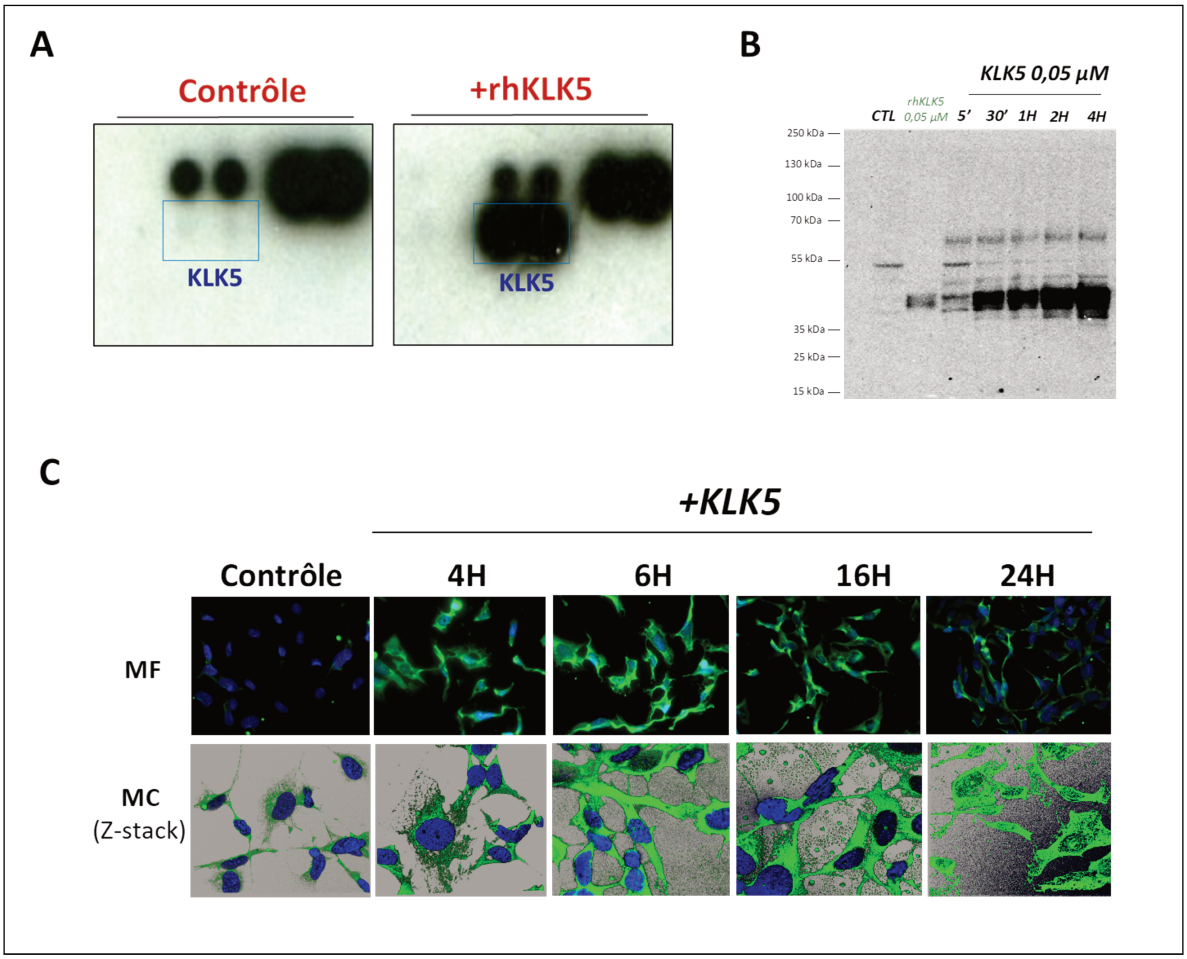


Figure 29 : Détection de la KLK5 dans les cellules BEAS-2B incubées avec la KLK5 recombinante. *A) Criblage de l'expression des protéases après traitement des cellules BEAS-2B avec 0,05 µM de rhKLK5 pendant 24 heures. B) Détection par immunoempreinte de la KLK5 dans le lysat des cellules BEAS-2B traitées ou non avec 0,05 µM de rhKLK5 pendant 5 et 30 minutes, 1, 2 et 4 heures. La protéine recombinante seule (rhKLK5) à 0,05 µM est représentée en vert. C) Détection de la KLK5 après traitement des BEAS-2B par la rhKLK5 ou non (contrôle) pendant 4, 6, 16 et 24 heures, par microscopie à fluorescence (MF) et confocale (MC) sur plusieurs plans (z-stack). Les résultats sont représentatifs d'au moins 2 expérimentations.*

Grâce à ce système de criblage de protéases, nous avons observé une forte augmentation de l'expression de la KLK5 dans les cellules BEAS-2B traitées avec la rhKLK5. Ces résultats ont ensuite été confirmés par immunoempreinte (Figure 29B), par immunofluorescence (MF) et microscopie confocale (MC) (Figure 29C). Ainsi une augmentation rapide de la KLK5 est détectée dans ces cellules à partir de 30 minutes de traitement avec la rhKLK5. Cette présence de KLK5 dans les cellules est encore observée par immunofluorescence après 24 heures de traitement.

Ces résultats suggèrent différentes hypothèses, soit la KLK5 détectée dans les cellules correspond à une induction de sa propre expression, soit à une internalisation de la protéine

recombinante mise en contact des cellules BEAS-2B. L'analyse des transcrits de KLK5 par RT-qPCR montre une induction de l'expression de l'ordre de 3 fois après traitement des cellules BEAS-2B pendant 30 minutes (Figure 30A). Cependant ceci n'explique cependant pas l'apparition très rapide de la protéine, détectée dès 30 minutes dans les cellules.

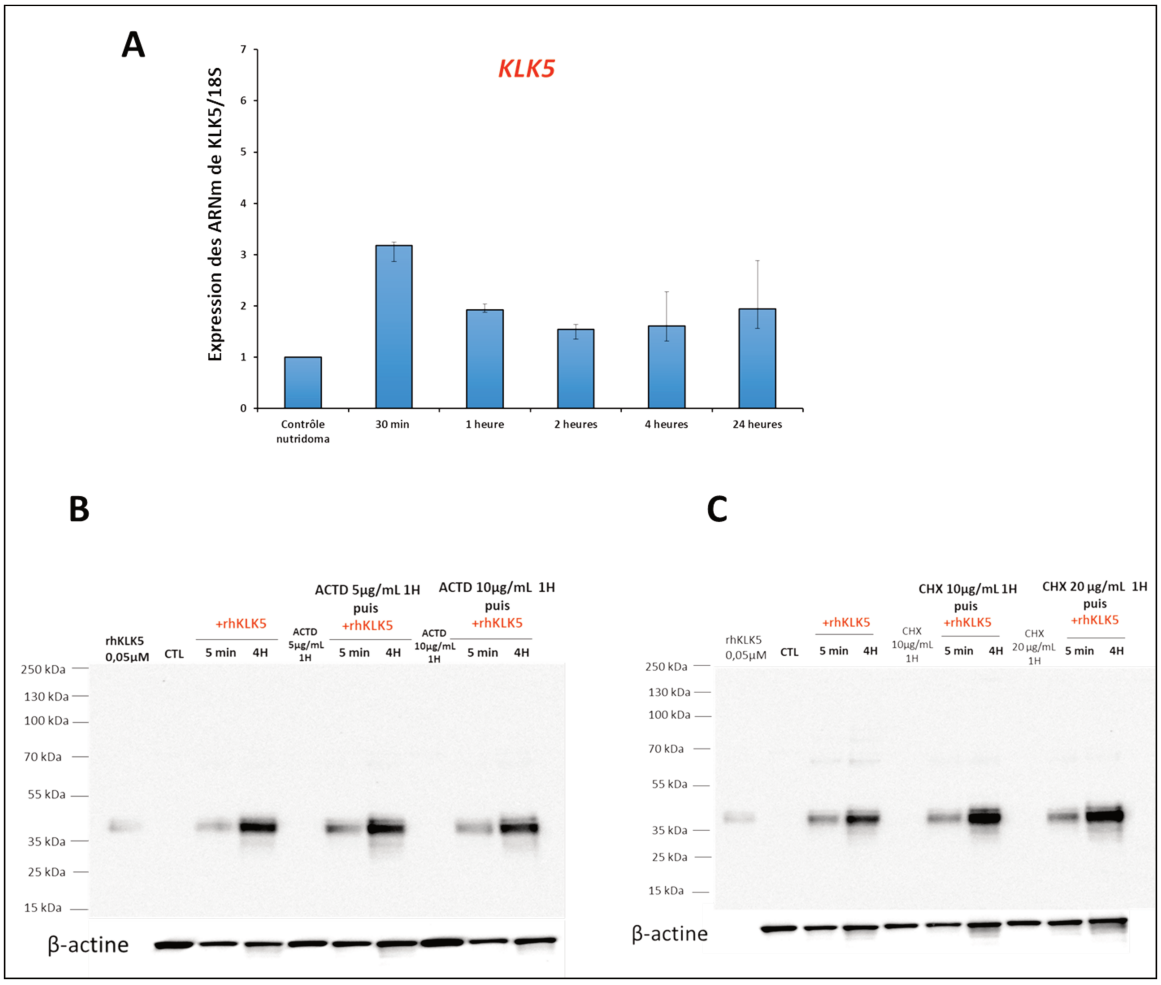


Figure 30 : induction de l'expression génique de la KLK5 par la KLK5 recombinante. *A) Expression des ARNm de KLK5 à partir des cellules BEAS-2B traitées avec la rhKLK5 pendant 30 minutes, 1, 2 et 4 heures. La quantification relative des ARNm a été déterminée par RT-qPCR et les résultats représentés en fonction de la condition contrôle arbitrairement fixée à 1. Les résultats de 3 expériences indépendantes sont représentés en médiane et quartiles (Q1 et Q3). B) Expression protéique de la KLK5 par western blotting après prétraitement des cellules BEAS-2B avec 5µg/mL ou 10 µg/mL d'actinomycine D (ACTD) pendant 1 heure et traitement avec la rhKLK5 pendant 5 minutes et 4 heures. C) Prétraitement des cellules avec 10 µg/mL ou 20 µg/mL de cycloheximide. La β-actine représente le témoin de charge protéique.*

Par ailleurs, le prétraitement des cellules BEAS-2B avec l'actinomycine D, pour bloquer la transcription (Figure 30B), ou avec la cychloheximide, pour bloquer la synthèse des protéines (Figure 30C), n'a montré aucune diminution de l'expression de la KLK5 après traitement avec la KLK5 recombinante. L'hypothèse de l'internalisation rapide de la rhKLK5 dans les cellules étant privilégiée, nous avons tenté de détecter, par immunoempreinte, cette

dernière à l'aide d'un anticorps reconnaissant l'étiquette histidine couplée à la protéase. Cependant cette technique n'a pas été suffisamment sensible pour détecter les faibles concentrations de rhKLK5 utilisée dans nos expériences. Des techniques complémentaires de marquage de la rhKLK5 seraient nécessaires pour affirmer l'hypothèse de l'internalisation de la protéine dans les cellules BEAS-2B.

3.6.4. Impact de la KLK5 sur les voies de signalisation

Nous avons par la suite étudié les voies de signalisation impliquées lorsque les cellules BEAS-2B sont incubées avec 0,05 µM de rhKLK5 pendant 24 heures.

Pour étudier simultanément plusieurs voies de signalisation, nous avons utilisé des membranes de nitrocellulose recouvertes de 46 anticorps de capture dirigés contre les protéines phosphorylées de différentes voies de signalisation. Les membranes ont été mises en présence des protéines du lysat des cellules BEAS-2B traitées ou non avec la rhKLK5 et les résultats obtenus sont présentés dans la figure 31A. L'intensité du signal a été mesurée pour chacune des protéines phosphorylées mais seuls les résultats des spots où nous avons observé des différences entre les cellules traitées et non traitées sont présentés (Figure 31B et C). En effet, (Figure 31B) une augmentation de la phosphorylation des protéines impliquées dans la voie de signalisation des MAPKinases, notamment la phosphorylation de ERK1/2 (T202/Y204 ; T185/Y187) et de MEK1/2 (S218/S222 ; S222/S226) a été observée, alors qu'une légère diminution a été obtenue pour la protéine Akt (T308) dans les cellules traitées par la rhKLK5. Ces résultats ont été confirmés par immunoempreinte (cf Figure 6 de l'article) en parallèle de l'étude de la migration cellulaire. Les voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire ont également été impactées par le traitement par la rhKLK5 (Figure 31B). Une diminution de la phosphorylation des protéines CREB (S133), GSK3α/β (S21 : S9), c-Jun (S63) et de l'expression de la β-caténine a été obtenue. La phosphorylation des protéines d'adhérence focale FAK (Y397), Hck (Y411) et PLCy-1 (Y783) impliquées dans l'adhérence cellulaire a été légèrement diminuée dans les cellules BEAS-2B traitées avec la rhKLK5.

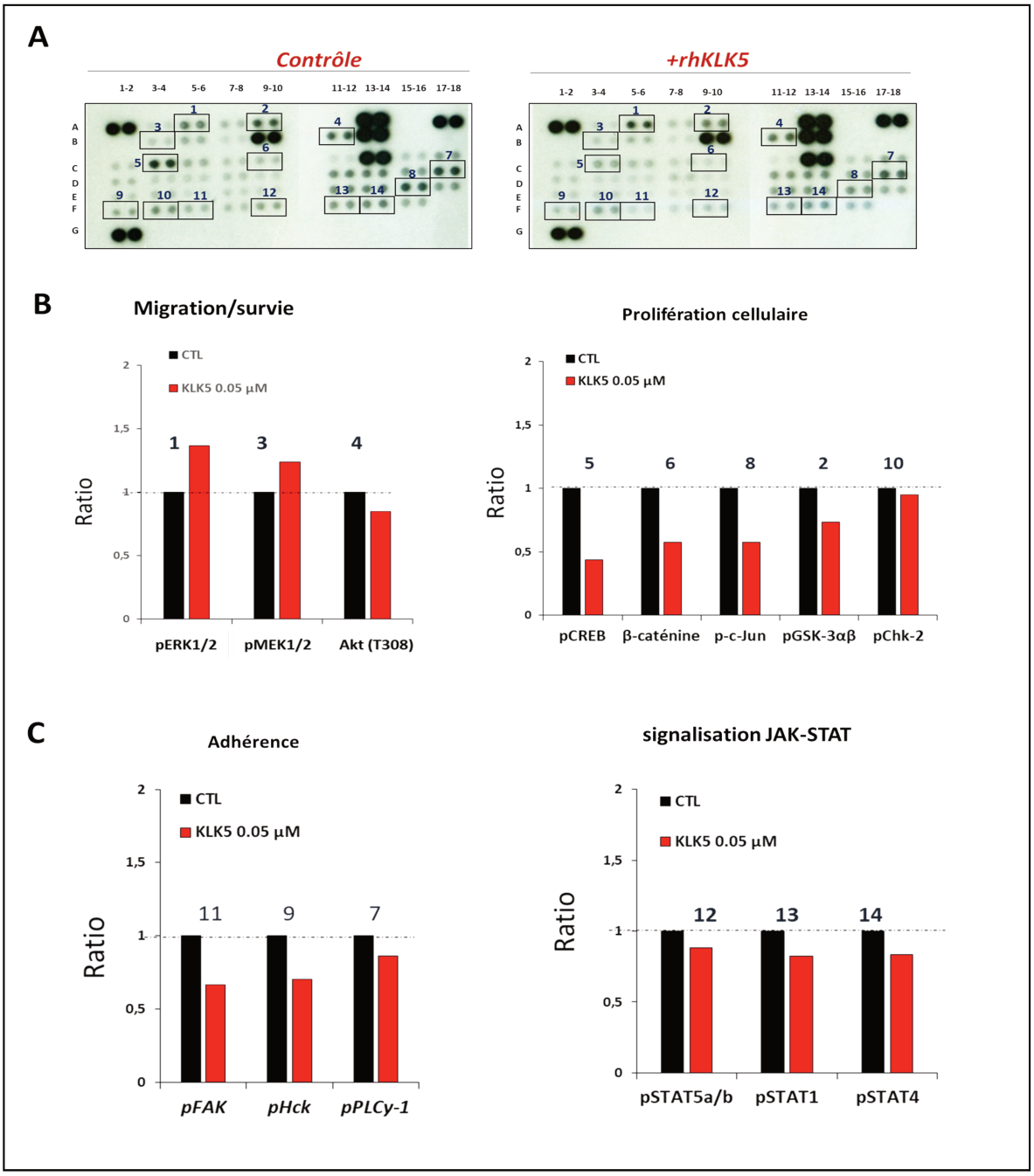


Figure 31 : Criblage des voies de signalisation activées dans les cellules BEAS-2B incubées avec la KLK5 recombinante. A) *Détection des phosphorylations de protéines kinases, à partir des lysats de cellules BEAS-2B traitées (+rhKLK5) ou non (CTL) avec la rhKLK5. Les anticorps de capture sont présents en double pour chaque protéine étudiée. Les spots A1-2, A17-18 et G1-2 représentent les contrôles positifs et G17-18 les contrôles négatifs. Les protéines phosphorylées, dont l'expression est modifiée en présence de KLK5, sont encadrées. B) et C) l'intensité de chacun des spots a été mesurée à l'aide du logiciel image J et rapportée à celle obtenue avec les cellules BEAS-2B non traitées. Seuls les résultats des protéines phosphorylées dont l'expression a été modifiée sont présentés.*

Enfin, nous avons observé une très légère diminution des voies de signalisation JAK-STAT comme STAT5 α/β (Y699), STAT1 (T701) et STAT4 (Y693) (Figure 31C); laquelle est impliquée dans la synthèse des cytokines et facteurs de croissance. Nos résultats suggèrent

donc l'implication de la KLK5 dans plusieurs mécanismes cellulaires tels que la migration, la prolifération, ou encore l'adhérence cellulaire.

3.7. Invalidation du gène de la KLK5 endogène par la technique CRISPR Cas 9

Pour invalider de manière efficace et stable le gène de la *KLK5* dans les cellules 16HBE14o-, nous avons utilisé la technique de biologie moléculaire CRISPR Cas9. Pour ce faire, nous avons réalisé une transfection simultanée des cellules avec deux plasmides distincts (Figure 32). Les plasmides KLK5 *CRISPR/Cas9 Knockout out plasmid* se composent d'un mélange de 3 plasmides comportant chacun une séquence de l'ARN guide ciblant 3 zones différentes de la région 5' du gène de *KLK5* ainsi qu'une séquence d'ADN qui code pour la nucléase Cas9 et pour un Tag-GFP (vert). Les plasmides KLK5 *Homology-Directed Repair (HDH) plasmid* contiennent une séquence codant pour le gène de résistance à la puromycine (Puro), permettant de sélectionner les cellules résistantes à la puromycine et invalidées pour la *KLK5* (16HBE KLK5 KO). La séquence du gène RFP (*Red Fluorescent Protein*), permettant d'identifier les cellules qui ont intégré ce plasmide ainsi que des séquences capables de s'hybrider de part et d'autre des sites de coupure dans l'ADN de *KLK5,* sont également retrouvées dans ce plasmide. Les gènes de la puromycine et de la RFP sont flanqués par deux séquences LoxP permettant leur excision dans les cellules. Lorsque ces deux séries de plasmides sont co-transfectées dans les cellules 16HBE14o-, le plasmide CRISPR cas9 produit la nucléase Cas9 qui va reconnaître et cliver le gène de la *KLK5*. Le plasmide HDR permet de réparer la cassure double brin induite par la Cas9, en insérant par recombinaison homologue le gène de résistance à la puromycine. Cet antibiotique permet de sélectionner les cellules invalidées pour la *KLK5*, grâce à leur résistance à la puromycine. Au préalable, les cellules 16HBE14o- ont été incubées avec des concentrations de puromycine allant de 0,1 à 10 µg/mL afin de déterminer la concentration permettant de tuer les cellules en 5 jours environ. La concentration de 2 µg a donc été utilisée lors de la sélection.

Après 48 heures de transfection, nous avons vérifié l'intégration des deux plasmides en observant la fluorescence de la GFP et de la RFP. En effet, nous avons observé plusieurs cellules ayant intégré le plasmide CRISPR cas 9 (points verts, flèches blanches) et le plasmide HDR (points rouges, flèches bleues). La superposition des cellules 16HBE14o- avec une fluorescence verte et rouge nous a permis d'identifier les cellules transfectées à la fois par le plasmide CRISPR cas9 et HDR (points jaune, flèches rouge), dans lesquelles l'invalidation de

la *KLK5* est susceptible de se produire. L'ajout de la puromycine nous a permis d'éliminer les cellules sensibles à cet antibiotique et sélectionner les cellules résistances, invalidées pour la KLK5.

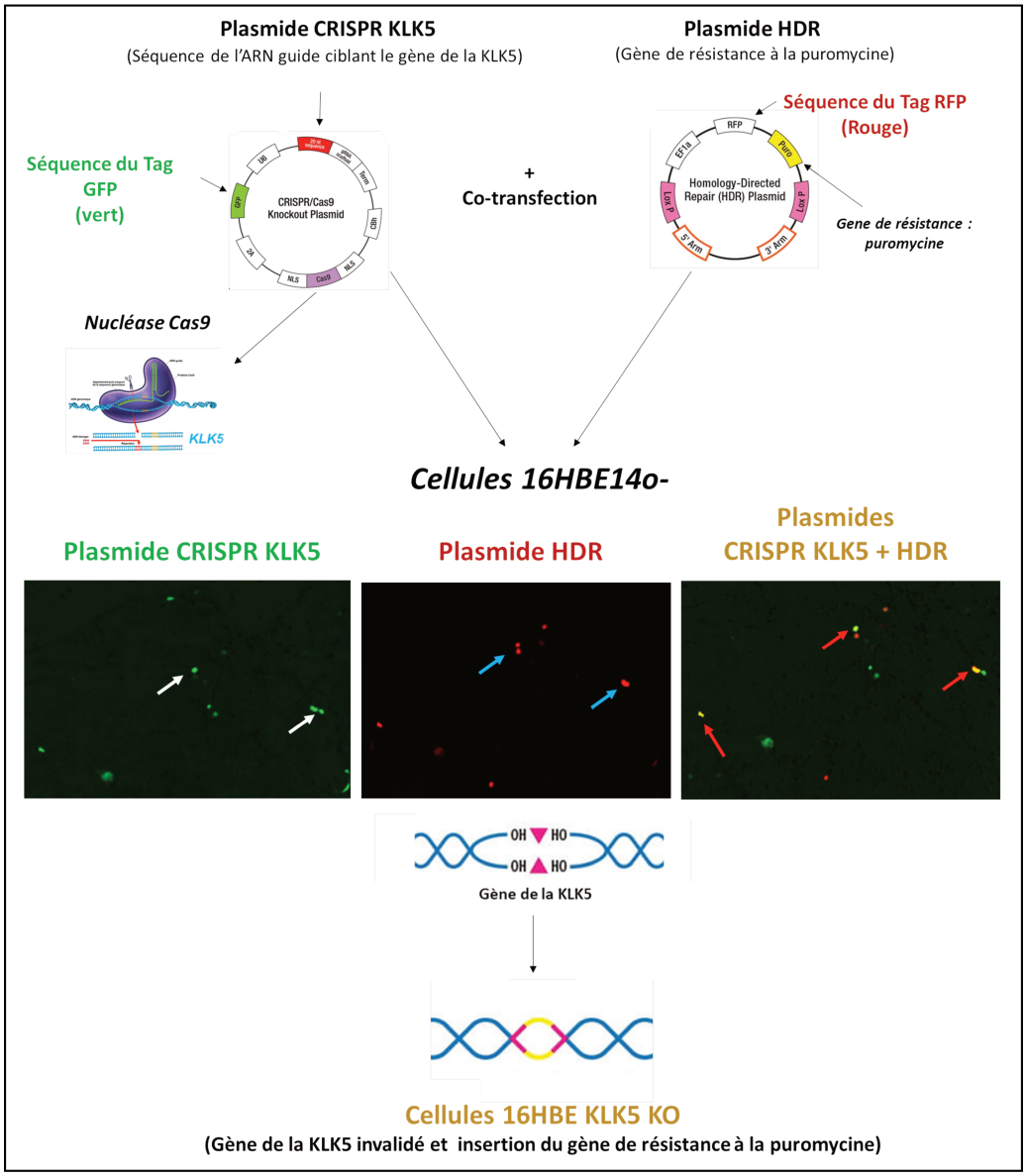
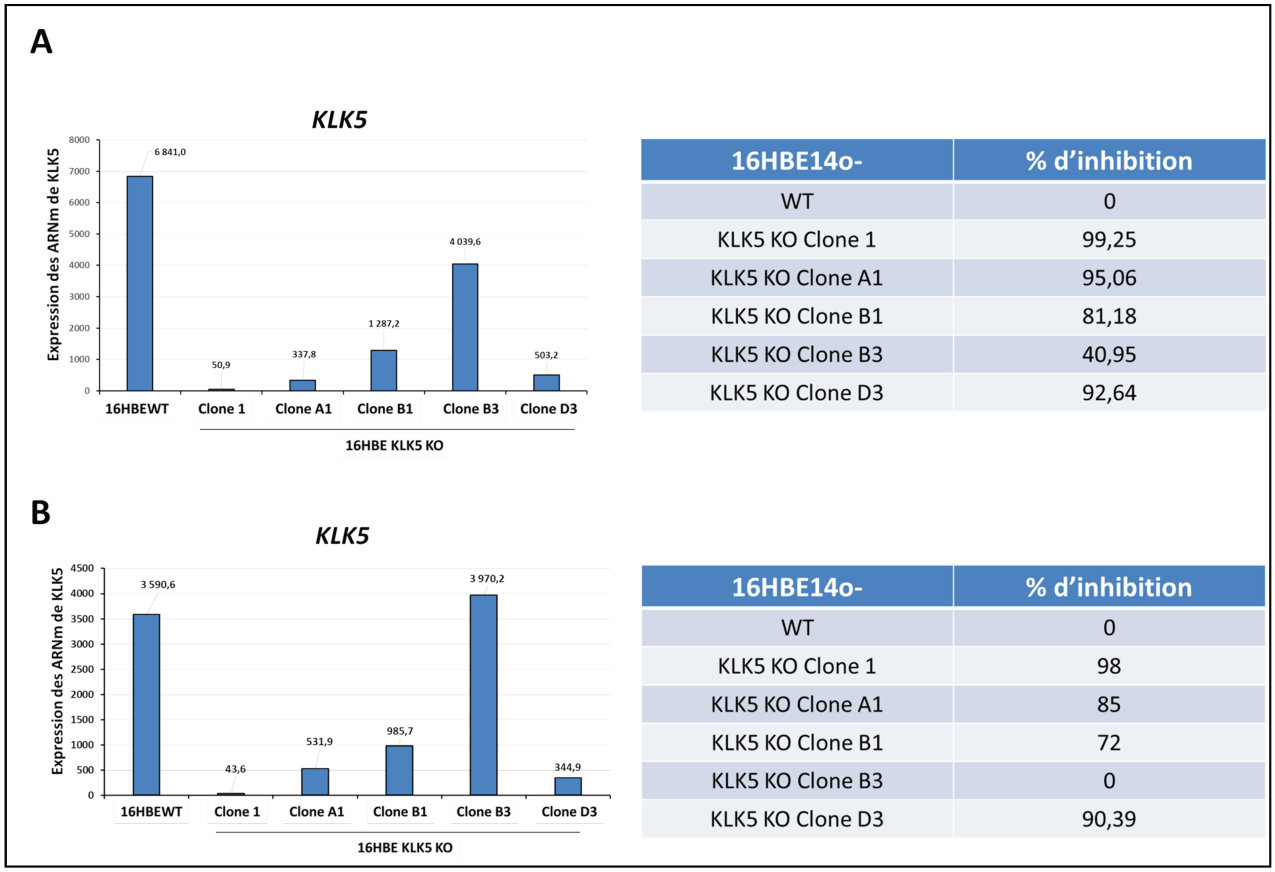


Figure 32 : Invalidation du gène de la KLK5 dans les cellules 16HBE14o- par la technique CRISPR Cas9. *Les cellules 16HBE14o- sont simultanément co-transfectées par les plasmides CRISPR Cas9 KLK5 KO (points verts, flèches blanches) et KLK5 HDR (points rouges, flèches rouges. Dans les cellules transfectées par les deux plasmides (points jaunes, flèches rouges) la Cas9 produite induit une cassure double brin dans le gène de la KLK5 et le gène de la puromycine est inséré par recombinaison homologue. Les cellules 16HBE14o- invalidées pour la KLK5 (16HBE KLK5 KO) sont sélectionnées grâce à leur résistance à la puromycine.*

Nous avons ensuite réalisé un clonage des cellules 16HBE KLK5 KO générées, puis sélectionné plusieurs clones que nous avons amplifiés. L'expression de la KLK5 a été quantifiée par RT-qPCR dans les différents clones obtenus.



16HBE14o-	% d'inhibition
WT	0
KLK5 KO Clone 1	99,25
KLK5 KO Clone A1	95,06
KLK5 KO Clone B1	81,18
KLK5 KO Clone B3	40,95
KLK5 KO Clone D3	92,64

16HBE14o-	% d'inhibition
WT	0
KLK5 KO Clone 1	98
KLK5 KO Clone A1	85
KLK5 KO Clone B1	72
KLK5 KO Clone B3	0
KLK5 KO Clone D3	90,39

Figure 33 : Quantification de l'expression des ARNm KLK5 dans des clones de cellules 16HBE KLK5 KO résistantes à la puromycine. *A) Expression de KLK5 après l'étape d'obtention des clones B) Expression de KLK5 après 2 passages des cellules des différents clones. La quantification relative des ARNm a été déterminée par RT-qPCR et les résultats sont exprimés par rapport au calibrateur, arbitrairement fixé à 1. Le pourcentage d'inhibition de l'expression de la KLK5 est exprimé en fonction des cellules sauvages (WT).*

Les résultats de la figure 33A montrent que la KLK5 est fortement exprimée dans les 16HBE WT et dans le clone B3. En revanche, une forte inhibition des transcrits de la KLK5 a été observée dans les clones 1 (99,25%), A1 (95,06%), D3 (92, 64%) et une inhibition modérée pour le clone B1 (81,18%).

Pour vérifier la stabilité de l'inhibition de l'expression des transcrit de la *KLK5* nous avons à nouveau réalisé une RT-qPCR à partir de des ARNm extraits des cellules après deux repiquages des cellules. Nos résultats (Figure 33B) montrent que l'expression de la *KLK5* dans le clone B3 est maintenant semblable à celle des cellules 16HBE WT. Les transcrits de la *KLK5* sont en revanche toujours fortement inhibés dans le clone 1 (98% d'inhibition) et D3 (90% d'inhibition). Nous avons remarqué une réduction de l'inhibition de la *KLK5* dans les clones A1 (85% d'inhibition *vs* 95,06%) et B1 (72% d'inhibition *vs* 81%) (Figure 32A et B). Sur la base de ces résultats, nous avons pour la suite de l'étude, sélectionné le clone 1, que

nous appellerons 16HBE KLK5 KO, présentant une inhibition stable de la KLK5 après plusieurs repiquages des clones cellulaires. L'absence d'expression des transcrits KLK5 a été régulièrement contrôlée tout au long des expérimentations afin de s'assurer de la stabilité de l'invalidation.

3.7.1. Effets de l'invalidation de la KLK5 sur les autres protéases et inhibiteurs de protéases.

Les effets de l'inhibition du gène de la *KLK5* sur d'autres protéases et des inhibiteurs de protéases ont ensuite été étudiés grâce à des membranes de nitrocellulose sur lesquelles des anticorps de capture sont fixés pour réaliser ce criblage. Les lysats protéiques des cellules 16HBE WT et 16HBE KLK5 KO ont été testés et l'intensité de l'immunomarquage mesurée pour chacun des spots obtenus en double (figure 34A).

L'absence de détection de la KLK5 a été confirmée dans les cellules 16HBE KLK5 KO (spots B 17-18 ; 5). Nos résultats ont montré que l'invalidation de KLK5 a entrainé une diminution de l'expression des protéases telles que la cathepsine D (-20x) et la cathepsine V (-5,4x) mais cette dernière était faiblement exprimée dans les cellules 16HBE WT. Cependant, l'expression des protéases uPA/urokinase (1,8x), ADAM9 (2,1x) et de la protéase DPPIV (*DiPeptidyl Peptidase IV*) /CD26 (3,9x) a été augmentée dans les cellules 16HBE KLK5 KO. Il est à noter que nous n'avons pas détecté l'expression des KLK 3, 6, 7, 10, 11 et 13 ni celle des MMP-1, -2, -3, -7, -9, -10, -12 et -13 dans les cellules 16HBE WT et celles invalidées pour KLK5. Cependant, les MMP et les KLK sont essentiellement secrétées ce qui explique en partie l'absence de détection de ces protéases dans le lysat cellulaire.

Concernant les inhibiteurs de protéases, nous avons remarqué une augmentation de l'expression des inhibiteurs PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor*; 1,8x), Serpine B8 (*protease Inhibitor 8*; 2,3x), TIMP-2 (7,3x), et HE4/WFDC2 (*human epidimydis protein-4/ whey acidic protein 4-disulphide core domain* 2; 7,1x) après invalidation de la *KLK5*. Seule l'expression de l'inhibiteur HAI-2 (*hepatocyte growth factor activator inhibitor)* a été inhibée (-3,9x) dans les cellules 16HBE KLK5 KO comparée aux cellules 16HBE WT (figure 34B). Le TFPI-2 (D7-8) est l'un des inhibiteurs les plus représentés, aussi bien dans les 16HBE WT que dans les 16HBE KLK5 KO.

Ces résultats suggèrent l'implication de la KLK5 dans plusieurs réseaux de protéases et inhibiteurs de protéases.

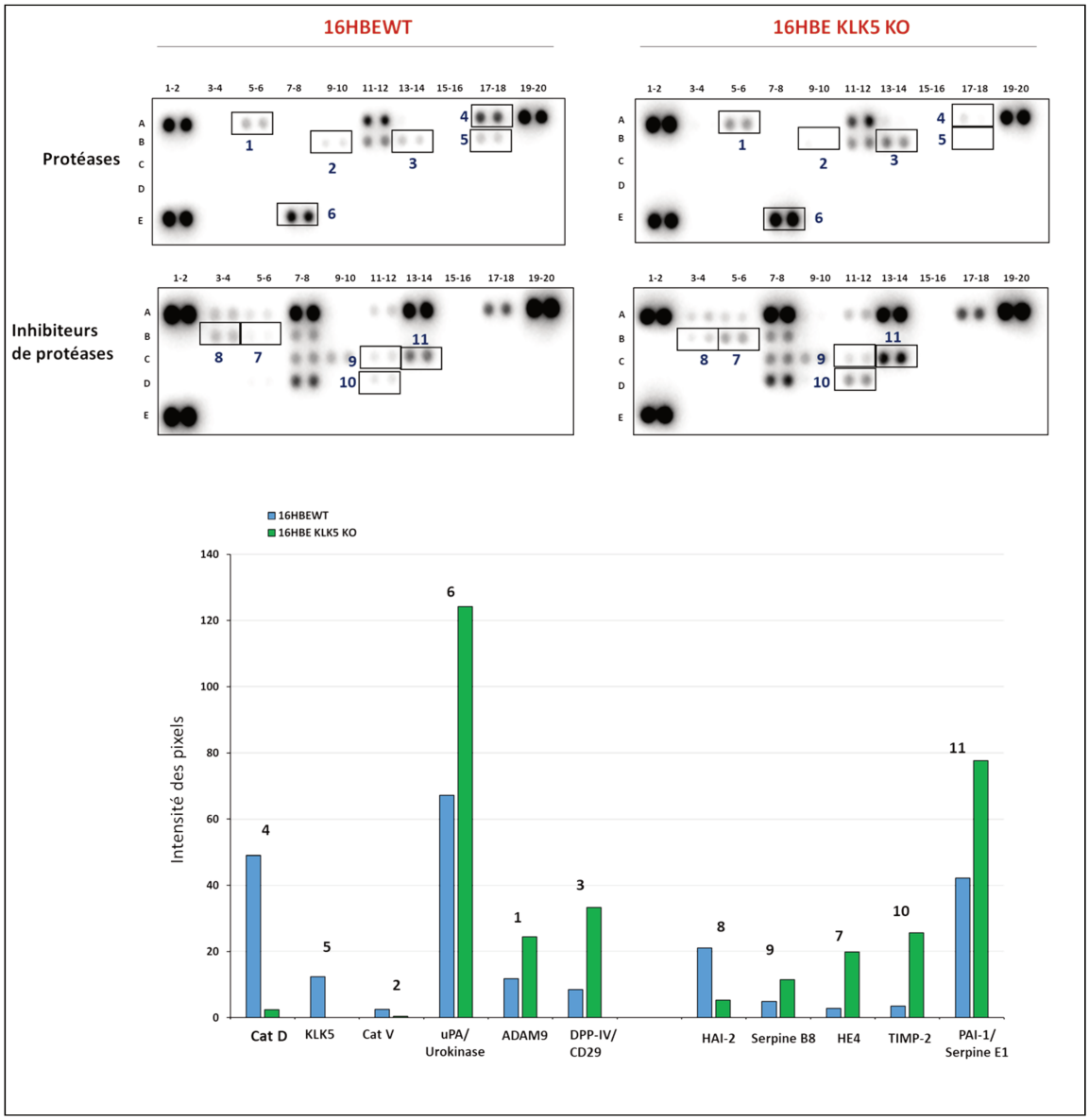


Figure 34 : Criblage des protéases et inhibiteurs de protéases dans les cellules 16HBE WT et 16HBE KO KLK5. *A) Détection des protéases et inhibiteurs de protéases à partir des protéines de lysats cellulaires. Les anticorps de capture sont présents en double pour chaque protéine étudiée. Les spots A1-2, A19-20 et E1-2 représentent les contrôles positifs et E19-20 les contrôles négatifs. Les protéases et inhibiteurs de protéases dont l'expression est modifiée sont encadrés. B) Représente la quantification de l'intensité des spots mesurée à l'aide du logiciel Image J. Seuls les protéases et inhibiteurs de protéases dont l'expression a été modulée d'au moins 1,8x ont été représentés.*

3.7.2. Détection de la E-cadhérine, de la β-caténine et de la vimentine dans les cellules 16HBE14o- invalidées pour la KLK5

Afin de caractériser sur le plan phénotypique les modèles cellulaires étudiés dans ce projet, les marqueurs épithéliaux (E-cadhérine et β-caténine) et mésenchymateux (vimentine) ont été détectés dans les cellules BEAS-2B, 16HBE14o- WT et KLK5 KO dans un système de culture classique immergée.

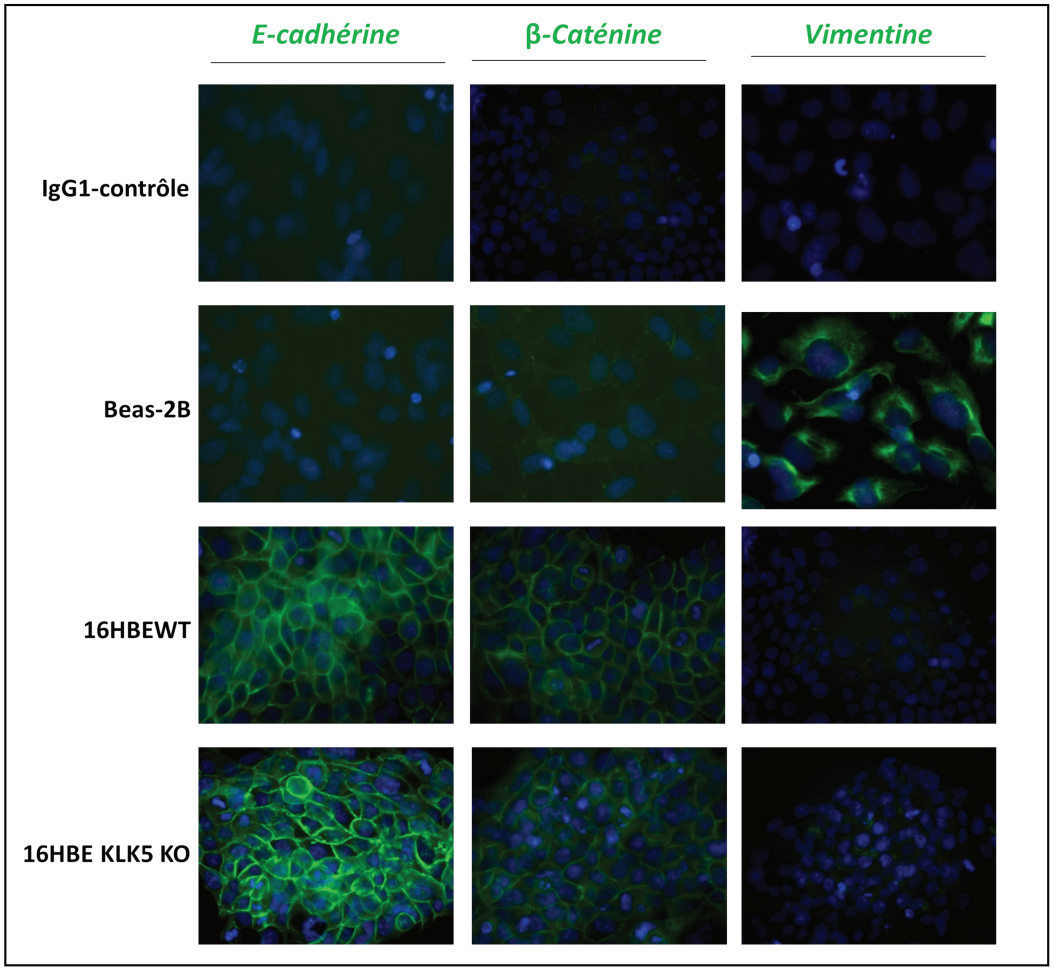


Figure 35 : Expression des marqueurs épithéliaux (E-cadhérine, β-caténine) et mésenchymateux (vimentine) dans les cellules épithéliales bronchiques non différenciées. *Détection par immunofluorescence de la E-cadhérine, de la β-caténine et de la vimentine dans les cellules BEAS-2B, 16HBE WT et 16HBE KLK5 KO. Le contrôle isotypique IgG1 met en évidence la fluorescence non spécifique. Images prises à l'objectif x63. Les résultats sont représentatifs de 3 expérimentations.*

Dans les cellules 16HBE sauvages ou inactivées pour KLK5, la vimentine n'a pas été détectée tandis que la E-cadhérine et la β-caténine sont fortement exprimées dans ces deux lignées. Aucune différence de marquage de la β-caténine n'a été constatée entre les cellules 16HBE WT et 16HBE KLK5 KO. En revanche le marquage de la E-cadhérine était augmenté dans les cellules 16HBE KLK5 KO par rapport à celui des cellules 16HBE WT (Figure 35). Les cellules BEAS-2B ont en revanche montré une faible expression de la β-caténine et de la E-cadhérine alors que celle de la vimentine est importante dans ces cellules. Ces résultats indiquent que les cellules BEAS-2B ont à la fois des caractéristiques épithéliales et mésenchymateuses alors que les cellules 16HBEWT et KLK5 KO ne présentent que des caractéristiques épithéliales. L'ensemble de ces résultats suggère que les cellules BEAS-2B, 16HBE WT et 16HBE KLK5 KO pourraient être utilisées pour étudier des mécanismes différents impliqués dans le remodelage et la réparation de l'épithélium bronchique.

Partie III :

Différenciation des cellules épithéliales bronchiques en Interface Air-Liquide.

Introduction

Pour étudier plus particulièrement les mécanismes de réparation de l'épithélium bronchique, mettant en jeu successivement la dé-différenciation puis la re-différenciation des cellules épithéliales, il était indispensable de disposer, en plus des lignées précédemment décrites, d'un modèle mimant au mieux l'épithélium pulmonaire humain pseudostratifié. C'est la raison pour laquelle nous avons également étudié des cellules épithéliales bronchiques primaires isolées de tissus recueillis chez des patients opérés pour des tumeurs pulmonaires associées ou non à une BPCO. Les quatre patients étaient âgés de 68 à 78 ans et 3 étaient fumeurs. Parmi les 2 femmes, l'une fumait et avait développé une BPCO (P4) et l'autre n'était ni fumeuse ni atteinte de BPCO (P1). Les 2 hommes étaient fumeurs, l'un était atteint de BPCO (P3) alors que l'autre non (P2).

Ces cellules primaires humaines ont tout d'abord été cultivées en milieu liquide classique puis différenciées en interface air-liquide. En parallèle, les lignées épithéliales BEAS-2B, 16HBE WT et 16HBE KLK5 KO ont également été différenciées en ALI.

1. Etude de l'expression des marqueurs épithéliaux (E-cadhérine, β-caténine) et mésenchymateux (vimentine) des cellules primaires en culture immergée

Les cellules épithéliales bronchiques primaires ont tout d'abord été caractérisées, notamment vis-à-vis de l'expression des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux avant leur différenciation en ALI. L'objectif était d'identifier de potentielles différences entre les cellules issues des patients BPCO+ et BPCO-. De plus, nous avons réalisé des doubles marquages avec la KLK5 pour étudier simultanément l'expression de cette protéase dans ces cellules primaires (Figure 36).

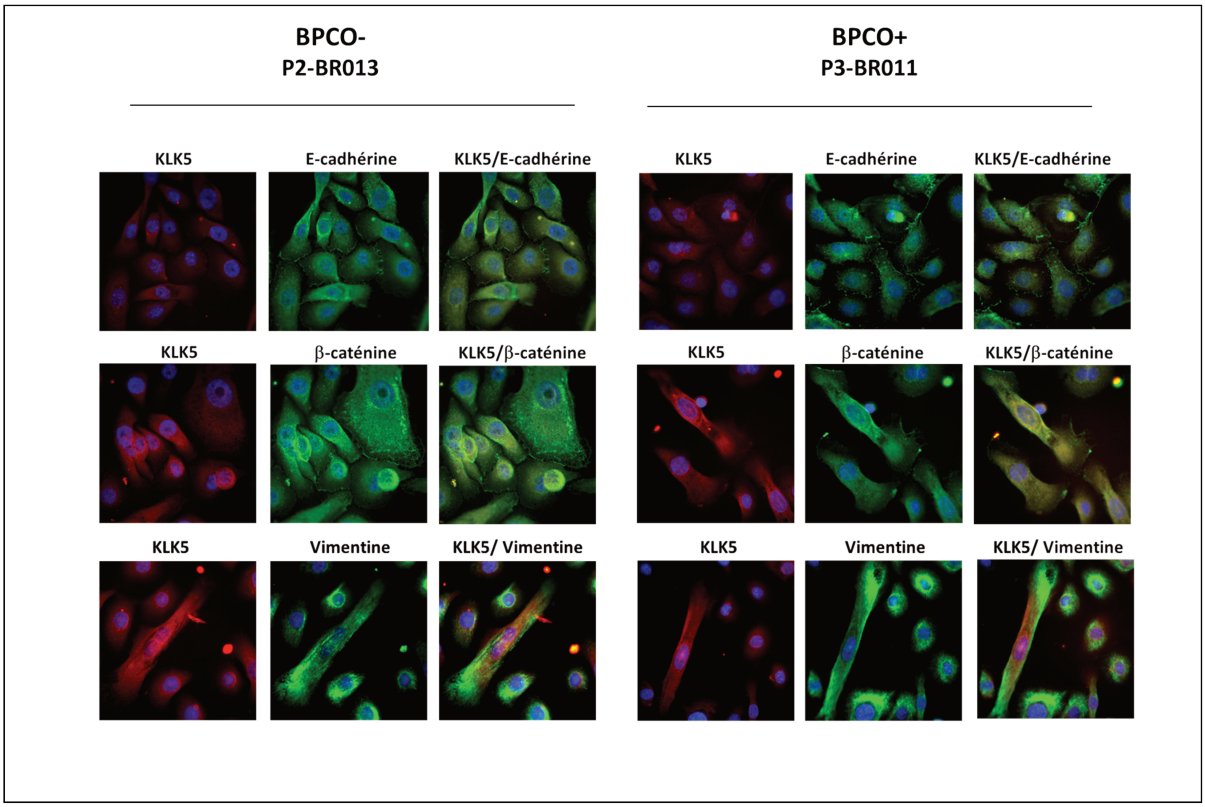


Figure 36 : Expression des marqueurs épithéliaux (E-cadhérine et β-caténine) et mésenchymateux (vimentine) dans les cellules primaires non différenciées. Les résultats ont été obtenus en *immunofluorescence pour la E-cadhérine, la β-caténine, la vimentine (marquage en vert) et pour la KLK5 (marquage en rouge). Un double marquage associe KLK5 et E-cadhérine ou β-caténine ou vimentine. Les résultats des 2 patients présentés sont représentatifs de ceux obtenus pour les 4 patients.*

Les résultats ont montré que l'expression de la KLK5 était similaire chez les deux patients BPCO- et BPCO+. De plus, ces cellules primaires en culture immergée n'ont présenté aucune différence d'expression de la E-cadhérine, de la β-caténine et de la vimentine en fonction de la situation pathologique. La E-cadhérine et la β-caténine sont faiblement exprimées au niveau membranaire, alors que la vimentine intracellulaire est fortement exprimée. La présence réduite des jonctions cellulaires en culture immergée suggère que ces cellules primaires ont besoin d'être re-différenciées pour présenter les caractéristiques épithéliales.

2. Différenciation des cellules épithéliales bronchiques

Pour obtenir un nombre suffisant de cellules afin de les différencier ensuite en épithéliums peudostratifiés, les cellules 16HBE WT, 16HBE KLK5 KO et les cellules primaires ont tout d'abord été cultivées en milieu liquide sur des inserts munis à leur base d'une membrane de polycarbonate comportant des pores de 0,4 µm de diamètre. Ces membranes sont recouvertes de fibronectine et de collagène de type I. Les cellules 16HBE14o- (WT et KLK5 KO)

déposées dans les inserts ont été amplifiées pendant 3 jours et les cellules primaires pendant 5 jours et ceci jusqu'à confluence. Les cellules ont par la suite été différenciées en ALI (*Air Liquid Interface*) pendant 21 à 28 jours pour les 16HBE14o- et de 14 à 21 jours pour les cellules primaires (Figure 37).

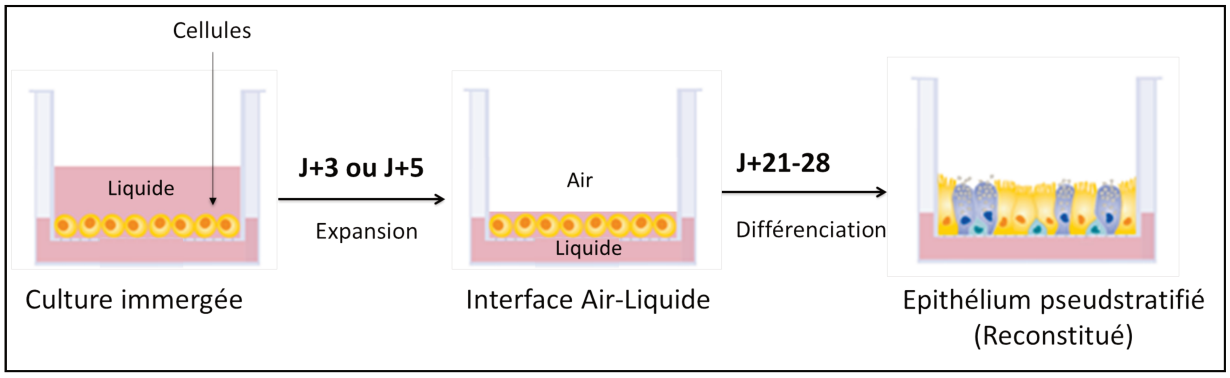


Figure 37 : Différenciation des cellules en Interface Air Liquide (ALI)*. Les cellules ont été mises en culture immergée pendant 3 jours, pour les cellules 16HBE14o- (WT et KLK5 KO), et pendant 5 jours pour les cellules primaires, avant d'atteindre la confluence. La différenciation en ALI a été réalisée pendant 21-28 jours pour les cellules 16HBE14o- et pendant 14-21 jours pour les cellules primaires afin d'obtenir un épithélium pseudostratifié (site web STEMCEL ™ Technologies, 2020)*

2.1. Evaluation de l'intégrité des épithéliums reconstitués.

L'intégrité des épithéliums reconstitués a été étudiée en mesurant la Résistance Trans-Epithéliale (TEER) tout au long de leur différenciation. Nous avons remarqué que le pic de la TEER était atteint autour du 14ème jour de différenciation en ALI.

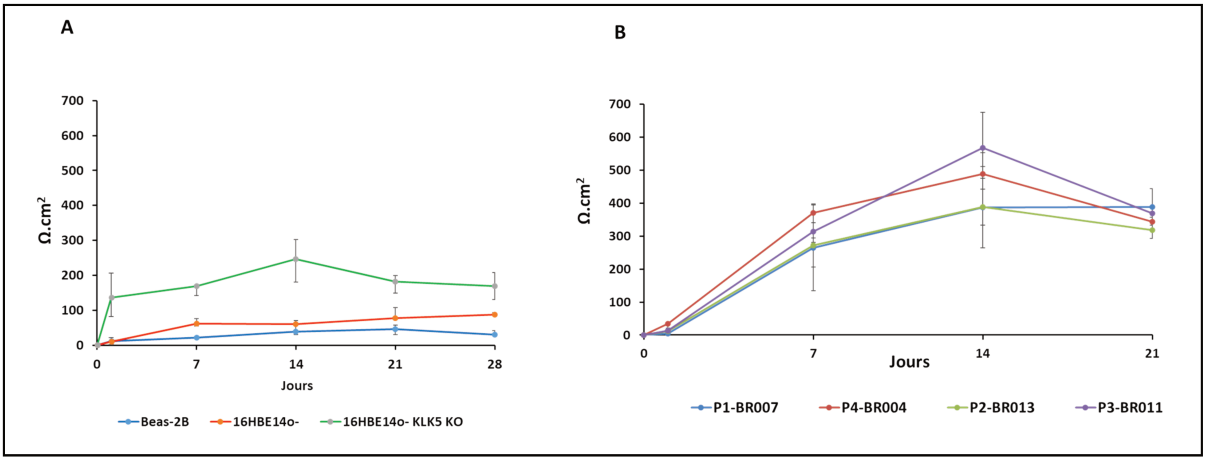


Figure 38 : Mesure de la Résistance Electrique Trans-épithéliale (TEER) des épithéliums reconstitués. *A) Mesure de la TEER à 7, 14, 21, 28 jours de culture en Interface Air Liquide (ALI) des cellules 16HBEWT, 16HBE KLK5 KO et BEAS-2B. B) Mesure de la TEER des cellules primaires (P1-4) à 7, 14, 21 jours de culture en ALI. A chaque temps, les mesures ont été réalisées en duplicat et représentent les médianes ± Q1/Q3 d'au moins 3 expériences indépendantes.*

Nos résultats ont montré qu'au 14ème jour de différenciation, la TEER mesurée pour les cellules BEAS-2B était beaucoup plus faible (39,3 ± 0,82/0,82 Ω.cm2 ; médiane ± Q1/Q3

Ω.cm2) comparée à celle obtenue avec les cellules 16HBE14o-. De plus, l'invalidation de la KLK5 dans les cellules 16HBE14o- a permis d'augmenter la TEER des cellules 16HBE KLK5 KO comparée à celle des cellules 16HBE WT (246,59 ± 56,34/66 Ω.cm^2 vs 60,22 ± 10,10/8,45 Ω.cm^2) (Figure 38A). La TEER des épithéliums des cellules primaires issus des 4 patients était similaire mais plus élevée que celle des cellules 16HBE KLK5 KO (médiane : 246,59 Ω.cm^2 *vs* 387,53 Ω.cm^2 pour le P1, 387,73 pour P2 487,97 Ω.cm^2 pour P4) (Figure 38B). Ces résultats démontrent que les épithéliums reconstitués à partir de cellules primaires ont une meilleure intégrité que ceux obtenus à partir des lignées cellulaires. Cependant, l'invalidation de la KLK5 améliore considérablement l'intégrité de l'épithélium des 16HBE14o-. La faible TEER des BEAS-2B suggère que ces cellules différenciées en ALI forment un épithélium de très mauvaise qualité qui ne constituera donc pas un excellent modèle pour l'étude de la réparation et la différenciation des cellules épithéliales.

2.2. Structure des épithéliums reconstitués

Après différenciation des cellules épithéliales en ALI, la structure des épithéliums obtenus a été analysée par microscopie électronique à balayage (MEB) et à transmission (MET). La MEB permet de visualiser la surface des épithéliums et d'observer notamment la présence des cils et la sécrétion de mucus. La MET réalisée sur des coupes d'environ 60 nm à partir des épithéliums reconstitués permet d'analyser les cils, mais également les jonctions entre les cellules ainsi que l'ultrastructure des cellules.

2.2.1. Etude des cils et du mucus

Les cils sont impliqués dans le maintien des fonctions de l'épithélium bronchique, notamment celui de la clairance muco-ciliaire. Leurs structures et fonctions sont souvent altérées dans la BPCO, c'est pour cette raison que nous avons étudié la capacité de nos modèles cellulaires à générer des cils et à produire du mucus après différenciation en épithélium bronchique. La morphologie et la taille des cils des épithéliums différenciés à partir des lignées cellulaires et des cellules primaires isolées de patients ont été étudiées par MEB (Figure 39).

Nos résultats montrent que les cellules 16HBE14o- (WT et KLK5 KO) sont capables de se différencier en cellules ciliées (C) et en cellules à mucus (M). Cependant, les cellules à mucus et le mucus (m) des cellules 16HBE WT semblent beaucoup plus étalés (trait

discontinu noir) sur des cils tandis que les cellules à mucus et le mucus des épithéliums 16HBE KLK5 sont plus localisés (Figure 39A). Les cils semblent plus nombreux dans l'épithélium obtenu à partir des cellules 16HBE KLK5 KO par rapport à celui obtenu avec les cellules16HBE WT. Cependant, la taille des cils des épithéliums différenciés à partir des cellules 16HBE KLK5 KO était plus courte (0,79 ± 0,10/0,09 µm ; médiane ± Q1/Q3) que celle des cils des épithéliums obtenus des cellules 16HBE WT (1,12 ± 0,19/0,17 µm) (Figure 39B).

Les cellules primaires se différencient également en cellules ciliées (C) et produisent du mucus (m) (Figure 39D). La longueur des cils est similaire entre les cellules de patients. Cependant, ces cils sont beaucoup plus longs (5,28 µm en moyenne) (Figure 39C) que ceux obtenus avec les épithéliums différenciés à partir des lignées cellulaires (Figure 39B, C). Le mucus des épithéliums des patients est globalement localisé au-dessus des cils, suggérant la présence d'une clairance muco-ciliaire (Figure 39D). Ces résultats suggèrent que les épithéliums obtenus à partir des cellules primaires sont des modèles plus pertinents pour l'étude des mécanismes de réparation/différenciation tissulaire.

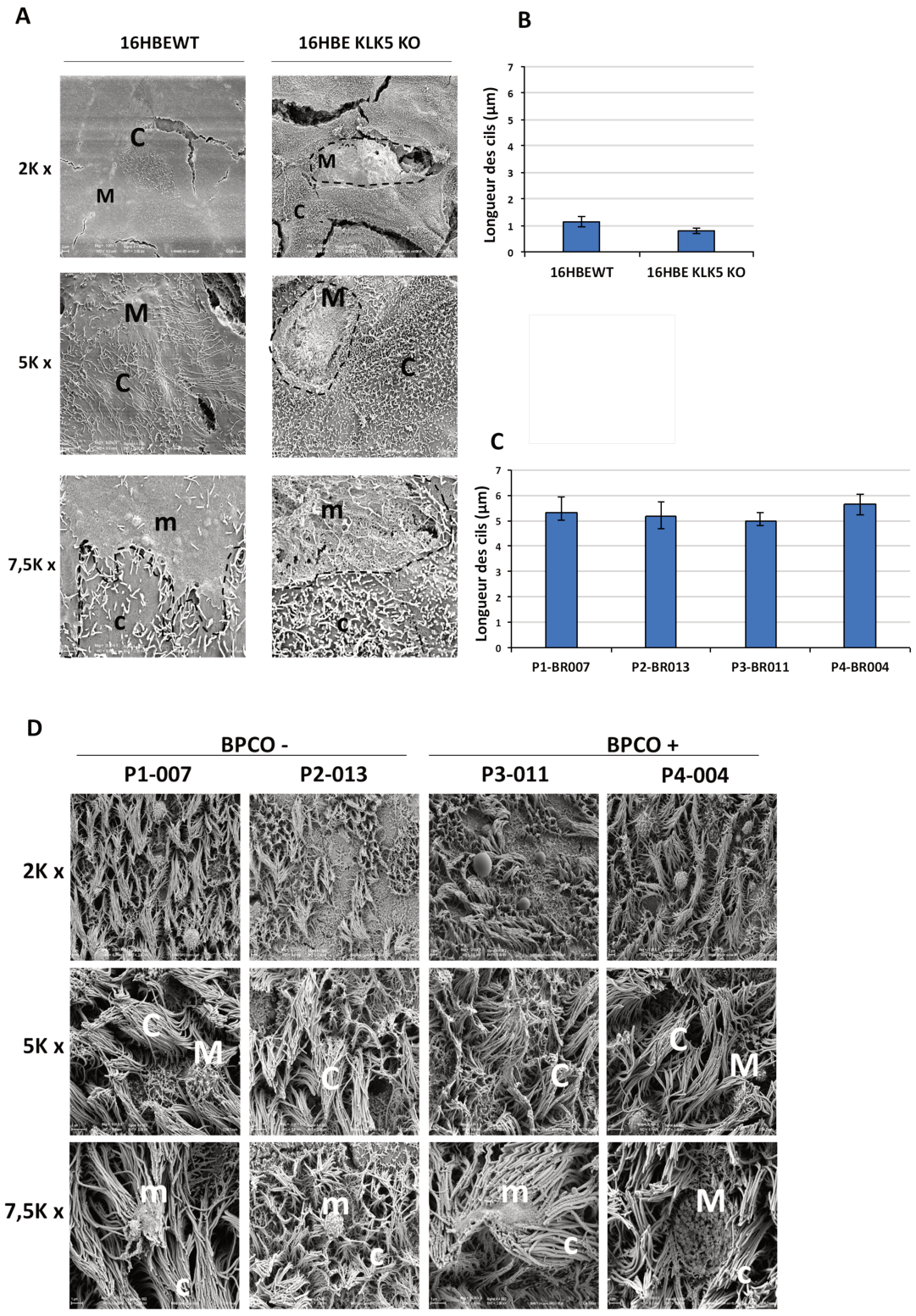


Figure 39 : Etude par microscopie électronique à balayage de la morphologie des cils et du mucus produits par les épithéliums reconstitués à partir des cellules 16HBE WT, 16HBE KLK5 KO et des cellules primaires. *A) Observation des épithéliums obtenus à partir des cellules 16HBE WT, 16HBE KLK5 KO et D) des cellules primaires. Histogrammes représentant la taille des cils (12 cils) des épithéliums obtenus à partir B) des lignées cellulaires et C) des cellules primaires. Les résultats sont représentés avec les médianes et écarts interquartiles (médiane ± Q1/Q3). Cellules à mucus (M), Cellules ciliées (C), mucus (m) et les cils (c) sont indiqués sur les photos.*

2.2.2. Etude de l'épaisseur des épithéliums

Les épaisseurs des épithéliums ont également été mesurés à partir des coupes obtenues en MET. L'épaisseur est un paramètre important lors du remodelage de l'épithélium bronchique, notamment dans le contexte de la BPCO, puisqu'il conduit à la réduction du diamètre des voies aériennes.

Au moins 13 mesures de l'épaisseur ont été réalisées sur toute la longueur de la coupe de chacun des épithéliums reconstitués. Notre étude a montré que l'épithélium obtenu à partir des cellules 16HBE WT est beaucoup plus épais (53,64 ± 1,97/6,47 µm ; médiane ± Q1/Q3) que celui obtenu des cellules 16HBE KLK5 KO (14,13 ± 1,89/0,74 µm) (Figure 40A). Les épithéliums reconstitués à partir des cellules primaires sont également tous plus épais que ceux obtenus à partir des cellules 16HBE KLK5 KO. En effet, les épithéliums obtenus à partir des cellules de patients ont une épaisseur comprise entre 21 µm (P2) et 43 µm (P1) (Figure 40B et C). Les résultats obtenus avec les lignées suggèrent que la KLK5 pourrait être impliquée dans les mécanismes de structuration de l'épithélium bronchique.

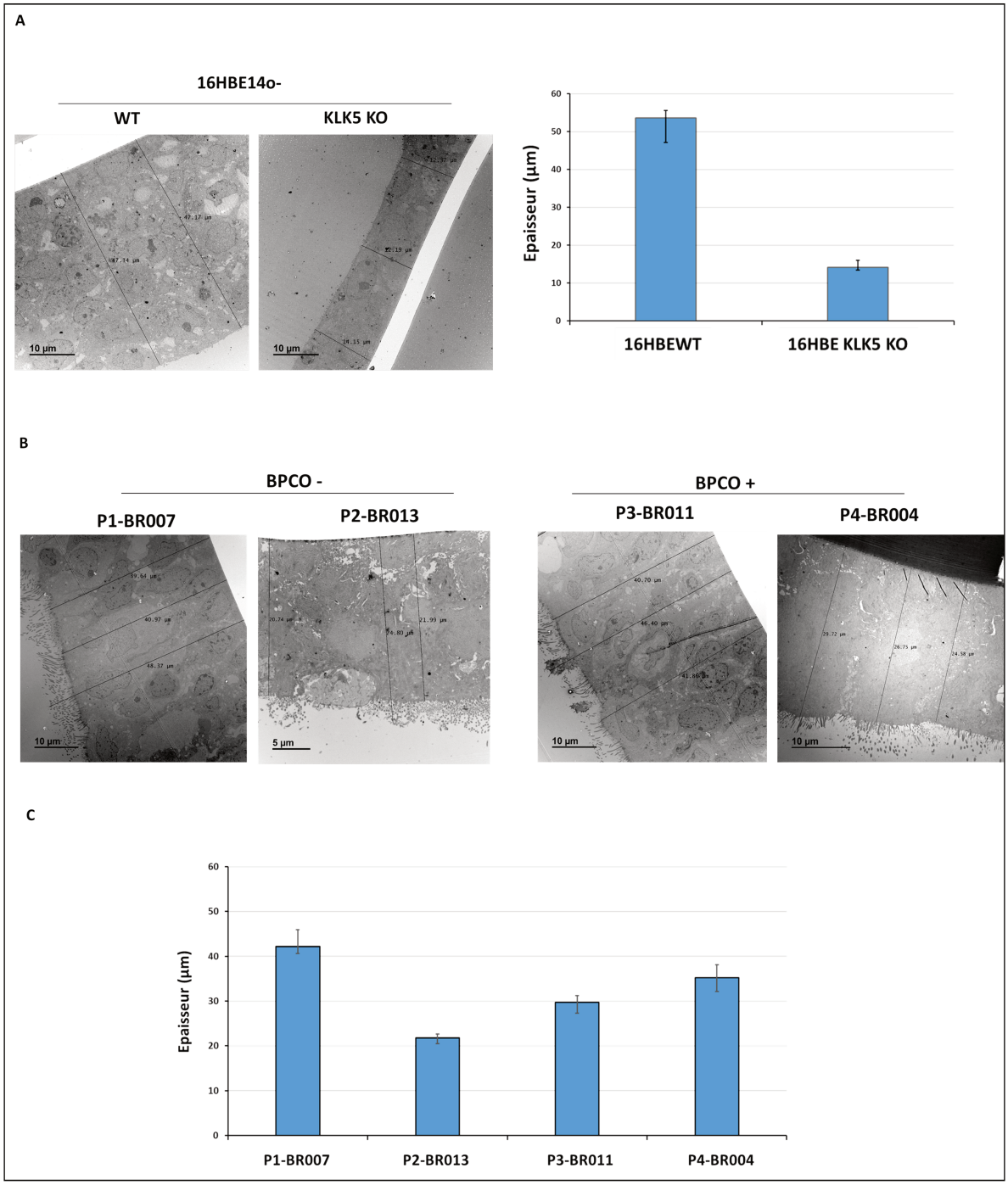


Figure 40 : Analyse, par microscopie électronique à transmission, des épithéliums reconstitués à partir des cellules 16HBE WT, 16HBE KLK5 KO et des cellules primaires. *Coupes d'épithéliums obtenus à partir A) des lignées cellulaires et B) des cellules de patients. C) Mesure de l'épaisseur des épithéliums reconstitués (minimum de 13 mesures) tout au long de la coupe. Les résultats sont exprimés avec des médianes ± Q1/Q3.*

2.2.3. Etude des jonctions desmosomales entre les cellules

Au cours de la réparation d'un épithélium lésé, la formation des jonctions serrées constitue une étape essentielle de la re-différenciation des cellules en épithélium

pseudostratifié, permettant de restaurer l'intégrité et l'imperméabilité de l'épithélium bronchique. C'est pourquoi nous avons regardé par microscopie électronique à transmission les jonctions desmosomales présentes dans les différents épithéliums reconstitués.

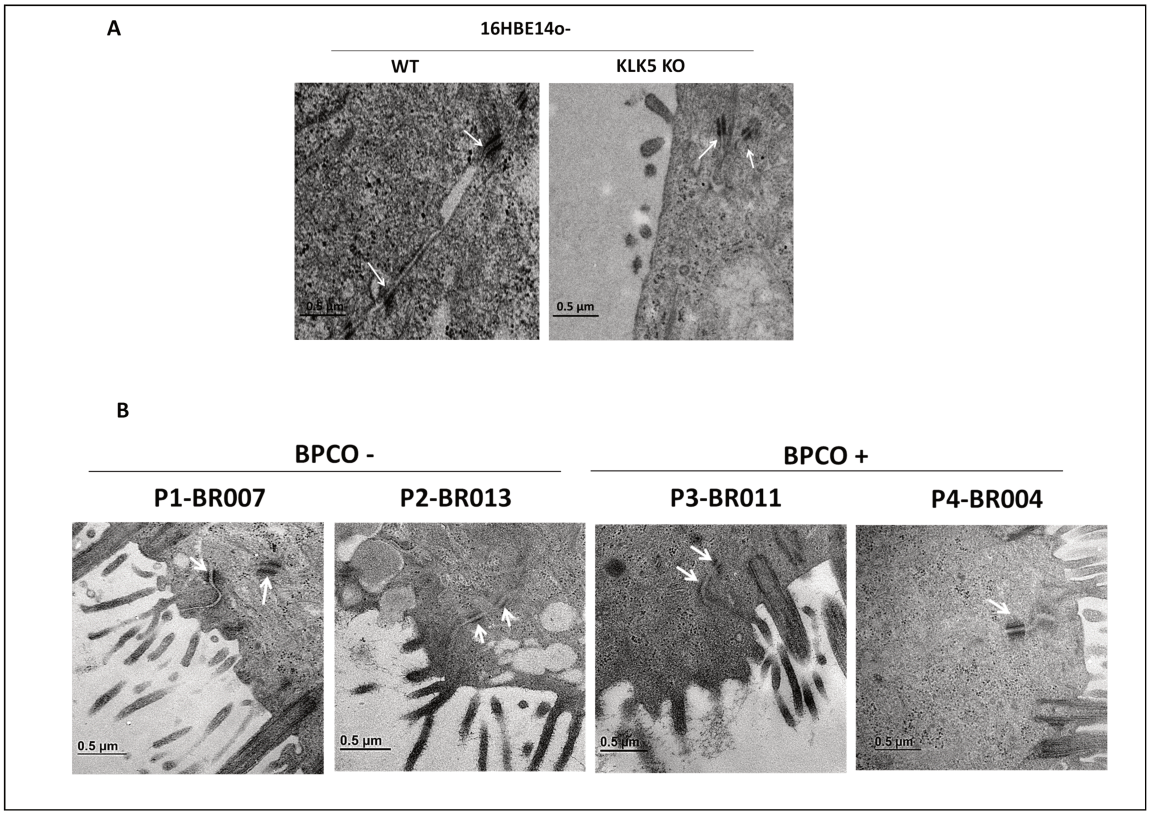


Figure 41 : Etude des jonctions desmosomales dans les épithéliums reconstitués à partir des cellules 16HBE WT, 16HBE KLK5 KO et des cellules primaires, *par microscopie électronique à transmission. A) Epithéliums obtenus à partir des lignées cellulaires et B) des cellules primaires. Les flèches blanches indiquent les desmosomes.*

Nos résultats ont montré la présence des jonctions desmosomales au niveau du pôle apical des épithéliums obtenus à partir des cellules 16HBE WT et 16HBE KLK5 KO (Figure 41A). Les cellules primaires (P1-4) cultivées en ALI forment également des jonctions desmosomales (Figure 41B). L'inactivation de KLK5 dans la lignée 16HBE14o- ne semble donc pas avoir eu d'impact sur la formation des jonctions desmosomales.

L'ensemble de nos résultats démontre que les cellules 16HBE14o-, invalidées ou non pour la KLK5, différenciées ou non différenciées en ALI, constituent un modèle pertinent pour étudier les jonctions épithéliales adhérentes, serrées et desmosomales. De plus, l'invalidation de la KLK5 améliore l'expression de la E-cadhérine. Ces cellules 16HBE KLK5 KO pourraient également être un modèle adapté à l'étude des mécanismes impliquant les protéines des jonctions adhérentes telles que la E-cadhérine et la β-caténine. Cependant,

les cellules primaires différenciées en ALI restent le modèle le plus pertinent pour étudier les mécanismes de remodelage de l'épithélium bronchique dans leur globalité (jonctions, cils, mucus, cellules épithéliales et cellules basales, etc.). Il est en effet indispensable de bien caractériser les cellules primaires de base lesquelles reflètent l'hétérogénéité qui existe selon les patients.

Partie IV :

Implication de la KLK5 exogène et endogène dans les mécanismes de remodelage, de réparation et de différenciation des cellules épithéliales

Kallikrein-related peptidase 5 contributes to the remodeling and repair of bronchial epithelium

Short running title: Lung epithelium remodeling and repair by KLK5

Woodys Lenga Ma Bonda[1,2], Marion Lavergne[1,2], Virginie Vasseur[1,2], Lucie Brisson[1,3], Sébastien Roger[1,4,6], Antoine Legras[1,7], Antoine Guillon[1,2,8], Serge Guyétant[1,9], Pieter S. Hiemstra[10], Mustapha Si-Tahar[1,2], Sophie Iochmann[1,2,5] and Pascale Reverdiau[1,2,5]

1. *Université de Tours, F-37032 Tours, France*
2. *INSERM, Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires (CEPR), UMR 1100, Tours, France*
3. *INSERM, Nutrition, Croissance et Cancer (N2C), UMR 1069, Tours, France*
4. *EA 4245 « Transplantation, Immunologie, Inflammation », F-37032 Tours, France*
5. *Institut Universitaire de Technologie, F-37082 Tours, France*
6. *Institut Universitaire de France, F-75005 Paris, France*
7. *Département de chirurgie thoracique, CHRU de Tours, F-37044 Tours, France*
8. *Service de médecine intensive et réanimation, CHRU de Tours, F-37044 Tours, France*
9. *Département d'anatomie et cytologie pathologiques, Hôpital Trousseau, CHRU de Tours, F-37044 Tours, France*
10. *Department of Pulmonology Leiden University Medical Center, Albinusdreef 2, 2333 ZA, Leiden, The Netherlands*

Corresponding author:

Pascale Reverdiau. Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires/UMR 1100, Faculté de Médecine, Bat 47C, 10 Boulevard Tonnellé, 37032 Tours Cedex.

reverdiau@med.univ-tours.fr

Fax number : +33 (0)2 47 36 60 46

+33 (0)2 47 36 60 67.

Nonstandard abbreviations

AF, alexafluor; ALI, Air-Liquid Interface; BCA, bicinchroninic acid; BSA, bovine serum albumin; CCN, CYR61/CTGF/NOV; Col, collagen; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; CRISPR, clustered regularly interspaced short palindromic repeats; DAPI, 4′,6-diamidino-2-phenylindole; ECM, extracellular matrix; EDTA, *ethylene diamine tetra acetic acid;* EMT, epithelial to mesenchymal transition; ERK, extracellular signal regulated kinase;

FCS, fetal calf serum; FN, fibronectin; HDR, homology directed repair; HRP, horseradish peroxidase; IL, interleukin; *K_i',* apparent inhibition constant; KLK, kallikrein-related peptidase; KSFM, keratinocyte serum free medium, Km, Kinetic parameter; KO, knockout; Lam, laminin; LEKTI, lympho epithelial kazal type inhibitor; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MEK, mitogen-activated protein kinase kinase; MOPS, 3-morpholinopropane-1-sulfonic acid; MTS, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium salt; NL637, northernlights; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PAR, proteinase-activated receptor; PBEC, human primary bronchial epithelial cell; PBS, phosphate buffer saline; PVDF, polyvinylidene difluoride; RAF, Rapidly Accelerated Fibrosarcoma; RTCA, real-time cellular analysis; RT-PCR, reverse transcriptase-polymerase chain reaction; SDS, sodium dodecyl sulfate; SEM, scanning electron microscopy; SERPINS, serine protease inhibitors; SPINK, serine protease inhibitor kazal type; TBST, Tris buffer saline tween; TEER, transepithelial electrical resistance; TEM, transmission electron microscopy; TFPI-2, tissue factor pathway inhibitor 2; TGF-β1, transforming growth factor-β1; TNF, tumor necrosis factor; VT, vitronectin; WT, wild type

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Yves Courty for having introduce us to the fascinating world of KLK. We are grateful to Sonia Georgeault and Julien Burlaud-Gaillard from the IBiSA Electron Microscopy platform of Tours University for scanning and transmission electron microscopy analyses and technical assistance for confocal microscopy. We particularly thank Laura Smales for editing the English text. Studies were supported by the "Ligue Contre le Cancer" and we especially thank the departmental committees of Indre et Loire and Charente Maritime. W. Lenga Ma Bonda was supported by a doctoral fellowship from the University of Tours.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

P. Reverdiau, S. Iochmann conceived the research. W. Lenga Ma Bonda, M. Lavergne and V. Vasseur performed the experiments. V. Vasseur, S. Roger and L. Brisson and conceived and provided expert technical support. Antoine Legras, Antoine Guillon, and S. Guyétant collected and analyzed patient samples. Pieter Hiemstra and Mustapha Si-Tahar conceived, developed, obtained funding and implemented the methodology for obtaining PBECs at the ALI. P. Reverdiau, S. Iochmann, W. Lenga Ma Bonda and M. Lavergne analyzed the data. P. Reverdiau, S. Iochmann and W. Lenga Ma Bonda wrote the article. All authors took part in critical discussion of the article, and read and approved the final manuscript.

ABSTRACT

Inflammation, oxidative stress, and protease/protease inhibitor imbalance with excessive production of proteases are factors associated with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) pathogenesis. In this study, we report for the first time that kallikrein-related peptidase 5 (KLK5) is a crucial protease involved in extracellular matrix (ECM) remodeling and bronchial epithelial repair following injury. First, we showed that KLK5 degrades the basal layer formed by cultured of primary bronchial epithelial cells (PBECs) obtained from COPD or non-COPD patients. Our results also showed that exogenous KLK5 acts differently on BEAS-2B cells already engaged in epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) or on 16HBE 14o- harboring epithelial characteristics. Indeed, by inducing EMT, KLK5 reduced BEAS-2B cell adherence to the ECM. This effect, neutralized by the tissue factor pathway inhibitor 2 (TFPI-2), a kunitz-type serine protease inhibitor, was due to a direct proteolytic activity of KLK5 on E-cadherin, β-catenin, fibronectin, and α5β1 integrins. Thus, KLK5 may strengthen EMT mechanisms and promote the migration of cells by activating the mitogen-activated protein kinase signaling pathway required for this function. In contrast, knockdown of endogenous KLK5 in 16HBE14o- cells, accelerated wound healing repair after injury, and exogenous KLK5 delayed the closure repair. These data suggest that among proteases, KLK5 could play a critical role in airway remodeling events associated with COPD during exposure of the pulmonary epithelium to inhaled irritants or smoking and the inflammation process.

KEYWORDS

Kallikrein-related peptidase 5, epithelial-mesenchymal transition, bronchial remodeling, airway repair, COPD.

INTRODUCTION

Proteases are involved in various inflammatory diseases such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD), which is mainly caused by exposure to inhaled irritants, especially cigarette smoke, that causes inflammation, oxidative stress, and EMT processes. The protease/protease inhibitor imbalance with excessive production of proteases is one of the major factors associated with COPD and emphysema pathogenesis.[1,2,3] Unbalanced proteolysis participates in airway remodeling with the degradation of ECM components and generation of fragments that promote chemotaxis of inflammatory cells also producing proteases.[4] These events, together with EMT and excessive production of mucus, lead

progressive and persistent airflow limitation and breathlessness.[5] Among proteases associated with COPD pathogenesis, Kallikrein (KLKs)-related peptidases are poorly studied and their role in lung inflammatory diseases remains to be elucidated.

KLKs consists of 15 secreted serine proteases synthesized in an inactive pre-proform, and the release of both the signal peptide and the N-terminal propeptide is needed to obtain mature KLKs. Among KLKs, KLK5 has the ability for self-activation and plays a key role in the activation of other KLKs as demonstrated *in vitro* for pro-KLK2, 3, 6, 7, 8, 11, 12, and 14, which in turn could activate pro-KLK5. [6,7,8]

Highly expressed in skin, KLK5 plays a major role in physiological skin desquamation by cleaving desmosomal cadherins (desmoglein 1 and desmocollin 1) and corneodesmosin.[9] In the prostate, KLK5 participates in semen liquefaction via KLK3 activation, which in turn cleaves fibronectin and proteins of the seminal clot, semenogelin I and II, allowing for release of motile spermatozoa.[10,7] The activity of KLK5 is tightly regulated by serpins.[11,12] Moreover, Kazal type inhibitors with Lympho epithelial Kazal type inhibitor (LEKTI-1), LEKTI-2 and Serine Protease Inhibition Kazal Type (*SPINK6*) inhibit KLK5 in the skin.[13,14,15]

Numerous studies showed that KLK5 is mainly upregulated in several cancers and associated with poor prognosis in patients with colorectal, ovarian, breast, and lung cancers.[16,17,18,19,20] A few studies have found KLK5 downregulated in breast and prostate cancer tissue, which suggests a role for KLK5.[21,22] In ovarian cancer, high expression of KLK5 in stromal cells was correlated with prolonged overall survival.[23] *In vitro* data obtained with cancer cell lines silenced or overexpressing KLK5 proposed mechanisms that can explain its role in cancer progression. Using recombinant protein, it was found that, like other KLKs, KLK5 contributes to the release of growth factors as latent TGF-β binding protein 1 which proteolyzed by KLK5.[7,24] Moreover, KLK5 is able to cleave matrix-associated proteins of the CCN family (CYR61/CTGF/NOV), such as CCN3, 4, and 6, known to bind growth factors and to modulate their bioavailability and activity.[25] Plasminogen could be hydrolyzed in plasmin by KLK5, then contributing to the degradation of ECM proteins, activation of metalloproteinases, and activation of proteinase-activated receptor-1 (PAR-1) signaling.[26,27] Stimulation of the PAR-2 signaling pathway by KLK5 supports its pro- tumorous activity.[28,29] Collectively, these studies show that KLK5 may be involved in cancer development, progression and metastasis.

In addition to its involvement in cancer, KLK5 has also been implicated in inflammatory diseases. Aberrant expression or activity of KLK5 is particularly well described in several skin disorders.[30] Indeed, in rosacea, a frequent chronic inflammatory skin disease,

increased expression of KLK5 was reported.[31,32] KLK7 level is also increased, together with the antimicrobial peptide LL-37, which have a proinflammatory activity.[32] KLK5 expression and activity are also increased in Netherton syndrome, a rare and severe skin disease due to mutation of the *SPINK5* gene, encoding LEKTI-1 and leading to LEKTI-1 deficiency. Netherton syndrome is characterized by excessive desquamation and degradation of corneodesmosomes that could be triggered by KLK5 and 7.[31] Overexpression of tumor necrosis factor (TNF-α) and interleukin 8 (IL-8) transcripts was detected in keratinocytes in these patients. Moreover, KLK5 activates the PAR-2 and downstream signaling leading to the release of pro-inflammatory cytokines and chemokines.[33]

Taken together, all these studies suggest a role for KLK5 in the modulation of cell-cell interaction, ECM remodeling, and activation of associated signaling pathways.[34] However, little is known about the role of KLK5 in lung inflammatory diseases, particularly chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Such pathological processes could be initiated after exposure to tobacco smoke, which induces inflammation and epithelial injury and promotes an EMT.[5,35] The current study aimed to investigate the impact of KLK5 on the EMT, cell adhesion, migration, and wound healing in lung epithelial cells using both cell lines and primary bronchial epithelial cell cultures from patients with or without COPD. Our results indicate a critical role of KLK5 in the repair of injured normal bronchial epithelium.

MATERIAL AND METHODS

Human primary bronchial epithelial cells

Human primary bronchial epithelial cells (PBECs) were isolated from tumor-free bronchial tissue obtained from patients with lung tumours associated or not with COPD and operated on the Thoracic Surgery Department of Trousseau Hospital (Tours, France) (Table I). Informed consent was obtained from each patient in *compliance with the Helsinki declaration* and the tissue and cell collections were declared to the French Ministry of Graduate study, Research and Innovation (DC-2008-308, MESRI Ministère de l'enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation). Information on age, sex, histological type of lung cancer, smoking and COPD status were recorded for each patient. Tissue collected were from four lung tumours patients from 68 to 78 year-old (2 with COPD: P3 (male) and P4 (female) and 2 without COPD: P1 (female) and P2 (male)). Three patients were current smoker (P2, P3, and P4). Cells were isolated and cultured at the air-liquid interface (ALI) essentially as described by Amatngalim et al.[36]

Cryopreserved PBECs, always used at the second passage, were thawed and plated on surfaces covered with coating solution in phosphate buffer saline (PBS; 25 ng/mL fibronectin (PromoCell, Merck, Saint Quentin Fallavier, France), 300 ng/mL PureCol® type I collagen (Advanced BioMatrix, CellSystems, Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France), 100 ng/mL bovine serum albumin (BSA; Thermo Fisher Scientific). They were first cultured until 90% confluence in keratinocyte serum free medium (KSFM, Thermo Fisher Scientific) supplemented with 100 U/mL penicillin / 100 µg/mL streptomycin (Thermo Fisher Scientific), 2.4 ng/mL epidermal growth factor (Thermo Fisher Scientific), 25 µg/mL bovine pituitary extract and 1 µM isoproterenol (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2. Then, after trypsinization, 7.10^3 PBECs were plated on Transwell inserts (0.4 µm pore size, 6.5 mm, BD Biosciences) coated with 120 µL of coating solution in PBS. They were cultured in submerged conditions with 100 µL at the apical side and 600 µl at the basal side of PneumaCult™-Expension basal medium (StemCell Technologies, Grenoble, France) containing PneumaCult™-Ex Supplement, 96 ng/mL Hydrocortisone and 100 U/mL penicillin/100 µg/mL streptomycin. The medium was refreshed every 48 h until cells reached confluence in about 5 days. Medium from the apical side was then removed, and 500 µL of PneumaCult™-ALI basal medium with PneumaCult™-ALI Supplement, 48 ng/mL hydrocortisone, 4 µg/mL heparin, and 100 U/mL penicillin/100 µg/mL streptomycin was added to the bottom compartment culture cells at the ALI to allow for differentiation. The medium was renewed every 2 days until a pseudostratified mucociliary epithelium was achieved (3 weeks). After 2 weeks of culture, mucus was removed from the apical side by washing cells for 10 min with 37°C pre-warmed PBS.

Transepithelial electrical resistance (TEER) was measured once a week for 3 weeks with a volt-ohmmeter (EVOM2, World Precision Instruments Ltd, Hertfordshire, UK) according to the manufacturer's instructions. Measurement was performed after adding medium to the apical side of cells and renewing basal medium and incubation at 37°C for 30 min. Blank resistance was measured with a medium in Transwell inserts without cells and subtracted from resistance obtained with cells cultured at the ALI. TEER was expressed in $Ohm.cm^2$ taking into account of the area of the insert.

For some experiments, PBEC trypsinized cells were also seeded on culture plate covered with coating solution and cultured in supplemented complete KSFM medium before treatment.

Cell lines

The virus transformed human bronchial epithelial cell line BEAS-2B was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC® CRL9609™; LGC Promochem, Molsheim, France). The virus transformed human bronchial epithelial cells 16HBE14o- cells were a generous gift from D. Gruenert (University of California, San Francisco, CA, USA). BEAS-2B cells were grown in Hams F-12 nutrient mixture with Glutamax (Gibco) supplemented with 100 µg/mL streptomycin, 100 U/mL penicillin, and 10% endotoxin-free heat-inactivated fetal calf serum. 16HBE14o- cells were cultured in DMEM containing 4.5g/L D-glucose and glutamax supplemented with 100 µg/mL streptomycin, 100 U/mL penicillin, and 10% endotoxin-free heat-inactivated fetal calf serum (FCS). Cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 and were regularly tested for mycoplasma (PlasmoTest mycoplasma detection kit, InvivoGen, Toulouse, France).

Engineering of 16HBE14o- cells with KLK5 knockout

16HBE14o- cells with KLK5 knockout (designated 16HBE KO KLK5) were obtained by the CRISPR/Cas9 system according to the manufacturer's instructions (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany). Briefly, 0.5 10^6 16HBE14o- cells seeded in 6-well culture plate were co-transfected with 2 µg of KLK5 CRISPR/Cas9 KO plasmids (Santa Cruz Biotechnology) and 2 µg of KLK5 homology directed repair (HDR) plasmids by using Ultra-Cruz transfection reagent in medium containing 5 µM L-755,507 (Santa Cruz Biotechnology). L-755,507 is an enhancer of CRISPR-mediated HDR efficiency allowing for insertion of puromycin gene resistance to repair the double-strand breaks generated by the CRISPR-Cas9 system in a 5' exon within the *KLK5* gene. After 72 h, the medium was replaced by a selection medium containing 5 µg/mL puromycin. 16HBE KO KLK5 cell clones were then obtained by 6- to 8-weeks culture in the selection medium and then maintained in the medium containing 2 µg/mL puromycin. KLK5 knockdown was assessed by RT-PCR and immunofluorescence.

Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM)

PBECs differentiated at ALI were treated or not with 0.05 µM recombinant KLK5 (BioTechne R&D Systems, Rennes, France) in 50% BEGM™ (Lonza, Ozyme, Saint Cyr l'Ecole, France) and 50% DMEM/F12 Gibco™ Advanced (Thermo Fisher Scientific) medium added at the apical side of cells for 24 h. Cells were then fixed in 4% paraformaldehyde, 1% glutaraldehyde in 0.15 M phosphate buffer (pH 7.3). After washes in 0.15 M phosphate-

buffer, cells were post-fixed by immersion for 1 h in 2% osmium tetroxide in phosphate-buffer and dehydrated in increasing concentrations of ethanol.

For SEM, samples were gradually dried after incubation in successive ethanol/hexamethyldisilazane solutions with an increasing concentration of hexamethyldisilazane. They were then air-dried overnight and coated with 4 nm carbon, by using a GATAN PECS 682 apparatus (Pleasanton, CA). Preparations were then examined under a Zeiss Ultra plus FEG-SEM scanning-electron microscope (Oberkochen, Germany). The length of cilia was measured over 6 fields per sample (4 measurements per fields).

For TEM, samples were embedded in Epon resin and gradual polymerization was achieved with incubation from 37°C to 60°C. Ultrathin sections, at a thickness of about 50 to 70 nm obtained with an ultramicrotome, were stained for 5 min with 5% uranyl acetate and then for 5 min with 5% lead citrate. They were placed on grids coated with formvar membrane and observed with a JEOL 1011 transmission electron microscope (JEOL, Croissy Sur Seine, France). The thickness of the epithelium (in µm) was measured over the entire length of the preparation (3 measurements per field over 12 to 15 fields).

RNA isolation and RT-PCR

Total RNA was isolated from cells with the Nucleospin® RNA Plus kit (Macherey Nagel, Hoerdt, France) according to the manufacturer's instructions and quantified by using the NanoDrop 2000c spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Reverse transcription was performed, according to the manufacturer's protocol, with 2 µg RNA in a final reaction volume of 20 µL with the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Meylan, France).

cDNA synthesized from 100 ng RNA and 1 ng RNA was used in a PCR reaction specific for KLK5 and 18S respectively and each reaction was performed in duplicate. PCR was carried out in a final reaction volume of 20 µL containing 0.1 µM of each forward and reverse primer and Sybr Premix Ex Taq II (Tli RNase H plus) perfect Real-Time reagent (Takara, Ozyme, Saint Cyr l'Ecole, France). Sequences of primers used were for KLK5, forward primer 5'CGTCCCACTAAAGATGTCAGACC3', KLK5 reverse primer 5'TCAAGCACTGGAGG ACCTTAGG3', 18S, forward primer 5' CGCGGTTCTATTTTGTTGGTTTT 3' and reverse primer 5' TTCGCTCTGGTCCGTCTTG 3'. Real-time PCR was performed with LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Meylan, France) programmed for 45 cycles of two-step cycling for 10 sec at 95°C and 30 sec at 60°C followed

by a melting curve. Relative KLK5 gene expression was determined by the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method with *18S* as the housekeeping gene and a calibrator composed of cDNA from a mixture of cell lines used as the reference condition.

KLK5 activity and protease inhibition

The activity of the mature recombinant KLK5 was verified before each treatment to have a Vmax of at least of 3.0 KLK5 (53 nM) in 0.1M NaH_2PO_4 or buffer alone was added to 100 µM Boc-VPR-AMC fluorogenic substrate (Biotechne R&D Systems) in a total volume of 30 µL in 384-µL well plates (Costar Black 384 well, VWR, Fontenay-sous-Bois, France). In some experiments, inhibition of KLK5 by TFPI-2 was verified by incubating KLK5 with 100 nM TFPI-2 (Biotechne R&D Systems) for 20 min before adding the substrate. Fluorescence emission (λex=380 nm and λem=460 nm) was measured for 15 min by microplate fluorescence reader (Spectra Max Gemini, Molecular Devices, Ouessant, France) and the Vmax was determined. The kinetic parameter *Km* was calculated from the experimental curve v = f [S] by using the non-linear regression analysis routine in GraphPad Prism software. The apparent inhibition constants (*Ki'*) were determined by the Henderson equation: [I]/1–vi/v0 = *Ki'*(v0/vi) + [E]. The *Ki* values were obtained by correcting for the effect of substrate according to Bieth et al., where $Ki = Ki'/(1 + [S]/Km)$.[37]

Western blot analysis

Cells were lyzed with RIPA buffer (Thermo Fischer Scientific) containing protease inhibitor cocktail (Sigma) and 10 µM sodium orthovanadate. Protein concentration was measured using the BCA assay (Pierce™ BCA Protein assay kit, Thermo Fischer Scientific). Proteins (10 µg) in NuPAGE® LDS sample buffer (Thermo Fischer Scientific) containing NuPAGE® reducing agent were separated on NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Protein Gels run by using NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer and transferred to a PVDF membrane after methanol activation. Membranes were then saturated for 1 h at room temperature in TBS buffer (50 mM Tris-HCl and 150 mM NaCl pH 7.6) with 5% non-fat dried milk and incubated, with primary antibodies diluted in TBS buffer with 0.1% Tween-20 (TBST) and 5% non-fat dried milk or 5% BSA. Monoclonal anti-β-actin mouse IgG (clone AC-74, Sigma Aldrich) was used at 1 µg/mL, polyclonal anti KLK5 goat IgG (BioTechne R&D) at 0.1 µg/mL, and polyclonal anti-TFPI-2 rabbit IgG (a generous gift from W. Kisiel, Department of Pathology, University of New Mexico, Health Sciences Centre, Albuquerque, NM, USA) was diluted at

1/3000. Other antibodies used in this study were from an EMT antibody sampler kit, integrin antibody sampler kit and phospho-extracellular signal regulated kinase (ERK) antibody pathway sampler kit (Cell Signaling Technology, Ozyme). The primary antibody was incubated overnight at 4°C (except for the mouse anti-β-actin antibody which was incubated 30 min at room temperature). After TBST washes, membranes were incubated for 1 h with appropriate horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (HRP-labelled anti-mouse IgG (Sigma Aldrich) at 1/80000, HRP-labelled anti-goat IgG (Santa Cruz Biotechnology) and HRP-labelled anti-rabbit IgG (Cell Signaling Technology) at 1/1000. After washing and exposure to enhanced chemiluminescence substrate (Perkin Elmer Biosystems, Courtaboeuf, France), membranes were drained, wrapped in a plastic bag, and exposed to autoradiography film (Sigma-Aldrich) in the dark. β-actin staining was used to verify equal loading of proteins.

Immunofluorescence assay

Cells (5.10^4) were seeded in 8-well chamber slides (Thermo Scientific™ Nunc™ LabTek™, Illkirch, France) in complete medium with 10% FCS for 24 h at 37°C and 5% CO_2. Because KLK5 activity is inhibited by FCS, cells were washed and then exposed to 0.05 µM KLK5, 5 or 10 ng/mL transforming growth factor (TGF-β1; BioTechne R&D Systems), which is an EMT inductor, in a culture medium with 1% nutridoma-SP® for 24, 48, and 72 h before immunofluorescence staining. For other experiments, immunofluorescence assay was performed with PBECs cultured at the ALI and incubated with 0.05 µM recombinant KLK5 in 50% BEGM™/50% DMEM/F12 Gibco™ Advanced medium for 24 h.

Cells were washed with PBS, fixed, and permeabilized in 3.7% paraformaldehyde/0.2% Triton X-100 solution for 10 min at room temperature. After three steps of washing in PBS, slides were blocked with a fresh saturation solution (PBS/BSA 3%) for 30 min, washed again three times in PBS, and then incubated at room temperature with AlexaFluor® 488-labeled mouse IgG1 anti-human vimentin (clone RV202, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) at 1/40, AF® 488-labeled mouse IgG1 anti-human β-catenin (clone 14/β-Catenin, BD Biosciences) at 1/10, AF® 488-labeled mouse IgG1 anti-human E cadherin (clone 67A4, BD Biosciences) at 1/20 or AF® 488-labeled mouse IgG1 k isotype control (clone MOPC-21, 1/10, BD Biosciences) at the appropriate dilution for 1 h at room temperature in the dark. For KLK5 staining, cells were incubated for 1 h with anti-human KLK5 polyclonal goat IgG (BioTechne R&D Systems) or normal goat IgG (BioTechne R&D

Systems) diluted at 1/20 and after three steps of washing with an anti-goat-IgG labeled with AF® 488 (Abcam, Paris, France) or anti goat IgG labelled with NorthernLights™ NL637 (BioTechne R&D Systems) diluted at 1/500 for 1 h. Finally, three step of washing were performed with PBS, and nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Samples were viewed under a fluorescence microscope (Zeiss Axio Vert.A1 with Axiocam 503 Monochrome camera, Carl Zeiss France SAS, Marly le Roi, France) using ZEN software. For some experiments, immunolabellings was also examined using an Olympus FV 500 confocal laser-scanning microscope. An exposure time of 100 ms was selected for E-cadherin and β-catenin immunolabellings and 350 ms for vimentin immunolabelling to compare fluorescence intensities among 16HBE WT, 16HBE KO KLK5 and PBEC. For BEAS-2B cells, E-cadherin and β-catenin fluorescence was recorded after 350 ms exposure time and 22 ms for vimentin. Cell morphology was characterized calculating the circularity index from pictures using image J software ($4.\pi.\text{area/perimeter}^2$) (at least 23 cells per condition). Circularity index values reaching 1 indicate a circular shape while values reaching 0 indicate an elongated shape.

Real-time monitoring of cell adhesion and cell proliferation

The xCELLigence Real-Time Cellular Analysis (RTCA) system (ACEA Biosciences, Agilent, Les Ullis, France) was used for monitoring cell adhesion with an electronic plate (ACEA Biosciences) containing gold microelectrodes incorporated (located) on well bottom. During experiments, cells were maintained at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere, and impedance-based signals were measured and expressed as a Cell Index, arbitrary units providing information on cell adherence.

First, 100 µL of culture medium with 10% FCS was added to each well, and plate were incubated at 37°C for 5 min with impedance measurement every minute (3 measures each time). For adhesion studies, 3.10^4 cells in 100 µL of medium with 10% FCS were then added to each well and incubated for 96 h with data acquisition every 30 min. When treatment had to be applied to cells, cells ($1.5.10^4$ BEAS-2B, 3.10^4 16HBE wild type (WT), or 6.10^4 16HBE KO KLK5 cells) were seeded in 100 µL of medium with 10% FCS for 24 h. This difference in cell number allows reaching a cell index of about 1 for the three cell types after 24 h of adhesion. Cells were then washed with culture medium with 1% nutridoma-SP® and then treated with 1% nutridoma-SP® culture medium containing KLK5 (0.05 µM) or TFPI-2 (0.1 µM) alone or a combination of both KLK5 and TFPI-2 pre-incubated for 30 min. The

measure of impedance was performed every 30 min all over the experiment for 96 h. Three technical replicates were performed for each condition in each experiment. Results are presented as cell index or normalized cell index in case of cell treatment. Cell index was normalized against cell index of untreated cells obtained at 24 h.

ECM protein attachment assay

Adhesion of cells to laminin, vitronectin, fibronectin, and collagen I and IV was studied using the Millicoat^{TM} screening kit (Millipore, Molsheim, France) according to the manufacturer's protocol.

Adherent cells seeded on standard cell culture plates were exposed or not with 0.05 µM KLK5 for 24 h in medium with 1% nutridoma-SP®. Cells were then detached with 2 mM EDTA and 5.10^4 cells in 100 µL complete medium were plated in triplicate on ECM protein-coated wells or on wells coated with BSA used as the control for 1 h at 37°C and 5% CO_2. Cells were then rinsed three times and stained with 0.2% crystal violet. Relative attachment of cells was determined with absorbance readings at 550 nm in a $Thermo_{max}$ Molecular Devices microplate reader. Readings measured with BSA for each cell type were subtracted from ECM protein readings.

Fibronectin and integrin cleavage

KLK5 (0.05 µM) or TFPI-2 (0.1 µM) or both molecules incubated for 30 min were added to 5 µg cellular fibronectin (Sirius Biotech, Genoa, Italy) in 0.1M NaH_2PO_4 (pH8), in a final volume of 40 µl. KLK5, TFPI-2, or both were also incubated with 0.5 µg α6β4 integrin or α5β4 integrin (BioTechne R&D Systems) in 0.1M NaH_2PO_4 (pH8), in a final volume of 15 µl. Proteins were incubated for 5 min to 4 h before analysis on NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Protein Gels (Thermo Fisher Scientific) run using NuPAGE MOPS SDS Running Buffer (Thermo Fisher Scientific). Silver staining was then performed using the SilverQuest^{TM} Silver staining kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions.

Wound healing assay

Wound healing assay was performed by seeding $1.5.10^5$ 16HBE WT or 16HBE KO KLK5 cells into each of the two compartments of the culture insert (iBiDi, Biovalley, Nanterre, France) in order to create a gap in confluent monolayer cells. Cells were incubated in complete medium with 10% FCS at 37°C and 5% CO_2 and after 24h, the insert was removed

and the cell layer was washed with HBSS. KLK5 (0.05 µM) was added to cells in the culture medium with 1% nutridoma-SP® and migration was visualized by time-lapse video microscopy (Nikon Eclipse T equipped with Nikon DS-QIZ camera). Images were captured every 5 min over 72 h at the x10 objective.

Time-lapse single-cell tracking

BEAS-2B, 16HBE WT, or 16HBE KO KLK5 cells (5.10^4) suspended in complete medium with 10% FCS were seeded in a 24-well plates and incubated for 24 h at 37°C and 5% CO_2. Cells were washed with HBSS, and 0.05 µM KLK5 in culture medium with 1% nutridoma-SP® was added. Cells were visualized by time-lapse video microscopy (Nikon Eclipse T with Nikon DS-QIZ camera) as already published with images captured every 5 min over 48 h at the x10 objective.[38] Images were then processed with Fiji software for manual tracking of cells. Positional information of single cells was followed with XY coordinates acquisition allowing determination of trajectory, velocity, and distance covered by cells. For each condition, data were computed from 20 randomly selected cells.

Migration and invasion assay

Cell migration and invasion were assessed using a model based on the Boyden chamber (8 µm pore size, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). For invasion, the insert was coated with a thin layer of 0.8 mg/mL of Matrigel™. BEAS-2B, 16HBE WT, or 16HBE KO KLK5 cells (2.10^5) were trypsinized, suspended in serum-free medium, and seeded on the upper chamber of the inserts. Cells were incubated or not with 0.05 µM KLK5. The lower chamber of a 24-well cell culture plate was filled with the culture medium containing 10% FCS used as chemoattractant. Each condition was performed in duplicate. Plates were incubated for 48 h at 37°C and 5% CO_2. The cells remaining in the insert were removed by aspiration and wiping with cotton swabs. Migrated cells on the lower surface of the filter and adhering to the plate were detached by 0.05% trypsin-0.02% EDTA and counted in a Malassez chamber. The results of migrated cells in the presence of KLK5 were related to those of untreated cells.

Proliferation assay

Adherent cells ($1.5\ 10^4$ BEAS-2B and 3.10^4 16HBE WT or 16HBE KO KLK5) seeded in 96-well plates were exposed or not to 0.05 µM KLK5 for 24 h in medium with 1% nutridoma-SP®. After 24, 48, and 72 h of culture, 20 µL of MTS reagent composed of 3-(4,5-

dimethylthiazol-2-yl)-5-(3 carboxymethoxyphenyl)-2H-tetrazolium and an electron coupling agent, phenazine ethosulphate (CellTiter 96®AQueousOne Solution, Promega, Charbonnières les Bains, France) were added. Cells were incubated for 1 h at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 and optical density was then measured at 490 nm on an a $Thermo_{max}$ Molecular Devices microplate reader. Results were related to those of untreated cells at 24 h.

Statistical analysis

Data are presented as median ± 1st quartile/3rd quartile (Q1-Q3) or as mean ± Standard Error Mean (SEM). Statistical differences between two groups were analyzed by the Mann Whitney test and multiple comparisons by Kruskal-Wallis test and Dunn's test. Tests were performed with GraphPad Prism v6.0 for Mac OS X with P-value < 0.05 considered statistically significant (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 and ****p<0.0001).

RESULTS

KLK 5 degrades the basal side of the bronchial epithelium.

Differentiation of human airway epithelial cells isolated from tissue after lung surgical resection in four lung tumours patients (to with and without COPD), and cultured at the ALI, was qualitatively assessed by SEM and TEM (Figure 1A and B). Quantitative assessment of reconstituted epithelium involved measuring the transepithelial electrical resistance (TEER) at different times (Figure 1C), the cell layer thickness in microns, and the length of cilia (Figure 1D). The thickness of the pseudostratified epithelia reconstructed from samples of COPD patients was greater than epithelia from lung tissue of patients without COPD (mean ± SEM 30.91 ± 0.60 µm and 21.87 ± 3.22 µm). Also, in COPD samples, the amount of mucus was greater (Figure 1B). However, the length of the cilia was similar in the four patients and the TEER measurements were comparable in COPD- and COPD+ patients, approximately 300 to 400 Ohms x cm^2 at 21 days. When 0.05 µM of KLK5 was added on the apical side of the epithelium from COPD or non-COPD patients the barrier remained intact and no leakage of basal content occurred. The junctional integrity of the cell layer, including desmosomes was not altered. The length of cilia was slightly reduced by KLK5 only differentiated PBECs collected from non-COPD patients (p<0.01; Figure 1D). In contrast, the structure of the basal side was altered by the enzyme in cells from COPD donors and the surface of the degraded areas was very extensive with an impact on epithelium thickness (40.81 ± 1.23 µm; Figure

1B). In contrast, KLK5 did not affect ALI-PBEC cultures derived from PEBCs patients without COPD.

KLK 5 reduces E-cadherin and β-catenin expression in human airway epithelial cells

Immunofluorescence microscopy of PBECs collected from COPD patients (P3 and P4) and non-COPD patients (P1 and P2) showed various expression of KLK5 (Figure 2A). We used confocal microscopy, which provides valuable tools for visualization and assessment of adherent junction proteins (E-cadherin and β-catenin), of primary airway epithelial cultures differentiated from samples of COPD and non-COPD patients and cultured at the ALI. E-cadherin and β-catenin adherens junction proteins showed positive staining in epithelial cells of all patients (Figure 2B, C and D). These proteins, particularly expressed in epithelial cells, confirmed the good differentiation of PBEC in ALI. In contrast, no staining was detected for vimentin, a mesenchymal protein, in control cells. When exposed to exogenous KLK5, E-cadherin expression was decreased, most particularly in cells from patients with COPD. The lowest E-cadherin expression was found in epithelial cells of patients with the highest endogenous expression of KLK5. Moreover, E-cadherin and β-catenin were degraded in cells of all patients after treatment with KLK5 treatment.

Impact of exogenous KLK5 by phenotype characteristics of bronchial epithelial cells

Next, we selected relevant cell models to study the contribution of KLK5 to remodeling and bronchial epithelium repair. Showing low level of KLK5, BEAS-2B cells were used to study the effect of exogenous KLK5 on cell functions. In contrast, the 16HBE14o- (16HBE WT) cell line, with high KLK5 level, and therefore more comparable to PBEC, was selected to evaluate the effects of endogenous KLK5 on cells. A CRISPR-Cas9 strategy was used to knock down KLK5 in these 16HBE16 cells (16HBE KO KLK5). The knockdown efficacy was checked by RT-qPCR (Figure 3A): 16HBE KO KLK5 cells exhibited a 99.3% reduction in transcript levels as compared with 16HBE WT cells. Immunofluorescence images showed that KLK5 protein expression was also greatly reduced (Figure 3B), which indicates marked downregulation of KLK5. To verify the phenotype differences of these cell lines, we used immunofluorescence staining of E-cadherin, β-catenin, and vimentin. E-cadherin and β-catenin were highly expressed in 16HBE cells (both WT and KO KLK5), at a higher level than in BEAS-2B cells (Figure 3C). In BEAS-2B cells, E-cadherin was not detected (data not

shown). In contrast, level of the mesenchymal protein vimentin was low in 16HBE cells but higher in BEAS-2B cells.

In the following set of experiments, we used BEAS-2B cells because of their low level of KLK5 and the partial absence of epithelial characteristics to assess the effect of exogenous KLK5 on cell detachment and migration after epithelium aggression. In addition, cells with a high level of KLK5 (16HBE WT) together with epithelial characteristics were used to study the impact of knocking down KLK5 on cell properties. First, to assess the effect of exogenous KLK5 on the two selected models of bronchial epithelial cells, 0.05 µM of the enzyme was added, for 0, 24, and 48 h, to the culture medium not containing FCS but rather 1% nutridoma to maintain KLK5 activity. The addition of KLK5 to BEAS-2B cells had little effect on the expression of β-catenin, which was weakly expressed by these cells (Figure 3C). However, immunostaining showed some intercellular gaps, and only some focal points of fluorescence were detected at 24 and 48 h. In contrast, fluorescence observed with anti-vimentin antibody revealed a mesenchymal phenotype for BEAS-2B cells after 24 h of contact with KLK5, with disruption of cell-cell attachment. This morphological aspect is comparable to that observed in the presence of TGF-β1, a known inducer of EMT. A significant reduction in the circularity mean index was shown in BEAS-2B cells treated with KLK5 for 24 h (0.16 ± 0.01; $p < 0.001$) compared to untreated cells (0.35 ± 0.02). This data was similar to that obtained with TGF-β1 (0.20 ± 0.02 versus 0.47 ± 0.02 for untreated cells, $p< 0.001$). Western blots analysis revealed that β-catenin and vimentin could be cleaved when KLK5 was added to BEAS-2B cells, with no effect observed with TGF-β1 alone (Figure 3D and E). Indeed the expression of E-cadherin and β-catenin and morphological characteristics of 16HBE WT epithelial cells remained unchanged over time. Similarly, the expression of vimentin, which was low at the basal state, was not altered. Cleavage products were detected for β-catenin in 16HBE WT cells incubated with KLK5, but its proteolytic profile was unchanged with or without KLK5.

Effects of KLK5 expression and knockdown on bronchial epithelial cell adhesion

We used the xCELLigence Real-Time Cell Analysis (RTCA) system to study the early adhesion of bronchial cells BEAS-2B, 16HBE WT, and 16HBE KO KLK5 depending on their endogenous production of KLK5. BEAS-2B cells, which weakly express KLK5, adhered rapidly, as demonstrated by an increase in cell index up to 4 between 0 and 24 h

(Figure 4A). For 16HBE WT epithelial cells, a very different adhesion capacity was observed depending on whether the cells expressed KLK5 or not. Indeed, after a delay of 5 h, 16HBE WT cells adhered to the support and the cell index reached a value of 2 after 24 h. In contrast, 16HBE WT cells with KLK5 knockdown showed a significantly reduced cell attachment, with a cell index lower (<1) after 24 h (Figure 4A). Owing to the different adhesion capacities of every cell type, the number of cells plated was adapted in order to obtain a cell index = 1 after 24 h for all the cells. After this normalization, the impact of exogenous KLK5 on cell adhesion was studied for up to 96 h. For BEAS-2B cells, the addition of exogenous KLK5 significantly slowed down cell adhesion for 72 h (Figure 4B). To verify that the enzyme was indeed directly responsible for this effect, TFPI-2, an inhibitor of KLK5, was added to the culture medium. We evaluated the activity of KLK5 against a fluorogenic substrate with increasing TFPI-2 concentration. In BEAS-2B cells, TFPI-2 potently inhibited KLK5, with *Ki'* value 5.1 nM and *Ki* value 3.77 nM. When a 1:2 ratio of inhibitor to enzyme was tested, 90% of the inhibition of KLK5 activity was obtained. TFPI-2 significantly neutralized the cell detachment induced by KLK5 ($p < 0.001$) and cell adhesion evaluated in real-time was then similar to that of the control cells as with TFPI-2 alone (Figure 4B). In contrast, the addition of exogenous KLK5 to 16HBE WT cells knockdown for KLK5 only slightly decreased attachment of cells at 24 h ($p < 0.1$), and did not significantly modify cell attachment at 48 and 72 h (Figure 4C). After this period, the cell index was 2 after 96 h for 16HBE KO KLK5 cells with or without KLK5 added. Moreover, the cell index was 4 after 96 h in 16HBE cells strongly expressing KLK5. Despite a lower cell attachment of 16HBE KO KLK5 cells to plates, the impedance variation increased rapidly after 80 h owing to a strong proliferation rate of these cells, as demonstrated by MTS assay (Figure 4D). However, the apoptosis rate of WT and KO KLK5 cells was similar (data are not shown).

KLK5 reduces BEAS-2B cell adherence by proteolytic activity targeting ECM proteins and integrins.

To analyze the impact of KLK5 on the behavior of BEAS-2B cells with RTCA, we tested the adherence ability of cells to various ECM proteins (Figure 5A). When KLK5 was added to BEAS-2B cells, adherence to vitronectin, laminin, collagen I, and IV was slightly decreased, whereas that to cellular fibronectin was significantly decreased ($p<0.001$, Mann Whitney test) (Figure 5B). When cellular fibronectin was incubated with KLK5, proteolytic products of 105 kDa and 40 kDa were visualized, with increasing intensity from 5- to 240-min exposure.

At the same time, the cleavage product of approximately 85 kDa was reduced. TFPI-2, a kunitz type serine protease inhibitor, was able to reduce the cleavage of fibronectin by KLK5. The effect of KLK5 on integrins of BEAS-2B cells was evaluated after cell incubation with 0.05 μM KLK5. Western blot analysis revealed that β4 was cleaved by KLK5, whereas α5, β3, and β5 integrins showed only a reduced intensity of bands (Figure 5C). The proteolytic activity of KLK5 on α5β1 integrin, a fibronectin receptor, and on α4β6 integrin (receptor of laminin) was verified after incubation of KLK5 with purified α5β1 and α6β4 integrins during 5, 30, and 240 min (Figure 5D). For both integrins, proteolytic products were detected particularly after 240 min of incubation with KLK5 and this effect was abolished by TFPI-2.

Exogenous KLK5 promotes migration of bronchial epithelial cells

Because KLK5 plays a role in the induction of EMT in BEAS-2B cells, we investigated whether exogenous stimulation with KLK5 could modulate cell migration. Single cell migration was analyzed by time-lapse video microscopy. Cell tracking results showed that KLK5 significantly increased BEAS-2B cell velocity and total distance of migration ($p < 0.001$) (Figure 6A). These data were confirmed by using a modified Boyden chamber assay that demonstrated greater migratory ability of BEAS-2B cells incubated with KLK5 than control cells. In contrast, the invasion ability of cells was not modified by the addition of KLK5, as shown by Matrigel™ assay, which mimics the basement membrane (Figure 6B). Analysis of the MAPKinase cell signaling pathway showed a rapid decrease in phosphorylated (P)-Raf (in 5 min) and an increase in MEK-1/2 and P-ERK-1/2, particularly when KLK5 was added to cells for 1 and 2 h (Figure 6C). Moreover, TFPI-2 modulated the activation of the MAPK signaling pathway induced by exogenous KLK5.

Knockdown of KLK5 promotes epithelial cell migration and wound healing repair

Cell migration is required to close the wound of the epithelial cell layer and restore the disrupted surface. After the injury of the 16HBE WT layer, it took 20 h to observe the complete closure of the wound (Figure 7A). The addition of KLK5 had no effect on closing time despite a significant increase in velocity and distance traveled by cells, as demonstrated by videomicroscopy (Figure 7B). However, when KLK5 was absent, the velocity of the 16HBE KO KLK5 cells significantly increased ($p < 0.0001$, Mann Whitney test), and the total distance traveled allowed the cells to repair the wound in 4 to 6 h. When exogenous KLK5

was added to 16HBE KO KLK5 cells, the closure was delayed with 20 h required, as observed with the 16HBE WT cells ($p < 0.01$, Mann Whitney test) (Figure 7A).

DISCUSSION

We focused our study on the impact of KLK5 and provide evidence that this serine protease may be involved in bronchial epithelium remodeling and repair associated with lung injury. In this study, polarized and differentiated bronchial epithelial cell cultures were firstly established from lung samples of COPD and non-COPD patients to evaluate the effects of KLK5. As previously described, this model mimics pseudostratified epithelium including ciliated, mucin-secreting cells, and basal cells.[39] These basal epithelial cells, considered to be progenitor cells for their ability to self-renew and differentiate to pseudostratified mucociliary epithelial layer in response to epithelial damage, play an important role in cell adhesion. The structure of reconstituted epithelia observed by electron microscopy showed a slightly larger cell layer thickness and mucus hypersecretion with cells from COPD patients versus from non-COPD patients. Although donor number was limited, it is important to note that this observation is consistent with that observed in patients in vivo.[40] With this differentiated cell model, exogenous KLK5 had no effect on the apical surface but could disrupt the basal side, with large disrupted areas and gaps, especially in epithelia obtained from COPD patients. These results could be explained by the disruption of airway adherens junctions due to proteolysis caused by exogenously added KLK5, and similar to that observed previously with cigarette smoke.[41] In this regard, another study observed an increase in epithelial permeability associated with a reduced E-cadherin and β-catenin content in PEBC isolated from bronchial brushings of COPD patients that were exposed to cigarette smoke.[42] In our study, in cells incubated with KLK5, E-cadherin and β-catenin protein expression was decreased, with images suggesting degradation of these proteins using both cells differentiated from samples of COPD or non-COPD patients. Some studies showed that remodeling of the airways and lung parenchyma in patients is heterogeneous.[43] However, inter-donor variation in levels of KLK5 in epithelial cells from COPD or non-COPD samples,
varied among patients. Moreover, subcultures of these primary cells are limited to few passages only

To verify the hypothesis suggested by our observations with samples from four patients, we selected the two epithelial cell lines, BEAS-2B and 16HBE14o-, to analyze the impact of exogenous and endogenous KLK5 on cell functions. BEAS-2B cells expressing a

low level of KLK5 have been useful to evaluate the impact of exogenous KLK5. Our results also showed that BEAS-2B cells are partially engaged in the EMT process, with a low expression of the epithelial markers E-cadherin and β-catenin and a strong expression of vimentin, a mesenchymal marker. As previously demonstrated, the loss of E-cadherin is a well-known hallmark of EMT, and this process has been described to play a role in COPD.[44,45,46] In contrast, 16HBE WT cells expressed a high level of endogenous KLK5 which we deleted by using a CRISPR-Cas9 strategy. Also, both cell lines not only exhibited morphological characteristics of epithelial cells but also expressed E-cadherin and β-catenin proteins. Therefore, these cells have been used to evaluate the effect of endogenous KLK5 on cell layer repair.

With the BEAS-2B model, we confirmed that KLK5 may induce an EMT-like process, as observed with TGF-β1. Furthermore, in contrast to TGF-β1, KLK5 cleaved β-catenin and vimentin. Despite the conserved morphological aspect of the epithelial cells 16HBE, KLK5 also degraded E-cadherin and β-catenin in these cells. There is much evidence that the E-cadherin, an essential component of adherens junctions, is a key actor of cell-cell interaction and KLK5 may play an important role in this process. In skin desquamation, KLK5 is already known to proteolyze desmosomal cadherins (desmoglein 1 and desmocollin 1) and corneodesmosin which are proteins of cellular junctions between corneocytes.[9] Serine proteases other than KLK5, as well as metalloproteases, are known to proteolyze E-cadherin and thus affect the integrity of adherens junctions.[3,47] When the epithelium is disrupted following injury, massively recruited polymorphonuclear neutrophils secrete a large amount of neutrophil elastase which cleaves E-cadherin and alters the cell-cell adhesion function.[2] The loss and degradation of cadherin reduces the cell-cell adhesion, a crucial early step in the EMT process, and may act in concert with other triggers to induce EMT. Thus, the KLK5-dependent destabilization of E-cadherin, linked to β-catenin by its cytoplasmic domain, could break the association between these protein complexes and the actin cytoskeleton, necessary for strong cell-cell adhesion.

To further confirm that the KLK5-altered adherens junctions and simultaneously integrins breakdown, may perturb cell attachment, we evaluated the adhesion capacity of epithelial cells. Exogenous KLK5 was able to affect BEAS-2B cell attachment and the KLK5 activity was inhibited by TFPI-2, with neutralization of its effect on cells. Similarly, knockdown of endogenous KLK5 reduced the adhesion of 16HBE KO KLK5 cells as compared with 16HBE WT cells. No supplementary effect was observed with the addition of

exogenous KLK5. However, the attachment of KO KLK5 epithelial cells was ameliorated over time because of the increase in proliferation ability of these cells as compared with WT cells. The apoptosis rate of the two cell types was equivalent (data not shown), not affecting the cell attachment.

The involvement of integrins in cell-matrix interaction is also crucial in the adhesion process. Therefore, we investigated the attachment of BEAS-2B cells to various ECM proteins and demonstrated that KLK5 considerably reduced the cell adhesion to fibronectin and, to a lesser extent, to laminin. This effect, inhibited by TFPI-2, was due to the proteolytic activity of KLK5 to fibronectin, as shown by the detection of cleavage fragments obtained when cellular fibronectin was incubated with KLK5. Recently Kryza et al. showed that KLK12, another kallikrein-related peptidase, efficiently cleaved the fibronectin of ECM, leading to an increase in endothelial cell migration and a pro-angiogenic effect.[48] In addition, ECM components are frequently modified in COPD, particularly in severe disease.[47]

Moreover, we demonstrated that KLK5 was able to proteolyze the α5β1 cell receptor to fibronectin. Some authors have reported that excessive inflammation leads to increased fibronectin proteolysis and poor tissue repair.[5,48] When fibronectin fragments are generated, cell adhesion, spreading, and actin extensions are decreased. Our study demonstrated a susceptibility to fibronectin proteolysis inducing loss of the cell adhesion. In addition, we also observed less adhesion of BEAS-2B cells to laminin, which could be explained by the cleavage by KLK5 of α6β4 integrin receptor to laminin. Also, KLK5 acted on tissue remodeling via direct proteolytic action on structural components of ECM as on fibronectin and the integrins α5β1 and α6β4. Indeed, TFPI-2, a serine protease inhibitor consisting of 3 Kunitz-type domains, neutralized the effect of KLK5 on BEAS-2B cell adhesion, restoring cell attachment. TFPI-2 limited the cleavage of fibronectin, α5β1, and α6β4 integrins mediated by KLK5.

Previous studies have shown that other inhibitors such as LEKTI-1, 2, and SPINK6, modulate the KLK5 activity. Also, in the skin, mutation in the *SPINK5* gene, coding for LEKTI-1, causes Netherton syndrome.[31,32] KLK5 is also known to be strongly inhibited by various SERPINS.[11,12] Our data suggest that TFPI-2, known to also inhibit a large variety of proteases,[49,50] may be a novel, natural, strong inhibitor of KLK5, as demonstrated by Ki values of 3.8 nM. *TFPI-2*, known to be a tumor suppressor gene because of its ability to inhibit lung tumor growth,[51,52,53] could also contribute to the proteases/antiproteases balance in the lung and participate in bronchial epithelial remodeling and repair when injured.

Epithelial cells that adhere too strongly to their neighbors or to matrix do not migrate. To investigate the impact of the loss of cell-cell contacts and cell-ECM interactions on BEAS-2B cell migration, we used migration assays for wound healing and the modified Boyden chamber. The total distance traveled by BEAS-2B cells and their velocity evaluated in real-time by using videomicroscopy showed that exogenous KLK5 significantly increased the cell migration engaged in EMT. KLK5-induced migration process was associated with activation of the MAPK signaling pathway. This pathway is often activated after exposure to cigarette smoke and oxidant stress and is also implicated in cell migration.[5] In our study, KLK5 did not affect the invasion of BEAS-2B non-cancerous cells, in contrast to what was observed in ovarian cancer cells transfected to overexpress KLK4, 5, 6, and 7. These cells showed a higher capacity for invasion than control cells, with, in parallel, a decrease in adhesion to fibronectin and vitronectin and a decrease in expression of $\alpha5\beta1$ and $\alpha v\beta3$ integrins.[54,55] Moreover, these integrins were down regulated in melanoma cells modulating cell adhesion.[56] Together these data demonstrate that KLK5 could exert opposite effects depending on cancerous or non-cancerous cell characteristics.

Our data also suggest a different cell behavior depending on the amount of endogenous KLK5. Tracking of 16HBE WT epithelial cells, expressing a high level of endogenous KLK5, showed low cellular motility and the cells did not migrate in a Boyden chamber model. A high level of KLK5 in epithelial cells could lead to cell immobilization to promote differentiation and reconstitution of epithelium integrity. However, the invalidation of intracellular KLK5 increased cell migration, with a total distance traveled significantly higher than for 16HBE WT cells. Indeed, a closure of the wound healing occurred in 4 h for 16HBE KO KLK5 cells but 20 h for 16HBE WT. The addition of exogenous KLK5 to 16HBE KO KLK5 reduced migration and slowed wound healing repair.

In our study, we provide evidence that KLK5 may act differently on cells already engaged in EMT and according to their level of KLK5 expression. In addition, a dual role was observed in epithelial remodeling and repair. This role includes an implication in the EMT process observed in COPD, in which the polarized epithelial cell tightly associated with its neighbors acquires migratory capacities by losing the epithelial phenotype. In COPD, inflammatory cells such as neutrophils, monocytes, and lymphocytes, are recruited, especially by exposure to cigarette smoke. Among these cells, neutrophils stimulated by various inflammatory cytokines or lipopolysaccharide could produce KLK5.[57] As we previously demonstrated, epithelial cells are also able to produce and secrete KLK5 in response to

seasonal influenza viruses.[58] KLK5 secreted into the inflamed site may, by self-activation, initiate the KLK cascade with activation of other KLKs. KLK5 may also induce activation of metalloproteinases, LL37, and PAR-1 signaling, which increases the release of pro-inflammatory cytokines and chemokines.[33] For example, stimulation of bronchial epithelial cells by cigarette smoke increases the expression of LL-37.[59] By cleavage of the cathelicidin precursor, KLK5 could increase the generation of LL-37, which is a chemoattractant for inflammatory cells such as neutrophils, monocytes, and lymphocytes, at the site of injury.[60] By a direct proteolytic activity, KLK5 would cleave junction proteins and integrins in favour of EMT but also degrade ECM components, contributing to the release of other growth factors. Indeed, we previously showed that KLK5 is able to cleave the matrix components CCN3, 4, and 6, known to bind growth factors, and to modulate their bioavailability and activity.[25]

In conclusion, among proteases that are implicated in the pathogenesis of COPD, KLK5 could play a crucial role in epithelial remodeling, including the EMT, cell adhesion, and migration. There is evidence that the barrier integrity of the airway in inflammatory diseases such as COPD may be damaged and that KLK5 could be implicated in epithelial repair. Understanding molecular mechanisms that drive remodeling and repair of the bronchial epithelium is needed for future progress in COPD treatment.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Yves Courty for having introduce us to the fascinating world of KLK. We are grateful to Sonia Georgeault and Julien Burlaud-Gaillard from the IBiSA Electron Microscopy platform of Tours University for scanning and transmission electron microscopy analyses and technical assistance for confocal microscopy. We particularly thank Laura Smales for editing the English text. Studies were supported by the “Ligue Contre le Cancer” and we especially thank the departmental committees of Indre et Loire and Charente Maritime. W. Lenga Ma Bonda was supported by a doctoral fellowship from the University of Tours.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

P. Reverdiau, S. Iochmann conceived the research. W. Lenga Ma Bonda, M. Lavergne and V. Vasseur performed the experiments. S. Roger and L. Brisson and conceived and provided expert technical support. Antoine Legras, Antoine Guillon, and S. Guyétant collected and analyzed patient samples. Pieter Hiemstra and Mustapha Si-Tahar conceived, developed, obtained funding and implemented the methodology for obtaining PBECs at the ALI. P. Reverdiau, S. Iochmann, W. Lenga Ma Bonda and M. Lavergne analyzed the data. P. Reverdiau, S. Iochmann and W. Lenga Ma Bonda wrote the article. All authors took part in critical discussion of the article, and read and approved the final manuscript.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1: **Impact of KLK5 on the ultrastructure of the human airway epithelium.** Human bronchial primary epithelial cells were differentiated and cultured at the air-liquid interface (ALI) for 21 days. A) Scanning electron microscopy. M indicates mucus. Scale bars 10 and 1 μm B) Transmission electron microscopy. Black arrows indicate the degraded areas after KLK5 treatment (0.05 μM) and white arrows showed desmosomes; C indicates cilia. Scale bars 10, 5, 1 and 0.2 μm C) Trans-epithelial electrical resistance measurements (TEER) at 7,14 and 21 days of culture at the ALI. D) Length of cilia measured from at least 24 cilia (in μm). Data were analyzed by the Mann Whitney test; **$p<0.01$. Micrographs are for epithelial cells of one representative COPD patient (P3) and non-COPD patient (P2). COPD, chronic obstructive pulmonary disease.

FIGURE 2: **E-cadherin, β-catenin, and vimentin staining in differentiated primary bronchial epithelial cells from patients with or without COPD**. A) Primary bronchial epithelial cells (PBECs) in monolayer were stained for KLK5 (immunofluorescence) overlaid with DAPI nuclear stain. B), C), and D) Cells were grown for mucociliary differentiation at the ALI. Control cells or cells treated with 0.05 μM KLK5 for 24 h were stained for E-cadherin, β-catenin, and Vimentin, respectively. Representative immunofluorescence images from confocal z-stacks overlaid with DAPI nuclear stain. Scale bars 20 μm.

FIGURE 3: **Recombinant KLK5 alters epithelial E-cadherin, b-catenin, and vimentin content in differentiated primary bronchia.** A) Relative quantification of *KLK5* mRNA

level in BEAS-2B, 16HBE WT, and 16HBE KO KLK5 epithelial cells. Data are median (Q1-Q3) from 7 independent experiments performed in duplicate and were analyzed by the Mann Whitney test. ***p<0.001. Representative immunofluorescence images B) KLK5 expression in the three epithelial cell types. C) BEAS-2B and 16HBE wild-type (WT) epithelial cells exposed to 0.05 μM KLK5 for 0, 6, 24, and 48 h; and D) BEAS-2B and 16HBE cells treated with an inducer of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), TGF-β1, at 5 and 10 ng/mL, respectively, for the indicated times. For C) and D) Cells were fixed and stained with Alexa Fluor 488–antibody against E-cadherin, β-catenin, or vimentin (green). Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Untreated cells were used the control (time 0). Experiments were repeated at least twice with similar observations. Scale bars 20 μm. E) Western blot analysis β-catenin and vimentin expression in BEAS-2B cells incubated with KLK5 or TGF-β1, or both, and E-cadherin and β-catenin expression in 16HBE WT cells treated with KLK5. β-actin expression was used for protein loading. Results are representative of three immunostainings.

FIGURE 4: Real-time quantification of BEAS-2B and 16HBE cell adhesion and proliferation in response to KLK5 treatment. A) BEAS-2B and 16HBE WT or 16HBE KO KLK5 cells were plated in the same plate and at the same density in triplicate and adhesion was monitored by using the xCELLigence Real-Time Cellular Analysis system with impedance measurements every 30 min for 96 h. Representative graphs are of impedance measurements, expressed with the arbitrary units cell index, over 24 h. Histograms represent the median (Q1-Q3) of cell index at 5, 10, and 24 h after incubation from three experiments performed in triplicate. B) After 24 h of adhesion, BEAS-2B cells were treated with 0.05 μM KLK5, 0.1 μM TFPI-2 (a KLK5 inhibitor) or both for 72 h. Cell index was obtained every 30 min all during the experiment and shown with representative graphs. Histograms represent data from three experiments performed in triplicate and expressed as the median (Q1-Q3) cell index at 24, 48, and 72 h after KLK5 treatment (arrows). Results were normalized against the cell index of untreated cells (CT) obtained at 24 h. C) Cell adhesion of 16HBE WT and 16HBE KO KLK5 cells was followed over 96 h as previously described; at 24 h after 16HBE KO KLK5 cell adhesion, cells were also exposed to 0.05 μM KLK5 (arrows represent 24-, 48- and 72-h treatment). A representative graph is shown and results from three experiments performed in triplicate are presented as histograms with median (Q1-Q3) of cell index normalized against those of untreated cells obtained at 24 h. D) Cell proliferation was assayed by MTS. Results were related to those obtained at 24 h and represent median (Q1-Q3) of 3

experiments performed in duplicate. Kruskal Wallis and Dunn's multiple comparison tests for A), B) C) and Mann Whitney test for D).*p<0.05, **p<0.01 ***p<0.001, and ****p<0.0001.

FIGURE 5: **Effect of KLK5 on the BEAS-2B cell adhesion and ECM proteins and integrins.** A) BEAS-2B cell adherence to fibronectin (FN), vitronectin (VT), laminin (Lam), collagen I (Col I), and IV (Col IV) alone or with 0.05 µM KLK5. Data are mean (Q1-Q3) from three experiments, each performed with three technical replicates. Data were analyzed with Kruskal-Wallis test and Dunn's test. ***p<0.001. B) Time-dependent cleavage of cellular fibronectin by KLK5 from 5 min to 4 h at 37°C before on SDS-PAGE and silver staining. TFPI-2 pre-incubated with 0.05 µM KLK5 (ratio 1:2; 30 min) was also added to fibronectin for 4 h. The bands corresponding to recombinant KLK5 and TFPI-2 are indicated and proteolytic products by arrows. A representative experiment of 4 is presented. C) α5, β1, β3, β4, and β5 integrin expression in BEAS-2B cells untreated (CT) or treated with 0.05 µM KLK5 analyzed by immunostaining. Results are representative of two experiments. D) KLK5 proteolytic activity of BEAS-2B cell α5β1, and α6β4 integrins from 5 min to 4 h of incubation before SDS-PAGE and silver staining. TFPI-2 (0.1 µM) pre-incubated with 0.05 µM KLK5 was also added. The bands corresponding to recombinant KLK5 and integrins are indicated and proteolytic products by arrows. Results are representative of 3 experiments.

FIGURE 6: Migration of BEAS-2B cells in response to KLK5 and involvement of mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway

A) 24 h after BEAS-2B cell adhesion, cells were treated or not with 0.05 µM KLK5 and migration was followed by time-lapse video microscopy with images captured every 5 min over 48 h and image processing with Fiji software. For each condition, data were computed from 20 randomly selected cells and results are representative of two experiments. Velocity (µm/sec) and distance (µm) covered by cells are expressed as mean ± SEM from two experiments. B) BEAS-2B cell migration and invasion through Matrigel were evaluated by a modified Boyden chamber assay using inserts with 8 µm pore size and 10% FCS as the chemoattractant. Results of migrated cells were related to those of untreated cells and expressed as median (Q1-Q3) from at least four experiments performed in triplicate. Data were analyzed by Mann Whitney test. **p<0.01, ***p<0.001. D) MAPK signaling pathway was studied in BEAS-2B untreated cells (CT), and incubated with 0.05 µM KLK5 for 5 min to 2 h, or with 0.1 µM TFPI-2 alone or pre-treated with KLK5. Immunostaining exploring

phosphorylation of Raf, MEK, ERK, and unphosphorylated ERK is representative of two experiments.

FIGURE 7: Wound healing repair and cell migration of 16HBE WT and 16HBE KO KLK5 cells in response to KLK5. A) Wound healing assay involved seeding 16HBE cells into each of the two compartments of the culture-insert to create a gap in confluence monolayer cells. The insert was removed and cells were treated with 0.05 µM KLK5. 16HBE WT and 16HBE KO KLK5 migration was visualized by time-lapse video microscopy with images captured every 5 min over 72 h. Results are representative of three experiments. B) 24 h after 16HBE cell adhesion, cells were treated or not with 0.05 µM KLK5, and migration was followed by time-lapse video microscopy with images captured every 5 min over 48 h and image processing with Fiji software. For each condition, data were computed from 20 randomly selected cells and results are representative of 2 experiments. Velocity (µm/sec) and distance (µm) covered by cells are expressed as mean ± SEM from two experiments and analyzed by Kruskal-Wallis and Dunn's multiple comparison test. *$p<0.05$, **$p<0.01$, and ****$p<0.0001$.

REFERENCES

1. Kraen M, Frantz S, Nihlén U, Engström G, Löfdahl CG, Wollmer P, Dencker M. Matrix Metalloproteinases in COPD and atherosclerosis with emphasis on the effects of smoking. *PLoS One* 2019;14(2):e0211987.
2. Boxio R, Wartelle J, Nawrocki-Raby B, et al. Neutrophil elastase cleaves epithelial cadherin in acutely injured lung epithelium. *Respir Res* 2016;17(1):129-143.
3. Navratilova Z, Kolek V, Petrek M. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2016;64(3):177-193.
4. Bagdonas E, Raudoniute J, Bruzauskaite I, Aldonyte R. Novel aspects of pathogenesis and regeneration mechanisms in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2015;10:995-1013.
5. Gao W, Li L, Wang Y, Zhang S, Adcock IM, Barnes PJ, Huang M, Yao X. Bronchial epithelial cells: The key effector cells in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease? *Respirology* 2015;20(5):722-729.
6. Brattsand M, Stefansson K, Lundh C, Haasum Y, Egelrud T. A proteolytic cascade of kallikreins in the stratum corneum. *J Invest Dermatol* 2005;124:198-203.
7. 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. *J Biol Chem* 2006;281:12743-12750.
8. 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. *Biol Chem* 2008;389(6):623-632.

9. 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. *J Invest Dermatol* 2004;122:1235-1244.
10. Jonsson M, Linse S, Frohm B, Lundwall A, Malm J. Semenogelins I and II bind zinc and regulate the activity of prostate-specific antigen. *Biochem J* 2005;387:447-453.
11. Goettig P, Magdolen V, Brandstetter H. Natural and synthetic inhibitors of kallikrein related peptidases (KLKs). *Biochimie* 2010;92(11):1546-1567.
12. Masurier N, Arama DP, El Amri C, Lisowski V. Inhibitors of kallikrein-related peptidases: An overview. *Med Res Rev* 2018;38(2):655-683.
13. Meyer-Hoffert U, Wu Z, Schröder JM. Identification of lympho-epithelial Kazal-type inhibitor 2 in human skin as a kallikrein-related peptidase 5-specific protease inhibitor. *PLoS One* 2009;4(2):e4372.
14. Meyer-Hoffert U, Wu Z, Kantyka T, Fischer J, Latendorf T, Hansmann B, Bartels J, He Y, Gläser R, Schröder JM. Isolation of SPINK6 in human skin: selective inhibitor of kallikrein-related peptidases. *J Biol Chem* 2010;285(42):32174-32181.
15. Brännström K, Ohman A, von Pawel Rammingen U, Olofsson A, Brattsand M. Characterization of SPINK9, a KLK5-specific inhibitor expressed in palmo-plantar epidermis. *Biol Chem* 2012;393(5):369-377.
16. Papachristopoulou G, Malachias A, Devetzi M, Kamouza E, Scorilas A, Xynopoulos D, Talieri M. Uncovering the clinical impact of kallikrein-related peptidase 5 (KLK5) mRNA expression in the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Clin Chem Lab Med* 2019;57(8):1251-1260.
17. Gong W, Liu Y, Seidl C, Diamandis EP, Kiechle M, Drecoll E, Kotzsch M, Magdolen V, Dorn J. Quantitative assessment and clinical relevance of kallikrein-related peptidase 5 mRNA expression in advanced high-grade serous ovarian cancer. *BMC Cancer* 2019;19(1):696-704.
18. Yousef GM, Scorilas A, Kyriakopoulou LG, Rendl L, Diamandis M, Ponzone R, Biglia N, Giai 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. *Clin Chem* 2002;48(8):1241-1250.
19. Planque C, de Monte M, Guyetant 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. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;329(4):1260-1266.
20. Ma H, Hockla A, Mehner C, Coban M, Papo N, Radisky DC, Radisky ES. PRSS3/Mesotrypsin and kallikrein-related peptidase 5 are associated with poor prognosis and contribute to tumor cell invasion and growth in lung adenocarcinoma. *Sci Rep* 2019;9(1):1844-1855.
21. Avgeris M, Papachristopoulou G, Polychronis A, Scorilas A. Down-regulation of kallikrein-related peptidase 5 (KLK5) expression in breast cancer patients: a biomarker for the differential diagnosis of breast lesions . *Clin Proteomics* 2011;8(1):5-15.
22. 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* 2002;51(2):126-132.
23. Dorn J, Yassouridis A, Walch A, Diamandis EP, Schmitt M, Kiechle M, Wang P, Drecoll E, Schmalfeldt B, Loessner D, Kotzsch M, Magdolen V. Assessment of kallikrein-related peptidase 5 (KLK5) protein expression in tumor tissue of advanced ovarian cancer patients by immunohistochemistry and ELISA: correlation with clinical outcome. *Am J Cancer Res* 2015;6(1):61-70.
24. Emami N, Diamandis EP. Potential role of multiple members of the kallikrein-related peptidase family of serine proteases in activating latent TGF beta 1 in semen. *Biol Chem* 2010;391(1):85-95.
25. 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. *J Biol Chem* 2011;286(29):25505-25518.

26. de Souza LR, M Melo P, Paschoalin T, Carmona AK, Kondo M, Hirata IY, Blaber M, Tersariol I, Takatsuka J, Juliano MA, Juliano L, Gomes RA, Puzer L. Human tissue kallikreins 3 and 5 can act as plasminogen activator releasing active plasmin. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;433(3):333-337.
27. Andreasen PA, Egelund R, Petersen HH. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell Mol Life Sci* 2000;57(1):25-40.
28. 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. *J Biol Chem* 2006;281(43):32095-32112.
29. Pawar NR, Buzza MS, Antalis TM. Membrane-anchored serine proteases and protease-activated receptor-2 (PAR-2)-mediated signaling: Co-conspirators in cancer progression. *Cancer Res* 2019;79(2):301-310.
30. Kishibe M. Physiological and pathological roles of kallikrein-related peptidases in the epidermis. *J Dermatol Sci* 2019;95(2):50-55.
31. 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. *J Invest Dermatol* 2006;126(7):1622-1632.
32. Yamasaki K, Di Nardo A, Bardan A, Murakami M, Ohtake T, Coda A, Dorschner RA, Bonnart C, Descargues P, Hovnanian A, Morhenn VB, Gallo RL. Increased serine protease activity and cathelicidin promotes skin inflammation in rosacea. *Nat Med* 2007;13(8):975-980.
33. Briot A, Deraison C, Lacroix M, Bonnart C, Robin A, Besson C, Dubus P, Hovnanian A. Kallikrein 5 induces atopic dermatitis-like lesions through PAR2-mediated thymic stromal lymphopoietin expression in Netherton syndrome. *J Exp Med* 2009;206(5):1135-1147.
34. Lenga Ma Bonda W, Iochmann S, Magnen M, Courty Y, Reverdiau P. Kallikrein-related peptidases in lung diseases. *Biol Chem* 2018;399(9):959-971.
35. Rooney C, Sethi T. The epithelial cell and lung cancer: the link between chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer. *Respiration* 2011;81(2):89-104.
36. Amatngalim GD, van Wijck Y, de Mooij-Eijk Y, Verhoosel RM, J. Harder J, Lekkerkerker AN, Janssen RA, Hiemstra PS. Basal cells contribute to innate immunity of the airway epithelium through production of the antimicrobial protein RNase 7. *J Immunol* 2015;194:3340–3350
37. Bieth, J G. *In vivo* significance of kinetic constants of protein proteinase inhibitors. *Biochem Med* 1984;32:387–397.
38. Bon E, Driffort V, Gradek F, Martinez-Caceres C, Anchelin M, Pelegrin P, Cayuela ML, Marionneau-Lambot S, Oullier T, Guibon R, Fromont G, Gutierrez-Pajares JL, Domingo I, Piver E, Moreau A, Burlaud-Gaillard J, Frank PG, Chevalier S, Besson P, Roger S. SCN4B acts as a metastasis-suppressor gene preventing hyperactivation of cell migration in breast cancer. *Nat Commun* 2016;7:13648
39. Hiemstra PS, Grootaers G, van der Does AM, Krul CAM, Kooter IM. Human lung epithelial cell cultures for analysis of inhaled toxicants: Lessons learned and future directions. *Toxicol In Vitro* 2018;47:137-146.
40. Charbonnier JP, Pompe E, Moore C, et al. Airway wall thickening on CT: Relation to smoking status and severity of COPD. *Respir Med* 2019;146:36-41.
41. Zhang L, Gallup M, Zlock L, Basbaum C, Finkbeiner WE, McNamara NA. Cigarette smoke disrupts the integrity of airway adherens junctions through the aberrant interaction of p120-catenin with the cytoplasmic tail of MUC1. *J Pathol* 2013;229(1):74-86.
42. Nishida K, Brune KA, Putcha N, Mandke P, O'Neal WK, Shade D, Srivastava V, Wang M, Lam H, An SS, Drummond MB, Hansel NN, Robinson DN, Sidhaye VK. Cigarette smoke disrupts monolayer integrity by altering epithelial cell-cell adhesion and cortical tension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2017;313(3):L581-L591.
43. Higham A, Quinn AM, Cançado JED, Singh D. The pathology of small airways disease in COPD: historical aspects and future directions. *Respir Res* 2019;20(1):49-59.

44. Nishioka M, Venkatesan N, Dessalle K, et al. Fibroblast-epithelial cell interactions drive epithelial-mesenchymal transition differently in cells from normal and COPD patients. *Respir Res* 2015;16(1):72-83.
45. Wang Z, Li R, Zhong R. Extracellular matrix promotes proliferation, migration and adhesion of airway smooth muscle cells in a rat model of chronic obstructive pulmonary disease via upregulation of the PI3K/AKT signaling pathway. *Mol Med Rep* 2018;18(3):3143-3152.
46. Hou W, Hu S, Li C, Ma H, Wang Q, Meng G, Guo T, Zhang J. Cigarette smoke induced lung barrier dysfunction, EMT, and tissue remodeling: A possible link between COPD and lung cancer. *Biomed Res Int* 2019;2019:2025636
47. Ito JT, Lourenço JD, Righetti RF, Tibério IFLC, Prado CM, Lopes FDTQS. Extracellular matrix component remodeling in respiratory diseases: What has been found in clinical and experimental studies? *Cells* 2019;8(4):342-366.
48. Kryza T, Parent C, Pardessus J, Petit A, Burlaud-Gaillard J, Reverdiau P, Iochmann S, Labas V, Courty Y, Heuzé-Vourc'h N. Human kallikrein-related peptidase 12 stimulates endothelial cell migration by remodeling the fibronectin matrix. *Sci Rep* 2018;8(1):6331-6342.
49. Petersen LC, Sprecher CA, Foster DC, Blumberg H, Hamamoto T, Kisiel W. Inhibitory properties of a novel human Kunitz-type protease inhibitor homologous to tissue factor pathway inhibitor. *Biochemistry* 1996;35:266-272.
50. Chand HS, Foster DC, Kisiel W. Structure, function and biology of tissue factor pathway inhibitor-2. *Thromb Haemost* 1996;94:1122-1130.
51. Iochmann S, Bléchet C, Chabot V, Saulnier A, Amini A, Gaud G, Gruel Y, Reverdiau P. Transient RNA silencing of tissue factor pathway inhibitor-2 modulates lung cancer cell invasion. *Clin Exp Metastasis* 2009;26:457-467.
52. Gaud G, Iochmann S, Guillon-Munos A, Brillet B, Petiot S, Seigneuret F, Touzé A, Heuzé-Vourc'h N, Courty Y, Lerondel S, Gruel Y, Reverdiau P. TFPI-2 silencing increases tumour progression and promotes metalloproteinase 1 and 3 induction through tumour-stromal cell interactions. *J Cell Mol Med* 2011;15:196-208.
53. Lavergne M, Jourdan ML, Blechet C, Guyetant S, Pape AL, Heuze-Vourc'h N, Courty Y, Lerondel S, Sobilo J, Iochmann S, Reverdiau P. Beneficial role of overexpression of TFPI-2 on tumour expression in human small cell lung cancer. *FEBS Open Bio* 2013;3:291-301.
54. Prezas P, Arlt MJ, Viktorov P, Soosaipillai A, Holzscheiter L, Schmitt M, Talieri M, Diamandis EP, Krüger A, Magdolen V. Overexpression of the human tissue kallikrein genes KLK4, 5, 6, and 7 increases the malignant phenotype of ovarian cancer cells. *Biol Chem* 2006;387(6):807-811.
55. Loessner D, Quent VM, Kraemer J, Weber EC, Hutmacher DW, Magdolen V, Clements JA. Combined expression of KLK4, KLK5, KLK6, and KLK7 by ovarian cancer cells leads todecreased adhesion and paclitaxel-induced chemoresistance *Gynecol Oncol* 2012;127(3):569-578.
56. Haddada M, Draoui H, Deschamps L, Walker F, Delaunay T, Brattsand M, Magdolen V, Darmoul D. Kallikrein-related peptidase 7 overexpression in melanoma cells modulates cell adhesion leading to a malignant phenotype. *Biol Chem* 2018; 399(9):1099-1105.
57. Lizama AJ, Andrade Y, Colivoro P, Sarmiento J, Matus CE, Gonzalez CB, Bhoola KD, Ehrenfeld P, Figueroa CD. Expression and bioregulation of the kallikrein-related peptidases family in the human neutrophil. *Innate Immun* 2015;21(6):575-586
58. Magnen M, Gueugnon F, Guillon A, Baranek T, Thibault VC, Petit-Courty A, de Veer S J, Harris J, Humbles AA, Si-Tahar M, Courty Y. Kallikrein-related peptidase 5 contributes to H3N2 influenza virus infection in human lungs. *J Virol* 2017;91:e00421-17.
59. Jiang YY, Xiao W, Zhu MX, Yang ZH, Pan XJ, Zhang Y, Sun CC, Xing Y. The effect of human antibacterial peptide LL-37 in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 2012;106(12):1680-1689.
60. Yamasaki K, Schauber J, 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, *FASEB J* 2006;20:2068–2080.

Figure 1

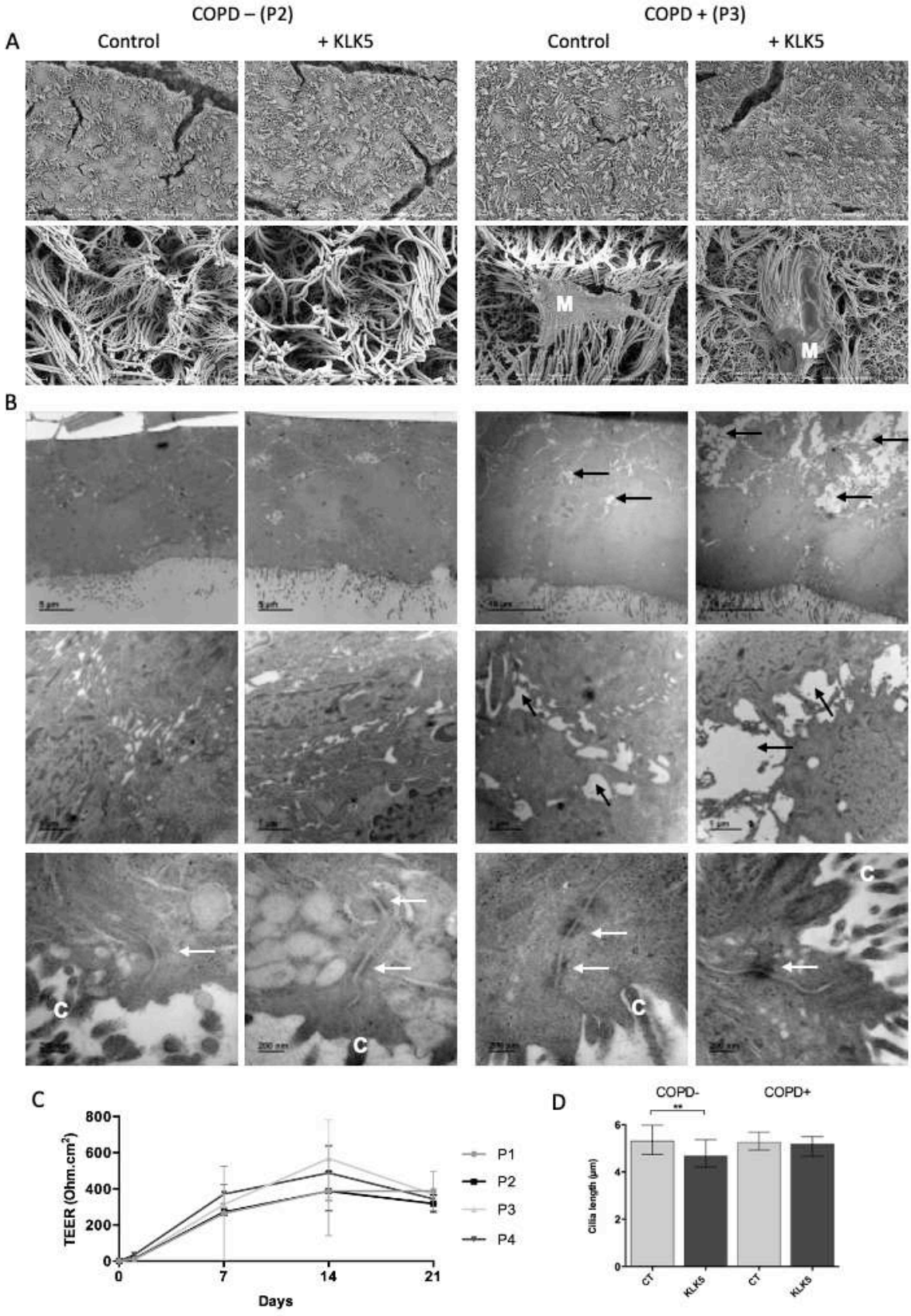


Figure 2

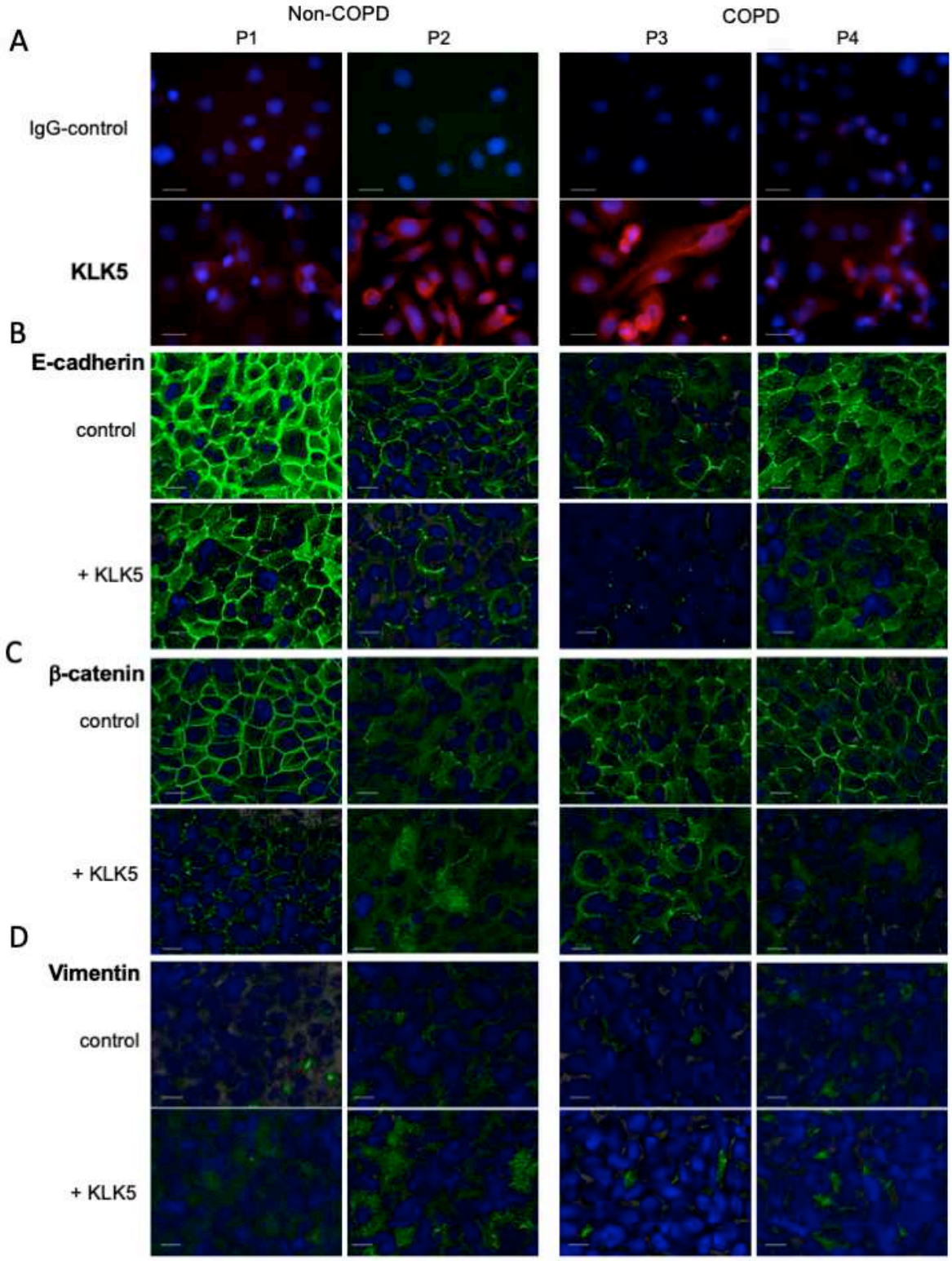

Non-COPD
COPD
A
P1
P2
P3
P4
IgG-control
KLK5
B
E-cadherin
control
+ KLK5
C
β-catenin
control
+ KLK5
D
Vimentin
control
+ KLK5

Figure 3

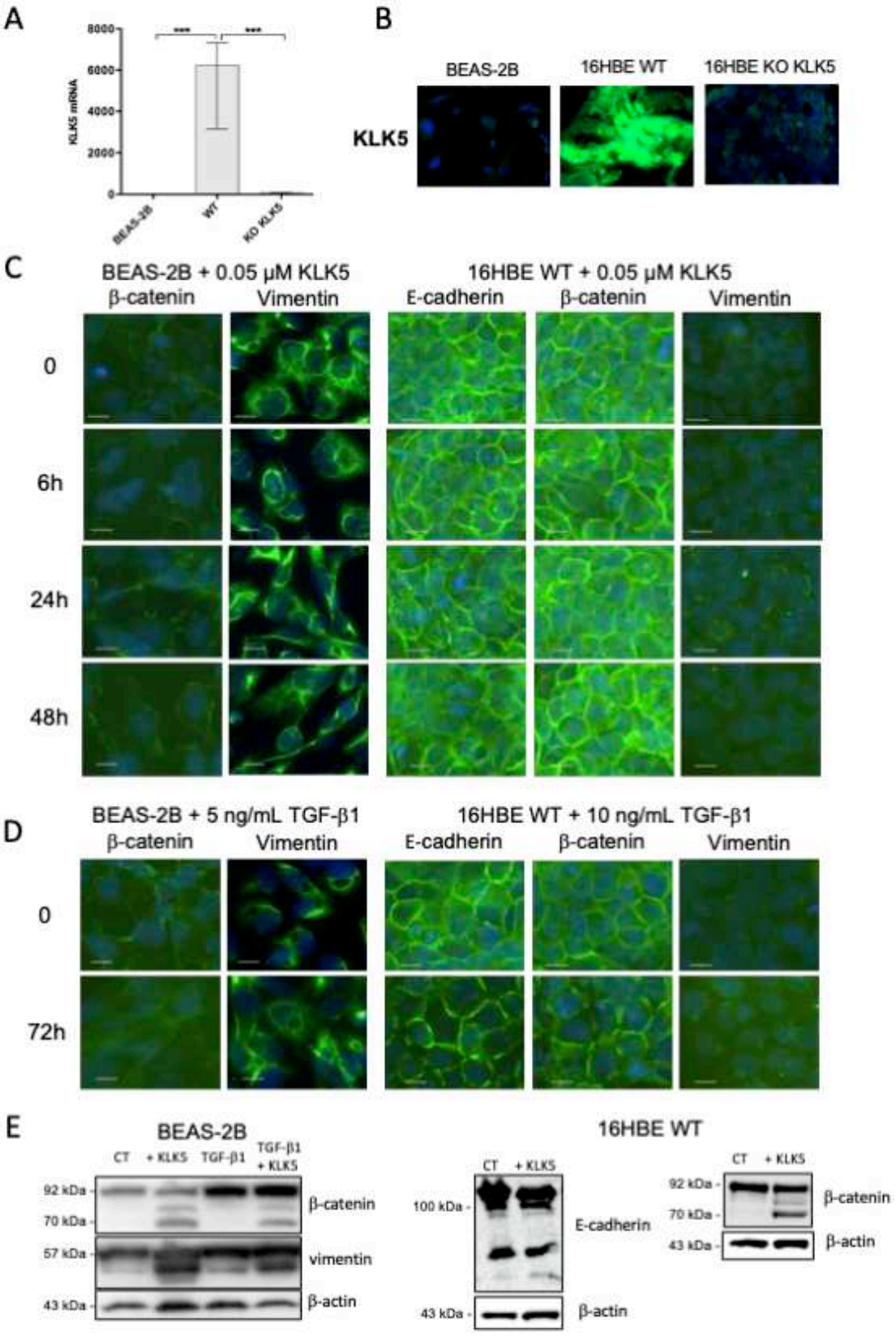

A
KLK5 mRNA
8000
6000
4000
2000
0
***
***
BEAS-2B
WT
KO KLK5
B
BEAS-2B
16HBE WT
16HBE KO KLK5
KLK5
C
BEAS-2B + 0.05 μM KLK5
β-catenin
Vimentin
16HBE WT + 0.05 μM KLK5
E-cadherin
β-catenin
Vimentin
0
6h
24h
48h
D
BEAS-2B + 5 ng/mL TGF-β1
β-catenin
Vimentin
16HBE WT + 10 ng/mL TGF-β1
E-cadherin
β-catenin
Vimentin
0
72h
E
BEAS-2B
CT
+ KLK5
TGF-β1
TGF-β1 + KLK5
92 kDa
70 kDa
57 kDa
43 kDa
β-catenin
vimentin
β-actin
16HBE WT
CT
+ KLK5
100 kDa
43 kDa
E-cadherin
β-actin
CT
+ KLK5
92 kDa
70 kDa
43 kDa
β-catenin
β-actin

Figure 4

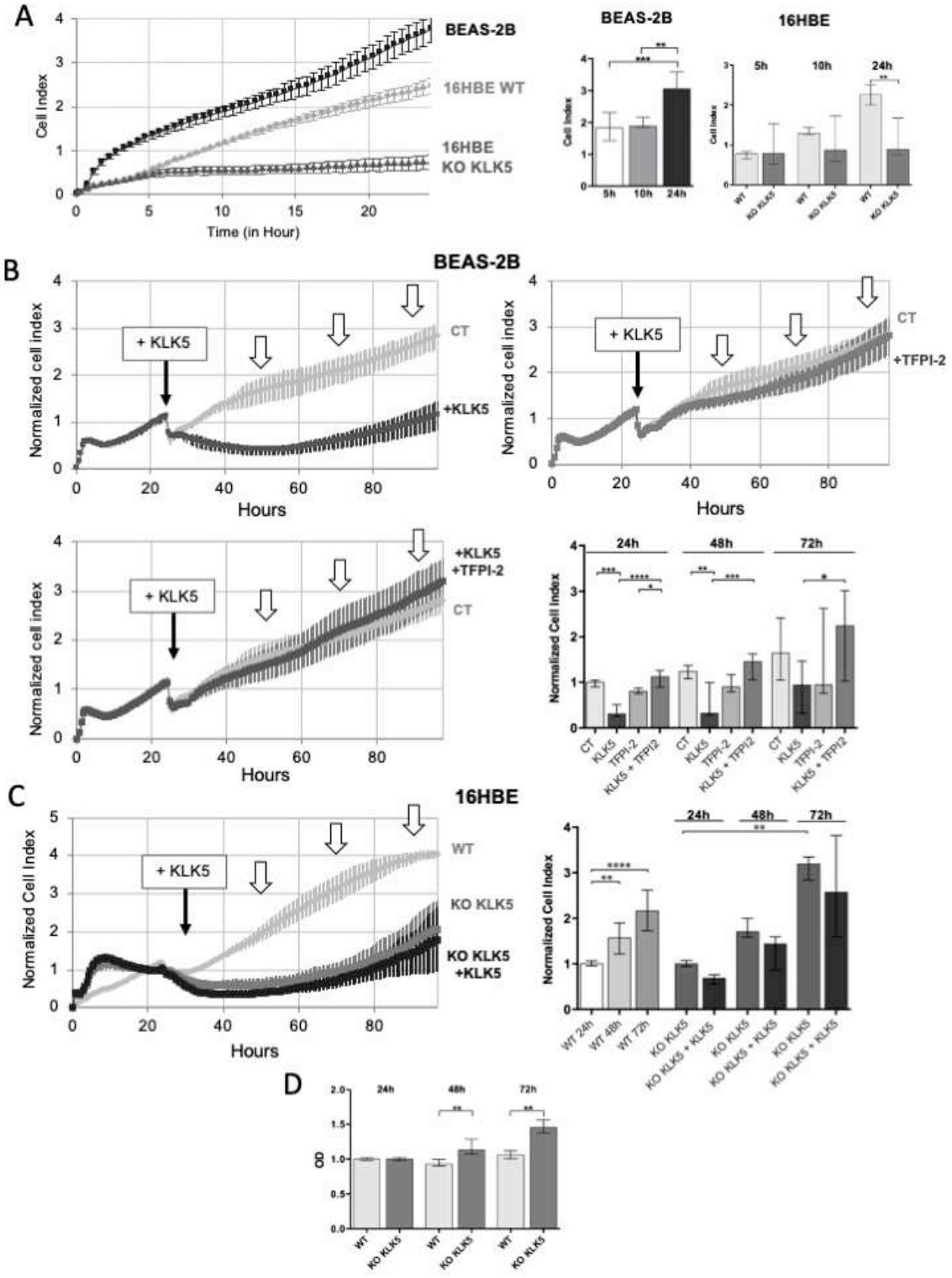

A
BEAS-2B
16HBE WT
16HBE
KO KLK5
Cell Index
Time (in Hour)
BEAS-2B
16HBE
5h
10h
24h
B
BEAS-2B
+ KLK5
CT
+KLK5
+TFPI-2
Normalized cell index
Hours
C
16HBE
WT
KO KLK5
KO KLK5
+KLK5
Normalized Cell Index
D
OD

Figure 5

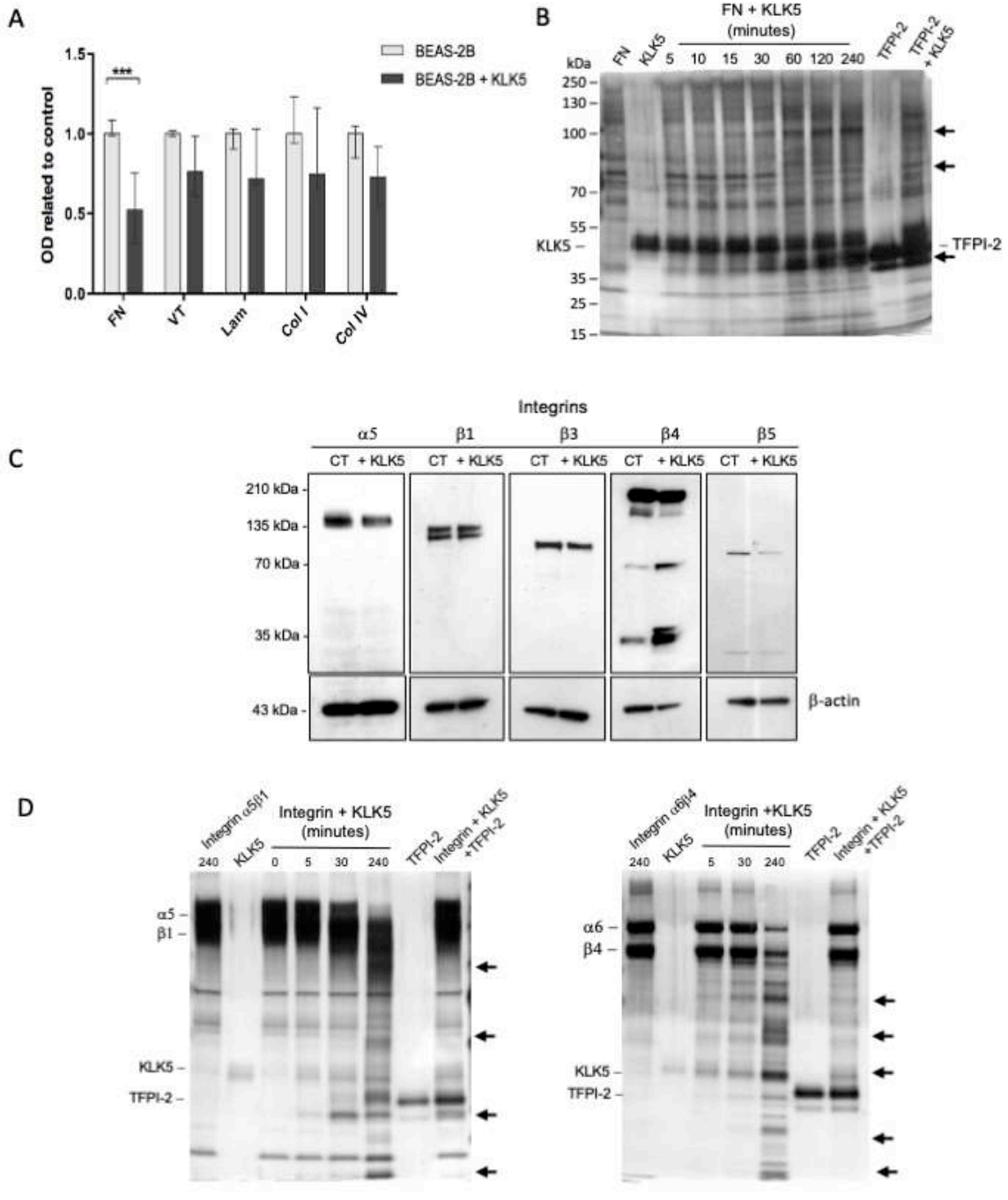

A
BEAS-2B
BEAS-2B + KLK5
OD related to control
***
FN
VT
Lam
Col I
Col IV
B
FN + KLK5
(minutes)
kDa
FN
KLK5
5
10
15
30
60
120
240
TFPI-2
TFPI-2 + KLK5
KLK5
TFPI-2
C
Integrins
α5
β1
β3
β4
β5
CT
+ KLK5
210 kDa
135 kDa
70 kDa
35 kDa
43 kDa
β-actin
D
Integrin α5β1
Integrin + KLK5
(minutes)
TFPI-2
Integrin + KLK5 +TFPI-2
α5
β1
KLK5
TFPI-2
Integrin α6β4
Integrin +KLK5
α6
β4

Figure 6

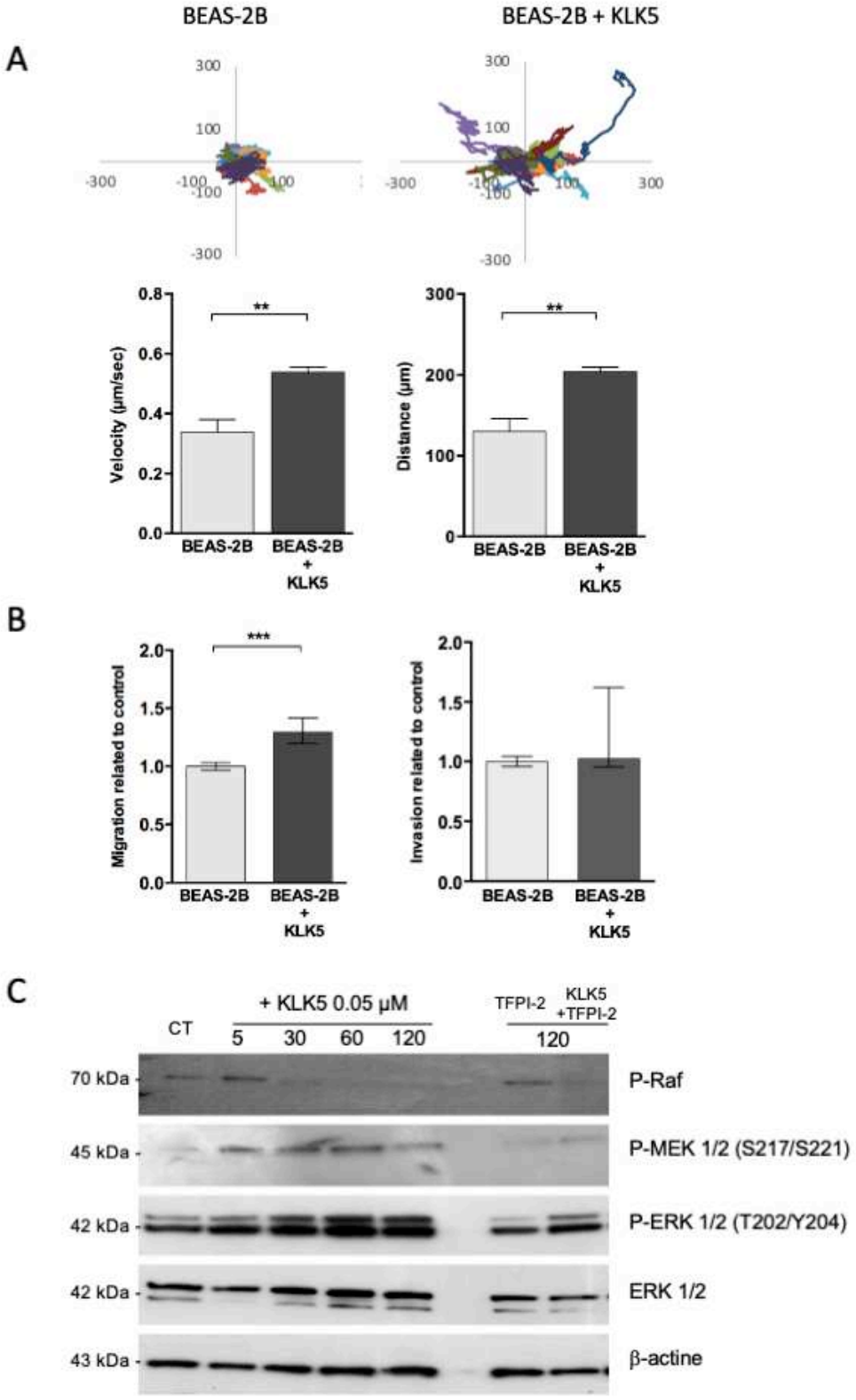
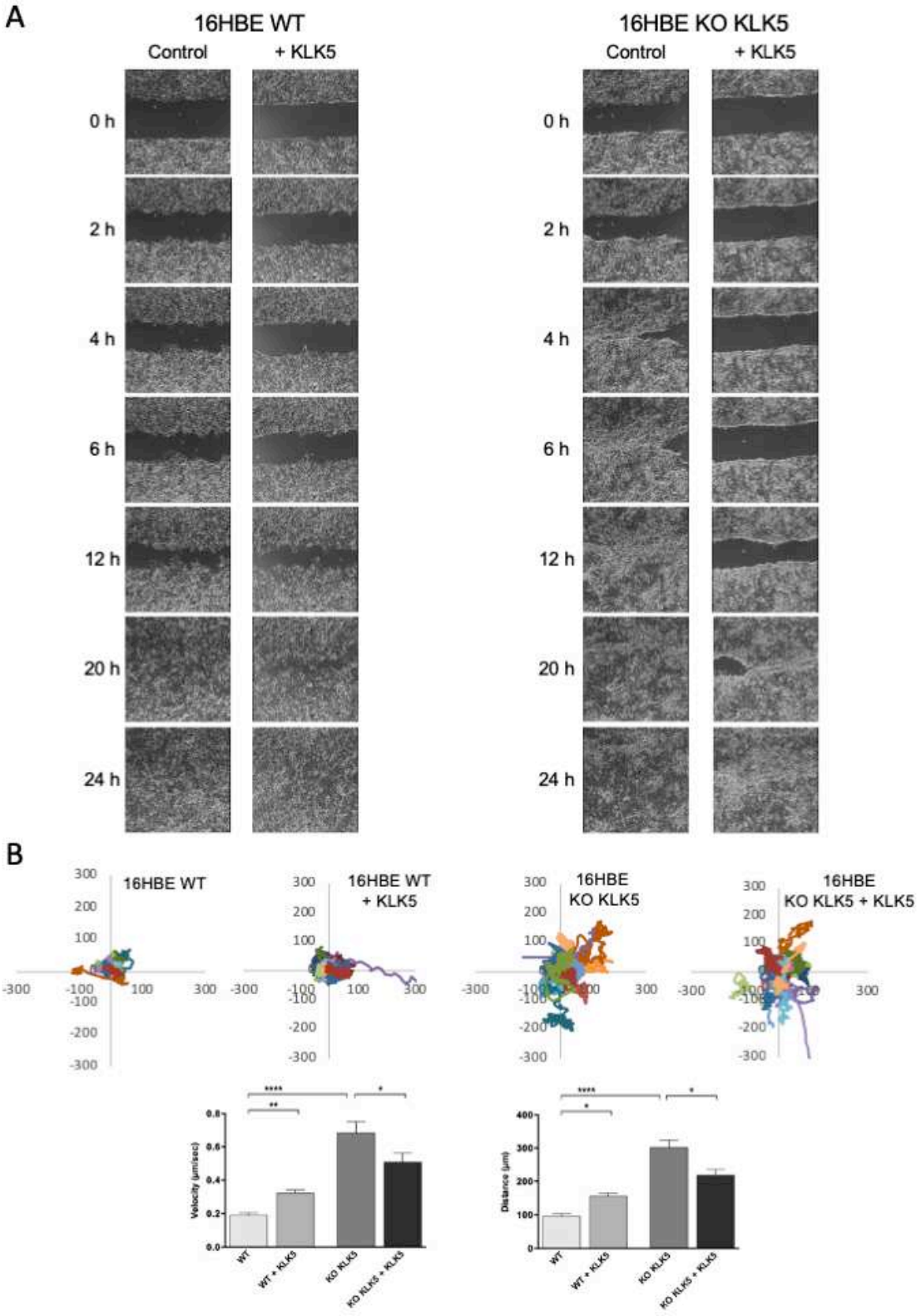

A
BEAS-2B
BEAS-2B + KLK5
300
100
-300
-100
100
300
-100
-300
Velocity (µm/sec)
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
**
BEAS-2B
BEAS-2B + KLK5
Distance (µm)
300
200
100
0
**
BEAS-2B
BEAS-2B + KLK5
B
Migration related to control
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
***
BEAS-2B
BEAS-2B + KLK5
Invasion related to control
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
BEAS-2B
BEAS-2B + KLK5
C
CT
+ KLK5 0.05 µM
5
30
60
120
TFPI-2
KLK5 +TFPI-2
120
70 kDa
P-Raf
45 kDa
P-MEK 1/2 (S217/S221)
42 kDa
P-ERK 1/2 (T202/Y204)
42 kDa
ERK 1/2
43 kDa
β-actine

Figure 7


A
16HBE WT
Control
+ KLK5
16HBE KO KLK5
Control
+ KLK5
0 h
2 h
4 h
6 h
12 h
20 h
24 h
B
16HBE WT
16HBE WT + KLK5
16HBE KO KLK5
16HBE KO KLK5 + KLK5
Velocity (µm/sec)
Distance (µm)
WT
WT + KLK5
KO KLK5
KO KLK5 + KLK5

Attestation de soumission de l'article en 1er auteur

THE FASEB JOURNAL

Home | For Authors | For Reviewers | Contact | Logout

Change journal

Manuscript #	202002649
Current Revision #	0
Submission Date	2020-12-04 07:26
Title	Kallikrein-related peptidase 5 contributes to the remodeling and repair of bronchial epithelium
Manuscript Type	Research Article
Corresponding Author	Prof. Pascale REVERDIAU (Université de Tours)
Contributing Authors	Woodys Lenga Ma Bonda , Marion Lavergne , Virginie Vasseur , Lucie Brisson , Dr. Sébastien Roger , Antoine Legras , Antoine Guillon , Serge Guyétant , Pieter Hiemstra , Mustapha Si-Tahar , Iochmann Sophie
Aim	N/A
Significance to The FASEB Journal	N/A
Conclusions	N/A
Abstract	Inflammation, oxidative stress, and protease/protease inhibitor imbalance with excessive production of proteases are factors associated with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) pathogenesis. In this study, we report for the first time that kallikrein-related peptidase 5 (KLK5) is a crucial protease involved in extracellular matrix (ECM) remodeling and bronchial epithelial repair following injury. First, we showed that KLK5 degrades the basal layer formed by cultured of primary bronchial epithelial cells (PBECs) obtained from COPD or non-COPD patients. Our results also showed that exogenous KLK5 acts differently on BEAS-2B cells already engaged in epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) or on 16HBE 14o- harboring epithelial characteristics. Indeed, by inducing EMT, KLK5 reduced BEAS-2B cell adherence to the ECM. This effect, neutralized by the tissue factor pathway inhibitor 2 (TFPI-2), a kunitz-type serine protease inhibitor, was due to a direct proteolytic activity of KLK5 on E-cadherin, □-catenin, fibronectin, and □5□1 integrins. Thus, KLK5 may strengthen EMT mechanisms and promote the migration of cells by activating the mitogen-activated protein kinase signaling pathway required for this function. In contrast, knockdown of endogenous KLK5 in 16HBE14o- cells, accelerated wound healing repair after injury, and exogenous KLK5 delayed the closure repair. These data suggest that among proteases, KLK5 could play a critical role in airway remodeling events associated with COPD during exposure of the pulmonary epithelium to inhaled irritants or smoking and the inflammation process.
Author Suggested Included Reviewers	Viktor MAGDOLEN (Department of Gynecology and Obstetrics - Technical University of Munich), Dalila DARMOUL (UMR Inserm U976, Hôpital Saint Louis, Paris), George Yousef (Hospital for Sick Children)
Author Suggested Excluded Reviewers	N/A
Keywords	Kallikrein-related peptidase 5, epithelial-mesenchymal transition, bronchial remodeling, airway repair, COPD
General Subject Category	Cell biology,Cell & tissue engineering,Microscopy,Respiratory system
Funding Body Archiving Mandates	Ligue Contre le Cancer ✔ : Lucie Brisson Doctoral Fellowship (University of Tours) ⚠ : Pascale REVERDIAU, Woodys Lenga Ma Bonda, Marion Lavergne, Virginie Vasseur, Lucie Brisson
Plain Language Summary	Inflammation, oxidative stress, and enzyme/enzyme inhibitor imbalance with excessive production of enzymes are factors associated with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) pathogenesis. In this study, we report for the first time that kallikrein-related peptidase 5 (KLK5) is a crucial enzyme involved in remodeling and bronchial tissue repair following injury. First, we showed that KLK5 degrades bronchial cells (PBECs) obtained from COPD or non-COPD patients. Our results also showed that exogenous KLK5 acts differently according to cell characteristics. KLK5 reduced cell adherence to the matrix. This effect, neutralized by its inhibitor, was due to a direct cleavage of KLK5 on adherens proteins which maintain cell cohesion. In contrast, when endogenous KLK5 was abolished in cells, accelerated repair after injury was observed. These data suggest that KLK5 could play a critical role in airway remodeling events associated with COPD during exposure of the pulmonary epithelium to inhaled irritants or smoking and the inflammation process.

Manuscript Items

1. Cover Letter PDF (550KB) Source File (DOCX) 70KB
2. Merged File containing manuscript text and 7 Figure files. PDF (3714KB)
    1. Article File PDF (740KB) Source File (DOCX) 89KB
    2. Figure 1 PDF (594KB) Source File (TIF) 2197KB
    3. Figure 2 PDF (1031KB) Source File (TIF) 2143KB
    4. Figure 3 PDF (545KB) Source File (TIF) 1602KB
    5. Figure 4 PDF (161KB) Source File (TIF) 2143KB
    6. Figure 5 PDF (235KB) Source File (TIF) 2143KB
    7. Figure 6 PDF (134KB) Source File (TIF) 2143KB
    8. Figure 7 PDF (289KB) Source File (TIF) 2143KB

Rôle de la KLK5 endogène et exogène dans les mécanismes de réparation tissulaire

Les résultats de la figure 7A de l'article ont montré que les cellules 16HBE WT ont besoin d'un temps plus long (20 heures) pour fermer une blessure et ceci sans effet notoire de la KLK5 exogène. L'invalidation de la KLK5 endogène améliore le temps de réparation de la blessure de 4 à 6 heures tandis que l'ajout de la KLK5 exogène sur ces cellules ralentit de nouveau la fermeture de la brèche à environ 20 heures. Parmi les mécanismes impliqués dans la réparation tissulaire et la re-différenciation des cellules, une meilleure adhérence des cellules à la MEC ou à la membrane basale est nécessaire pour faciliter cette réparation. Pour étudier l'implication de ce mécanisme, nous avons donc analysé l'expression des intégrines, permettant la fixation des cellules à la MEC ou à la membrane basale ainsi que les protéines impliquées dans les jonctions adhérentes, la E-cadhérine et la ß-caténine, et également la vimentine dans les 2 lignées cellulaires (figure 42).

L'expression des intégrines dans les cellules 16HBE WT et 16HBE KLK5 KO traitées ou non par la rhKLK5 pendant 24 heures a été recherchée par immunoempreinte.
Nos résultats ont montré que l'expression des intégrines α5, β1 et β3 était augmentée dans les cellules 16HBE KLK5 KO par rapport à celle des cellules 16HBE WT (Figure 42A). En revanche, une légère réduction de l'intégrine β4, et notamment du fragment de clivage d'environ 40 kDa, est observée dans les cellules invalidées pour KLK5. L'addition de la rhKLK5 exogène aux cellules 16HBE WT a montré un effet variable selon les intégrines avec une légère diminution de l'intégrine β3 et une tendance à l'augmentation des intégrines α5 et β1 ainsi que du fragment de clivage de 40 kDa de la β4. Cependant, l'ajout de rhKLK5 exogène aux cellules 16HBE KLK5 KO a clairement réduit l'expression de l'intégrine α5 et β3, par rapport aux cellules non traitées.

L'expression de la E-cadhérine, β-caténine et vimentine a été étudiée dans les 2 lignées cellulaires traitées ou non par de la rhKLK5, par immunofluorescence et observée en microscopie confocale (Figure 42B). Nos résultats ont montré un marquage hétérogène de la β-caténine dans les deux lignées 16HBE WT et 16HBE KLK5 KO, en présence ou non de la rhKLK5.

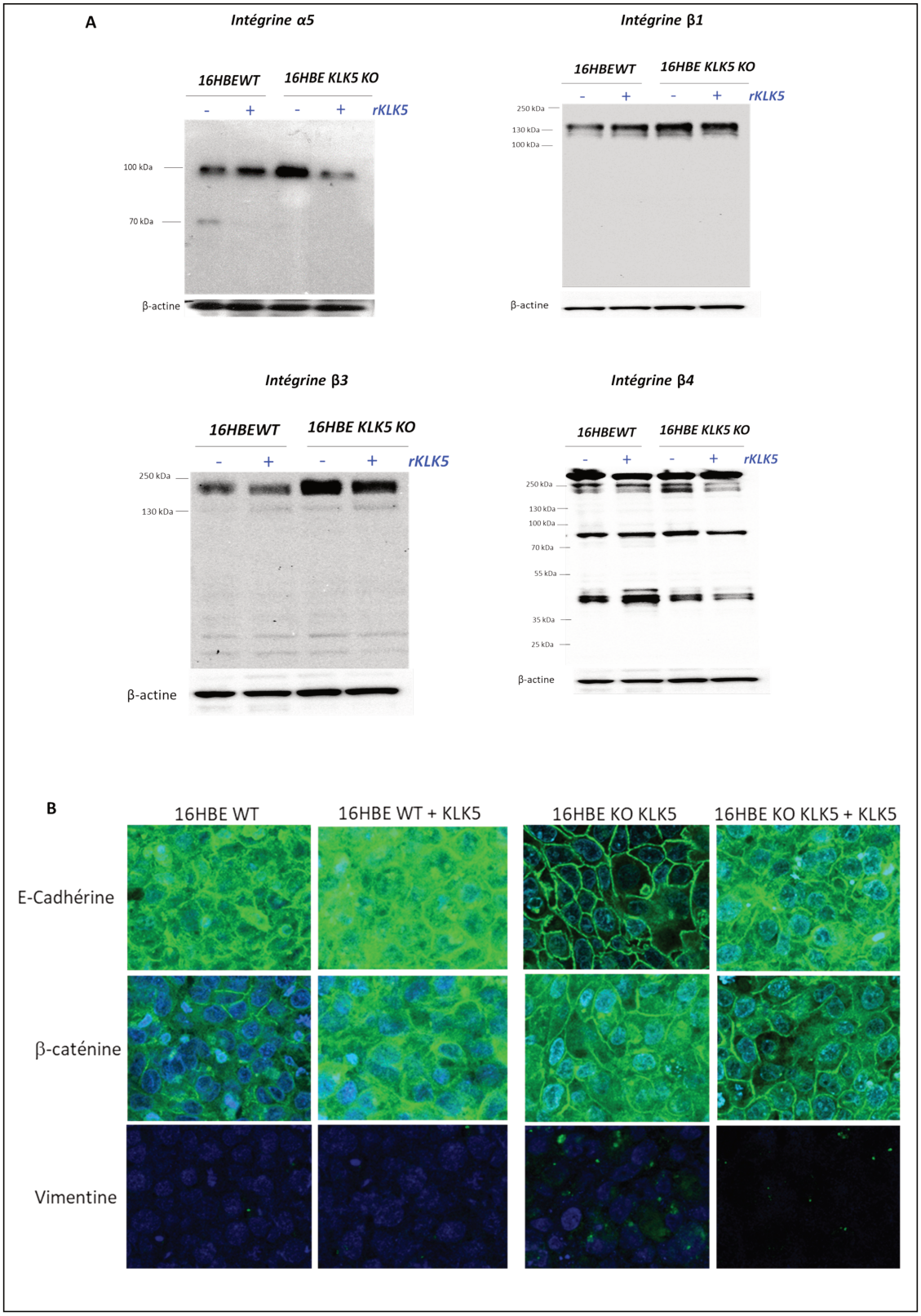


Figure 42 : Expression des intégrines et des molécules de jonctions E-cadhérine, β*-caténine et vimentine dans les cellules 16HBEWT et 16HBE KLK5 KO. A) expression protéique par immunoempreinte des intégrines après traitement des cellules 16HBEWT et 16HBE KLK5 KO avec (+) ou sans (-) l'ajout de la KLK5 recombinante. B) Expression des marqueurs de TEM dans les cellules 16HBEWT et KLK5 KO cultivées en ALI, en présence (+KLK5) ou non de la KLK5.*

En ce qui concerne la E-cadhérine, un marquage hétérogène est retrouvé dans les cellules 16HBE WT, sans effet visible de l'ajout de la KLK5 alors que les cellules 16HBE KLK5 KO présentent un marquage membranaire net et homogène. L'ajout de la rhKLK5 sur ces cellules 16HBE KLK5 KO induit un marquage hétérogène de la E-cadhérine, suggérant une dissociation des cellules liée à une dégradation de cette protéine. Aucun marquage de la vimentine n'a été observé pour les deux lignées. Ces résultats suggèrent que l'amélioration de la réparation de la blessure des cellules 16HBE KLK5 KO pourrait s'expliquer par un meilleur accrochage de ces cellules entre-elles et aux composants de la MEC avec la formation de jonctions adhérentes plus efficaces, dûe à une répartition homogène de la E-cadhérine. Cet accrochage apparaît perturbé par l'ajout de la KLK5 exogène ou sa présence endogène.

Partie V :

Etude de l'implication de la KLK5 exogène dans l'autophagie

1. Introduction

L'autophagie est un processus physiologique de dégradation d'une partie du cytoplasme des cellules par leurs propres lysosomes. C'est la voie majeure de dégradation et de recyclage des organelles endommagées (mitochondries, ribosomes etc.), de microorganismes et de protéines dégradées ou mal conformées qui ne peuvent pas être dégradées par le protéasome. L'autophagie peut être basale ou induite par différents facteurs comme l'hypoxie, le stress oxydant, la privation de nutriments ou une forte diminution de l'énergie cellulaire. Dans les conditions basales, l'autophagie est nécessaire pour maintenir l'homéostasie cellulaire (Gallagher et al., 2016). En situation de stress, l'autophagie permet de fournir des nutriments et d'assurer la survie cellulaire (Ravikumar et al, 2010). Il existe trois types d'autophagie : la microautophagie, l'autophagie médiée par des protéines chaperonnes et la macroautophagie que nous avons étudiée. Dans la macroautophagie (dite autophagie), la fixation de la protéine p62 sur la protéine cible permet d'initier la formation d'une double membrane d'autophagosome à partir du réticulum endoplasmique. Le complexe LC3 (*Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*) se conjugue à la phosphatidyl-éthanolamine (PE) pour former le LC3-II qui se lie également à cette double membrane d'autophagosome pour engloutir la protéine cible. Ces autophagosomes contenant la protéine ciblée vont fusionner avec les lysosomes et les protéines cible/p62 vont être dégradées par les protéases lysosomales. La protéine LC3-I sera également dégradée et la PE recyclée pour reprendre le processus (Ravikumar et al, 2010). Plusieurs études ont montré que l'activité autophagique était fortement augmentée dans les échantillons de patients atteints de BPCO, particulièrement due à la destruction des cils appelée cilophagie (Cloonan et al, 2014 ; McAlinden et al, 2019). De plus, nos résultats précédents ont montré une dégradation des protéines membranaires (E-cadhérine, intégrines, etc.) et intracellulaires (β-caténine) par la KLK5. L'ensemble de ces observations nous a amené à étudier l'implication de la KLK5 sur le processus d'autophagie dans le contexte de la BPCO.

2. Etude de l'autophagie dans des épithéliums reconstitués.

L'expression de 2 protéines intervenant dans l'autophagie, la protéine LC3-II et la protéine p62 ont été recherchées, par immunoempreinte, dans les épithéliums reconstitués à partir des lignées cellulaires 16HBE WT et KLK5 KO et de cellules primaires bronchiques de patients atteints ou non de BPCO. De plus, de la rhKLK5 a été ajoutée sur ces épithéliums afin de déterminer si cette protéase pouvait jouer un rôle dans l'autophagie et notamment la formation des autophagosomes. La présence de ces derniers a été également recherchée sur

les coupes des différents épithéliums reconstitués observées en microscopie électronique à transmission.

L'expression de la protéine LC3-I est plus importante que celle de la LC3-II, qui correspond à la protéine LC3-I conjuguée à la PE, dans les cellules 16HBEWT et KLK5 KO non différenciées (Figure 43A). Lorsque les cellules ont été incubées en présence de la rhKLK5, une augmentation de la protéine LC3-I a été observée. Cette augmentation, plus marquée dans les cellules KLK5 KO, suggère la synthèse de la protéine et par conséquent une augmentation de l'activité autophagique. La protéine p62 n'a pas été détectée dans les lignées cellulaires, même après incubation avec la rhKLK5.

L'observation, en microscopie électronique à transmission, des épithéliums obtenus à partir des cellules 16HBEWT montre la présence de plusieurs autophagosomes (flèches noires) dans la condition non exposée à la KLK5. Ces structures autophagiques semblaient légèrement diminuées dans les épithéliums reconstitués à partir des cellules KLK5 KO. L'ajout de la KLK5 augmente l'autophagie dans les deux types d'épithéliums (WT et KLK5 KO), caractérisée par une accumulation des autophagosomes (flèche noire) et des structures caractéristiques des phases d'initiations de l'autophagie (étoiles blanches) (Figure 43D).

L'autophagie a également été étudiée dans les cellules primaires bronchiques différenciées ou non en ALI et incubées ou non en présence de rhKLK5 (Figure 43B et C). L'expression de la LC3-I et de la LC3-II est équivalente dans les cellules épithéliales primaires des patients et par immunoempreinte, la protéine p62 est également détectée (Figure 43B). L'ajout de la KLK5 aux cellules a induit une diminution de la protéine p62 dans les cellules, montrant sa dégradation. Une augmentation de l'expression de LC3-I/LC3-II a été observée dans les cellules épithéliales des patients P1 et P4 traitées par de la rhKLK5 tandis que dans celles des patients P2 et P3, la protéine LC3-II a été diminuée.

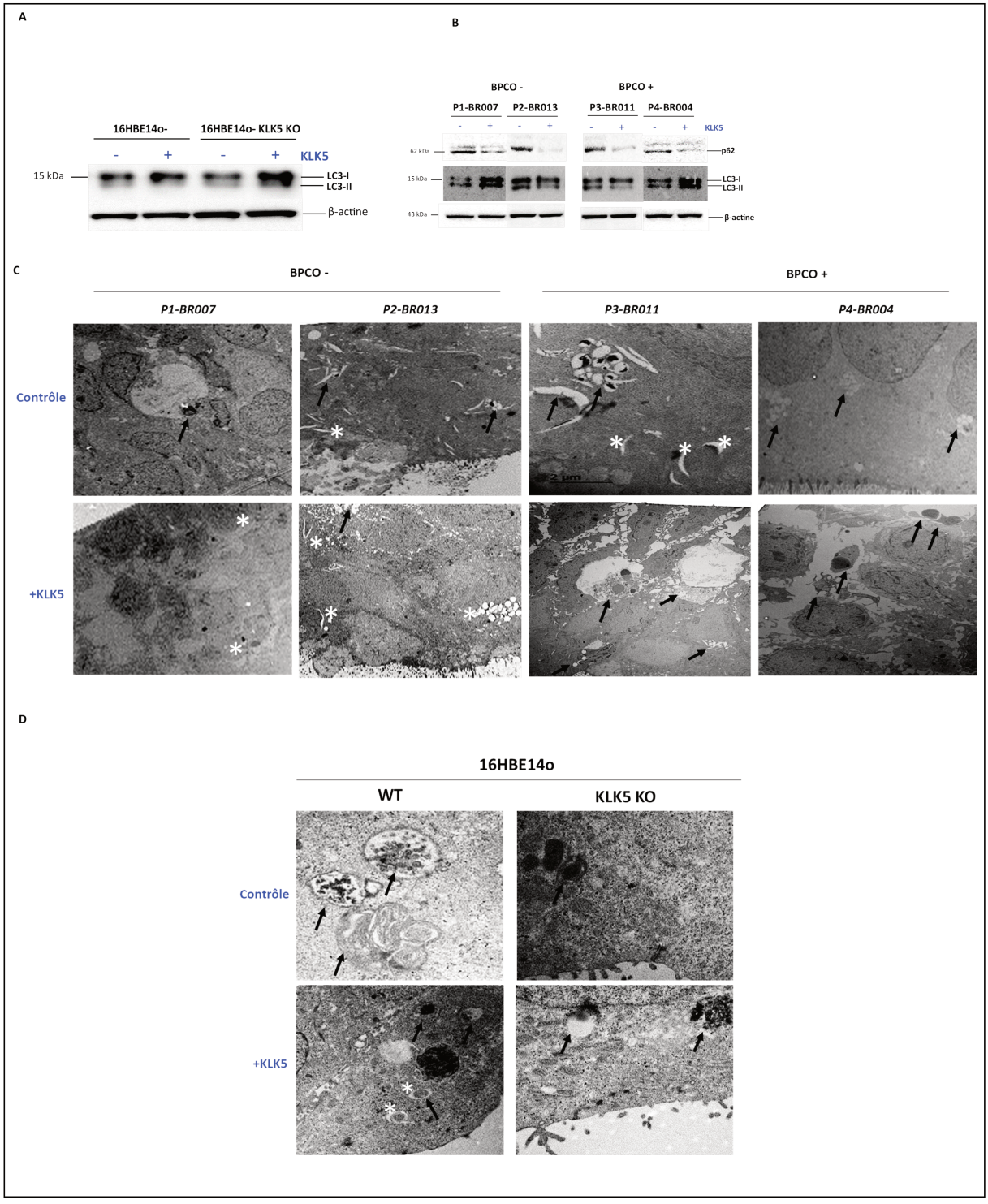


Figure 43: Etude de l'autophagie dans les cellules 16HBE WT, KLK5 KO, primaires non différenciées ainsi que dans les épithéliums bronchiques reconstitués à partir de ces différentes cellules épithéliales. *A) Expression des protéines LC3-I et LC3-II dans les lignées cellulaires, étudiées par immunoempreinte. B) Expression protéique détectée par western blotting des protéines p62, LC3-I et LC3-II dans les cellules épithéliales primaires de patients. C et D) Microscopie électronique à transmission des épithéliums reconstitués à partir des cellules primaires (C) et des lignées cellulaires (D) en présence (+KLK5) ou non (contrôle) de la rhKLK5. Les autophagosomes sont indiqués par une flèche noire et l'autophagie précoce par une étoile blanche.*

Les épithéliums reconstitués à partir de ces cellules de patients ont également permis d'étudier les structures autophagiques par microscopie électronique à transmission (figure 43C). Peu de structures autophagiques ont été observées dans les épithéliums reconstitués à partir de cellules épithéliales des patients P1 et P4. En revanche, nous avons remarqué la présence de nombreux autophagosomes (flèche noire) et d'éléments d'autophagie précoce (étoile blanche) dans les épithéliums reconstitués à partir des cellules des patients P2 et P3.
Le nombre d'autophagosomes semblait augmenter dans les épithéliums reconstitués à partir des cellules épithéliales des patients P2, P3 et P4 qui ont été traités par de la rhKLK5. Les épithéliums reconstitués à partir des cellules de patients BPCO+ (P3 et P4) semblent présenter plus d'autophagosomes (autophagie tardive) en présence de la KLK5 que ceux obtenus à partir de cellules épithéliales des patients BPCO- (P1 et P2) mais il est difficile de conclure avec un effectif si faible et sans une réelle quantification.

L'ensemble de ces résultats obtenus avec les lignées cellulaires, les cellules épithéliales de patients ou les épithéliums reconstitués à partir de ces différentes cellules épithéliales démontre que la rhKLK5 induit l'autophagie dans l'épithélium bronchique.

Discussion et perspectives

Discussion

Les travaux réalisés au cours de ma thèse avaient pour but d'étudier l'implication de la KLK5 dans les mécanismes de remodelage, incluant l'EMT, et de réparation de l'épithélium bronchique associés à la BPCO. En effet, au cours cette pathologie, des anomalies de réparation et un remodelage tissulaire sont observés.

Pour étudier l'ensemble des mécanismes impliqués dans ces processus, mettant en jeu successivement des étapes de dé-différenciation des cellules épithéliales, de migration et de prolifération cellulaires, pour recouvrir les sites de lésion, et enfin de re-différenciation des cellules pour former de nouveau un épithélium bronchique pseudostratifié, il était indispensable d'utiliser des modèles d'étude reflétant au mieux la réalité physiopathologique. Pour cela, dans la partie I et II de ce travail, nous avons sélectionné et caractérisé deux types cellulaires avec d'une part des lignées immortalisées de cellules épithéliales bronchiques, les cellules BEAS-2B et 16HBE14o- (Reddel et al., 1989 ; Cozens AL et al., 1994) et d'autre part des cellules épithéliales bronchiques primaires issues de patients opérés pour une tumeur bronchopulmonaire, mais provenant de la zone non tumorale.

Les cellules BEAS-2B ont initialement été sélectionnées car elles produisent très peu de KLK5, nous permettant ainsi d'étudier les effets de la KLK exogène sur ces cellules épithéliales bronchiques. A l'opposé, les cellules 16HBE14o- expriment de grande quantité de KLK5 et cette production endogène de KLK5 a été efficacement inhibée par la technique CRISPR/Cas9, nous permettant d'obtenir des cellules 16HBE KLK5 KO.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé phénotypiquement les modèles cellulaires utilisés dans le projet. Pour déterminer les caractéristiques épithéliales des cellules, nous avons étudié la E-cadhérine et la β-caténine. La vimentine, un marqueur mésenchymateux a été recherchée dans les cellules BEAS-2B, 16HBE14o- et 16HBE KLK5 KO et dans les cellules primaires issues des patients atteints ou non de BPCO.

Nous avons tout d'abord montré que la lignée BEAS-2B est composée de cellules présentant une perte des caractéristiques épithéliales (E-cadhérine et β-caténine) au profit de caractéristiques mésenchymateuses (vimentine), alors que les cellules 16HBE14o- présentaient une forte expression des marqueurs épithéliaux. Ces données sont en accord avec l'étude de Heijink et ses collaborateurs, qui ont décrit les 16HBE14o- comme un modèle d'étude de la barrière épithéliale, exprimant fortement les jonctions cellulaires et les BEAS-2B comme un modèle d'étude des mécanismes d'adhérence cellulaire (Heijink et al., 2010). En effet, ces cellules BEAS-2B, en partie déjà engagées dans l'EMT, nous ont permis de

montrer que la protéase exogène exerçait une activité protéolytique vis-à-vis des protéines des jonctions adhérentes (β-caténine) et de certaines intégrines (α5β1 et α4β6). Ces actions ont eu pour conséquence de favoriser le détachement des cellules BEAS-2B et d'augmenter leur potentiel migratoire suite à l'activation de la voie de signalisation des MAPKinases. Une étude récente a émis l'hypothèse que ces cellules BEAS-2B auraient des caractéristiques proches des cellules souches mésenchymateuses du cordon ombilical, qui sont également des cellules progénitrices (Han et al., 2020). Dans la BPCO il a été montré que certaines protéases induisent la TEM des cellules épithéliales. Ces dernières migrent ensuite vers les brèches de la membrane basale pour se différencier en myofibroblastes et induire le remodelage de la MEC (Sohal et al., 2011 ; Sohal et al., 2010 ; Pain et al., 2014). Au vu de l'ensemble de ces données de la littérature, nos résultats apportent une preuve, avec les cellules BEAS-2B, que la KLK5 pourrait induire la TEM des cellules de type basale et augmenter leur migration à travers une membrane basale déjà fragilisée ou fissurée comme observé dans la BPCO. Ces cellules basales différenciées en myofibroblastes participeraient alors au remodelage de la matrice extracellulaire, à l'épaississement des bronches et à l'obstruction des voies aériennes.

Par ailleurs, à l'aide de la lignée 16HBE14o- exprimant fortement la KLK5, nous avons étudié l'impact de la KLK5 endogène sur ces cellules présentant des caractéristiques épithéliales. L'obtention, à partir de cette lignée, des cellules 16HBE KLK5 KO, invalidées pour KLK5, a constitué également un bon modèle pour observer les effets de l'ajout de KLK5 exogène. Nous avons montré que l'invalidation de la KLK5 a augmenté l'expression de la E-cadhérine dans les cellules 16HBE KLK5 KO, améliorant encore les caractéristiques épithéliales des 16HBE14o-. Ces données sont confortées par une étude récente qui a démontré l'augmentation des jonctions desmosomales et la localisation membranaire de la β-caténine dans les kératinocytes de souris dont le gène de la *KLK5* a été invalidé (Pampalakis et al., 2019). Parallèlement à l'expression accrue de la E-cadhérine, une augmentation de celle des intégrines α5, β1 et β3, ainsi que la réduction du clivage de l'intégrine β4 ont été observées dans les cellules 16HBE KLK5 KO, réduisant le temps de réparation cellulaire de la brèche. L'ajout de la KLK5 exogène a ralenti la réparation de cette brèche et a réduit l'expression des intégrines et de la E-cadhérine. Nous avons ainsi clairement démontré que la KLK5 altère la réparation de l'épithélium bronchique. Comme la KLK5, certaines protéases y compris les MMP, ont été décrites pour freiner ou empêcher la réparation tissulaire au cours de la BPCO (Perotin et al., 2014 ; Howell et al., 2018).

L'étude des marqueurs de la TEM et de l'expression de la KLK5 dans les cellules primaires non différenciées, en culture immergée, a montré une expression membranaire

réduite des marqueurs épithéliaux et une forte expression de la vimentine. A ce stade, ces cellules ont encore des caractéristiques proches des cellules basales de l'épithélium bronchique (Hiemstra et al., 2018). Aucune différence d'expression n'a cependant été observée entre les cellules des patients BPCO- et BPCO+. En raison du faible nombre de patients inclus dans notre étude, nos résultats sont à interpréter avec prudence. Afin de corréler nos résultats avec le statut BPCO ou non, l'analyse d'un effectif plus grand sera nécessaire. Nos modèles cellulaires ont été cultivés en ALI, pour les différencier et développer leurs caractéristiques épithéliales. Cette différenciation a montré que les épithéliums des cellules BEAS-2B avaient une mauvaise intégrité par rapport aux autres épithéliums. Ces résultats sont cohérents avec l'étude de Heijink et ses collaborateurs, qui suggérait déjà que les cellules BEAS-2B en culture immergée n'étaient pas adaptées à l'étude de l'intégrité et de la réparation cellulaire. Ici nous fournissons une preuve supplémentaire, en accord avec l'équipe de Stewart, que même après leur différenciation en ALI, les cellules BEAS-2B ne permettent pas de reconstituer un épithélium pseudostratifié (Stewart et al., 2012).

Nous avons aussi observé que l'intégrité des épithéliums issus des cellules primaires était meilleure que celle des épithéliums différenciés à partir des 16HBEWT. Néanmoins, l'invalidation de la KLK5 a largement amélioré l'intégrité des épithéliums reconstitués. En effet, les épithéliums obtenus avec les cellules 16HBEWT ou avec les cellules primaires étaient plus épais que ceux différenciés à partir des cellules 16HBE KLK5 KO. L'étude des jonctions desmosomales, par observation des épithéliums en microscopie électronique à transmission, n'a pas montré de différence entre les différents épithéliums. Ces trois modèles apparaissent donc tous adaptés et complémentaires pour l'étude de l'intégrité de la barrière épithéliale. Le nombre de desmosomes était en revanche augmenté dans une étude où l'expression de la KLK5 avait été inactivée dans des cellules de carcinome de la cavité orale (Jiang et al., 2011). En ce qui concerne l'ultrastructure des cils, nous avons observé des cils plus courts avec les épithéliums des cellules 16HBE (WT et KLK5 KO) par rapport à ceux des cellules primaires. L'invalidation de la KLK5 n'a pas eu un effet particulier sur la longueur des cils. Pour confirmer cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier plus précisément les mécanismes de cilogenèse impliquant le gène *FOXJ1* en présence ou en absence de la KLK5. Cependant, ces résultats démontrent qu'il est indispensable d'utiliser des cellules primaires différenciées en ALI pour étudier l'ultrastructure des cils ou la clairance mucociliaire.

Nous avons également montré que les épithéliums des cellules 16HBE WT présentaient des cellules à mucus capables d'en produire mais ce dernier était beaucoup plus étalé sur les cils, alors qu'il restait plus localisé à la surface des cellules à mucus avec les 16HBE KLK5 KO. La KLK5, comme la KLK12, a été décrite comme capable de cliver les mucines MUC4 et MUC5B et pourrait contribuer à fluidifier les secrétions vaginales (Shaw et al., 2008). Un processus similaire pourrait se produire au niveau de l'épithélium bronchique. Ces données montrent l'implication de la KLK5 dans les mécanismes de production et/ou de structuration du mucus. De manière intéressante, nous avons observé que les épithéliums issus des cellules de patients BPCO+ étaient plus épais et produisaient également plus de mucus comparés aux épithéliums des BPCO-. Plusieurs études ont démontré l'implication des protéases, particulièrement la MMP-9 ou la cathepsine G, dans l'hypersécretion du mucus au cours de la BPCO (Rogers et al., 2007 ; Chillappagari et al., 2015). Une étude récente a montré que la glycoprotéine transmembranaire, CD147 (ou EMMPRIN, *Extracellular Matrix Metallo Proteinase Inducer*), un inducteur des métalloprotéases, induit la production du mucus par l'intermédiaire de la MMP-9 et l'activation de la voie MAPKinase dans la BPCO (Yu et al., 2019). L'élastase des PNN et l'activation de la voie EGFR ont aussi été incriminées dans l'hypersécretion du mucus dans le contexte de la BPCO (Kim et al., 2004). De plus, l'hypertrophie des glandes séro-muqueuses, l'hyperplasie des cellules calciformes et l'hypersécrétion du mucus sont décrits comme les facteurs favorisant l'épaississement de la paroi des bronches dans cette pathologie (Hogg et al., 2004 ; Schamberger et al., 2015). Ainsi, le fait que les épithéliums différenciés à partir des cellules 16HBE WT et des cellules de patients BPCO, très épais et produisant beaucoup de mucus, soutient fortement l'hypothèse de l'implication de la KLK5 dans le remodelage et l'épaississement de l'épithélium bronchique dans le contexte de cette pathologie. Des études approfondies seraient nécessaires pour démontrer l'induction de la production du mucus après ajout de la KLK5. Il pourrait s'agir d'étudier l'expression génique et protéique de MUC5AC dans les épithéliums 16HBE WT et KLK5 KO. Les effets de la KLK5 recombinante sur l'expression de MUC5AC dans les cellules BEAS-2B pourraient aussi être étudiés.

Les épithéliums reconstitués à partir des cellules des patients BPCO+ ont été essentiels pour étudier l'ajout de la KLK5 exogène. Nous avons ainsi montré que la protéase est responsable d'une amplification du processus de dégradation du pôle basal de ces épithéliums, déjà fragilisés en absence de KLK5. Ces effets étaient associés à la diminution de l'expression de la E-cadhérine et de la β-caténine, également localisées du coté basal des cellules épithéliales. Les épithéliums obtenus à partir des cellules primaires exprimant la

KLK5 montraient aussi une faible expression des protéines des jonctions adhérentes, la E-cadhérine et la β-caténine. En revanche, aucun effet n'a été observé sur les jonctions desmosomales, situées au pôle apical de ces cellules. Ces résultats ont donc démontré un effet beaucoup plus marqué de la KLK5 au pôle basal des épithéliums où se situent les cellules basales, considérées comme des cellules progénitrices, et dont l'implication dans la régénération tissulaire est reconnue (Dupuit et al., 2000).

En raison du fait que la KLK5 dégrade les protéines de jonctions cellulaires/intégrines et que l'autophagie, la voie majeure de dégradation des protéines endommagées soit fortement activée dans la BPCO, nous avons étudié l'induction de ce processus par la KLK5. Nous avons montré que la KLK5 induit l'autophagie dans les lignées cellulaires, les cellules épithéliales non différenciées des patients ou dans les épithéliums reconstitués à partir de ces cellules. Dans le contexte de la BPCO, nos résultats sont cohérents avec de nombreuses études qui ont démontré l'induction de l'autophagie par les extraits de fumée de cigarette dans les cellules épithéliales bronchiques (Chen et al., 2008 ; Chen et al., 2010 ; Fuji et al., 2012). Dans la même optique, une étude a également montré que l'élastase des PNN augmente l'autophagie médiée par l'activation des voies MAPKinase 8, MAPKinase 14/p38MAPKinase qui inactive mTOR (Hou et al., 2014). Pour affiner cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier les voies de signalisation impliquant l'activation de l'autophagie par la KLK5. Par exemple, la voie Ca^{2+}/CamKKinase β/AMPKinase/mTOR activée lors de l'autophagie induite par le stress oxydant ou l'hypoxie serait une voie intéressante à explorer (Papandreou et al., 2008 ; Mungai et al., 2011 ; Gusarova et al., 2011).

Il est maintenant bien établi que dans les pathologies inflammatoires telle que la BPCO, le déséquilibre de la balance protéases/anti-protéases en faveur des protéases est un élément majeur de la pathogenèse de cette maladie qui résulte notamment de l'infiltration de cellules inflammatoires au niveau bronchique (Strockley et al., 1999 ; Dey et al., 2018). Ces cellules, ainsi que les cellules épithéliales et endothéliales libèrent des facteurs de croissance ou des cytokines qui augmentent la sécrétion des protéases (Kraen et al., 2019) ou la dégradation des inhibiteurs par les protéases (Cavarra et al., 2001 ; Shapiro et al., 2003). Le stress oxydant, souvent associé à la fumée de cigarette, participe également au déséquilibre de la balance en faveur des protéases par inactivation des inhibiteurs de protéases et par l'hypersécrétion des protéases (Churg et al., 2004). Des études précédentes ont montré que la KLK5 pouvait également être induite dans les cellules inflammatoires, particulièrement par les PNN après leur stimulation par un mélange de cytokines (Lizama et al., 2015 ; Li et al.,

2019). Une autre étude a montré que la sécrétion de la KLK5 était induite dans les voies aériennes inférieures, et plus particulièrement dans les cellules épithéliales, par le virus de la grippe (Magnen et al., 2017). C'est la raison pour laquelle nous avons étudié l'induction de la KLK5 par les cytokines pro-inflammatoires et le stress oxydant, mimé par le peroxyde d'hydrogène, dans les cellules BEAS-2B, exprimant faiblement la KLK5 endogène. Nous avons montré que l'expression de la KLK5 était fortement augmentée à partir de 6 heures de traitement des cellules BEAS-2B par les cytokines pro-inflammatoires IL-8, IL-1β et IL-6. Le stress oxydant, a également augmenté l'expression de la KLK5 dans ces cellules. L'expression de la KLK5 dans les cellules cutanées est également bien décrite dans la littérature (Johnson et al., 2016 ; Zhu et al., 2017 ; Ortloff et al., 2020). Dans les kératinocytes, le calcium, la 1,25 $(OH)_2$ vitamine D3, l'acide 9-cis et 13-cis rétinoïque induisent fortement l'expression des ARNm de la KLK5. Contrairement à ce que nous avons observé pour les cellules bronchiques, les cytokines (TNFα, TGF-β, IL-8 et IL-6) n'ont aucun effet sur l'induction de la KLK5 par les kératinocytes (Morizane et al., 2010). Cependant, aucune donnée concernant les effets de ces cytokines pro-inflammatoires sur l'expression de la KLK5 dans les cellules épithéliales bronchiques n'est actuellement disponible.

De plus, la KLK5 a été identifiée comme un activateur initiateur de l'inflammation dans la peau, responsable de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-8, l'IL-10 ou le TSLP via la voie de signalisation PAR-2/NF-κB (Briot et al., 2009 ; Furio et al., 2014 ; Kasparek et al., 2017). Dans le contexte de la BPCO, nos résultats pourraient suggérer une boucle d'amplification de l'inflammation, impliquant d'une part les cytokines pro-inflammatoires, qui induisent l'expression de la KLK5 et de l'autre, la KLK5 qui augmente la production des cytokines *via* la voie PAR-2/NF-κB.

Nos travaux ont également montré une augmentation, dès 30 minutes et jusqu'à 24 heures, de la KLK5 dans les cellules BEAS-2B lorsque ces dernières sont incubées en présence de KLK5 recombinante. L'étude des transcrits n'a montré qu'une faible induction des ARNm de la KLK5, n'expliquant pas la forte expression protéique retrouvée à 30 minutes. Par ailleurs, l'inhibition de la transcription avec l'actinomycine D ou de la synthèse avec la cyclohéximide n'a montré aucune diminution de l'induction de la KLK5 par la rhKLK5. Pour définitivement écarter cette hypothèse d'induction de synthèse de la protéase, il serait intéressant de vérifier ces résultats et d'inclure d'autres contrôles internes à cette expérience.

Nous avons également étudié l'hypothèse de l'internalisation de la rhKLK5 par les cellules BEAS-2B. Cependant, les anticorps dirigés contre l'étiquette histidine couplée à la rhKLK5 n'ont pas été assez sensibles pour la détecter. Des études supplémentaires sont nécessaires pour étayer cette hypothèse. Il serait possible d'étudier par exemple, la quantité de rhKLK5 restant dans le milieu de traitement des cellules au cours du temps. Le but serait de montrer la réduction de la rhKLK5 au cours du temps dans ce milieu, témoignant de l'internalisation de la protéase. Des études plus fines pourraient également être réalisées avec une protéine recombinante couplée avec une étiquette fluorescente. Une co-localisation de la protéine dans différents compartiments cellulaires (cavéoles, clathrines, lysosomes, etc.) permettrait de tracer et de confirmer clairement cette hypothèse. Dans cette perspective d'internalisation de la protéase, des études ont décrit une famille de protéases, les nexines, qui sont capables de former des liaisons covalentes avec des protéases impliquées dans l'hémostase telles que la thrombine et l'urokinase. Ces protéases, fixées aux nexines, se lient aux cellules et sont ensuite internalisées et dégradées par la voie lysosomale (Knauer et al., 1983). Ce type de mécanisme, permettant aux cellules de surveiller et de réguler sélectivement les protéases à sérine, pourrait être une piste intéressante dans la régulation de la KLK5. D'autres mécanismes ont été décrits, tels que l'internalisation dans des fibroblastes du complexe FT-VIIa-PAR pour activer différentes voies de signalisation (Mandal et al., 2007).

Les voies de signalisation induites par l'addition de la KLK5 sur les cellules épithéliales BEAS-2B ont également été criblées. C'est ainsi que nous avons observé une augmentation de la phosphorylation de MEK1/2 (S218/S222 ; S222/S226) et de ERK1/2 (T202/Y204 ; T185/Y187), témoignant de l'activation de cette voie de signalisation impliquée dans la migration et/ou la survie cellulaire. L'activation de cette voie des MAPKinases *via* la phosphorylation de ERK1/2 est également impliquée lors de la synthèse d'autres protéases et plus particulièrement celle des MMP (Cepeda et al., 2017 ; Chen et al., 2019). L'activation de la voie MAPKinase par la rhKLK5 pourrait aussi induire l'expression d'autres protéases et en particulier sa propre expression, comme nous l'avons observé dans nos résultats.

Les voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire ont par ailleurs été inhibées par la KLK5 dans les cellules BEAS-2B. En effet, la phosphorylation des protéines CREB (S133) et c-Jun sont souvent associées avec la prolifération cellulaire et la croissance tumorale (Wang et al, 2015b ; Vleugel et al, 2006). La voie de signalisation Wnt/β-caténine/ GSK3α/β (S21:S9) est également impliquée dans la prolifération cellulaire, dans la polarisation et l'homéostasie tissulaire (Logan et al., 2004). De manière intéressante, cette

voie WNT/β-caténine est inactivée dans les tissus issus des fumeurs et des patients BPCO (Shi et al., 2017 ; Wang et al., 2011).

L'inhibition de la voie FAK/Hck/PLC1-γ par la KLK5 pourrait avoir des conséquences sur l'adhérence cellulaire, la prolifération et l'apoptose des cellules BEAS-2B, qui sont des mécanismes fortement incriminés dans la physiopathologie de la BPCO.

De manière cohérente avec les résultats du criblage des voies de signalisation, nos résultats ont montré que la KLK5 réduisait significativement l'adhérence des cellules BEAS-2B à la fibronectine et plus faiblement à la laminine. Ces effets étaient la conséquence d'un clivage direct, par la rhKLK5, des intégrines α5β1 et α6β4, générant des fragments de 105 kDa à 40 kDa. Simultanément, un produit de clivage de la fibronectine de 85 kDa a été généré par la KLK5. De nombreuses études ont démontré le clivage de la fibronectine par différentes protéases telles que les MMP ou la Cathepsine D (Markovic et al., 1983 ; Zhang et al., 2012). Par exemple, les MMP-13 et -14 génèrent des fragments de 70 kDa, 52 kDa, 40 kDa, 32 kDa et 29 kDa de la fibronectine. Le fragment de 70 kDa est un fragment pro-inflammatoire du domaine N-terminal de la fibronectine, qui se lie aux cellules empêchant la fixation de la fibronectine entière (Tomasini-Johansson et al., 2006). Seul, le fragment de 40 kDa est comparable à ceux générés par la KLK5. Le fragment de 85 kDa également obtenu après clivage par la KLK5 a été décrit comme un fragment contenant le domaine oncofoetal EDB (*ExtraDomain-B*) de la fibronectine, connu pour se fixer aux intégrines αvβ3 (Borsi et al., 1991). De plus, dans notre étude, la perte d'adhérence induite par la KLK5 a été associée avec la migration des cellules BEAS-2B par activation de la voie MAPKinase, *via* la phosphorylation de c-Raf, de MEK1/2 et ERK1/2. Ces résultats suggèrent que la KLK5 pourrait agir dans la BPCO en remodelant directement la MEC et les intégrines α5β1 et α6β4. Ces observations corroborent les résultats de notre équipe montrant que la fibronectine était clivée par la KLK12, induisant ainsi la migration des cellules endothéliales avec l'acquisition de caractéristiques pro-angiogéniques (Kryza et al., 2018). La KLK12 a généré plusieurs fragments d'environ 105, 85, 55 et 29 kDa. Parmi ces fragments, celui d'environ 105 kDa pourrait correspondre à celui obtenu en présence de la KLK5. Ces mécanismes de remodelage de la MEC sont également retrouvés dans les maladies pulmonaires chroniques, y compris la BPCO (Ito et al., 2019 ; Burgstaller et al., 2017). De plus, les clivages des intégrines et de la fibronectine ont été inhibés dans notre étude par le TFPI-2, un inhibiteur efficace de la KLK5 que nous avons identifié. En effet, le TFPI-2, connu pour inhiber la trypsine et la plasmine, est également un inhibiteur efficace de la KLK5 avec un Ki de 3,8 nM. Ce nouvel inhibiteur de KLK5 neutralise l'activité de la protéase aussi efficacement que les inhibiteurs de type

Kazal (SPINK5/LEKTI-1 et SPINK6). Le TFPI-2, connu comme un suppresseur de tumeur, pourrait jouer un rôle différent dans les pathologies non cancéreuses en agissant comme un régulateur de l'activité de la KLK5 dans la MEC et pourrait donc participer à l'équilibre de la balance protéase/anti-protéases.

Afin d'étudier l'implication de la KLK5 endogène sur les mécanismes de réparation de l'épithélium bronchique, nous avons utilisé le modèle des cellules 16 HBE WT ou KLK5 KO, exprimant fortement la protéase endogène pour les premières et invalidées pour KLK5 dans les secondes. Grâce au criblage des protéases et inhibiteurs de protéases à partir des lysats des cellules 16HBE KLK5 KO, nous avons mis en évidence que l'invalidation de KLK5 avait modulé l'expression de certaines protéases et de leurs inhibiteurs. Ceci nous a permis d'identifier plusieurs autres protéases susceptibles d'agir en réseau avec la KLK5. Ces résultats devront cependant être vérifiés par immunoempreinte.

En effet, l'invalidation de la KLK5 a fortement inhibé l'expression de certaines protéases de la famille des cathepsines (Cat), notamment les Cat D et V. Dans cette optique, une étude a rapporté la présence simultanée de plusieurs protéases dans la salive des patients atteints de carcinome épidermoïde de la cavité buccale, notamment les protéases MMP-1, -2, -10, ADAM-9 et -13, la cathepsine V et la KLK5. Les auteurs ont ainsi démontré que l'association cathepsine V/KLK5/ADAM9 serait un biomarqueur pour détecter ce type de cancer (Feng et al., 2019). Nos résultats suggèrent que la KLK5 pourrait participer à la régulation de l'expression de la Cat D, dont l'expression est fortement réduite suite à l'invalidation de la KLK5 dans les cellules 16HBE14o-. Comme les KLK, la Cat D est impliquée dans la dégradation de la MEC et permet le relargage de facteurs de croissance dont le β-FGF. De plus, dans les cellules de cancer gastrique, l'invalidation de la Cat D a induit une augmentation de l'expression de la E-cadhérine et inversement (Yang et al., 2017). Lorsque des cellules cancéreuses ovariennes sont exposées à des extraits de fumée de cigarette, une augmentation de la Cat D a été observée et pourrait participer au processus de l'EMT (Jeon et al., 2016). En revanche aucune différence du taux de la Cat D n'a été observée dans le sang de volontaires, non fumeurs et sans COPD, et dans le sang de fumeurs présentant une COPD. Il pourrait donc être intéressant de rechercher les mécanismes reliant la KLK5 et la Cat D car à l'heure actuelle, aucune association n'a été établie entre ces deux protéases.

Inversement, l'invalidation de la KLK5 a légèrement augmenté l'expression des protéases uPA/urokinase, ADAM9, cathepsine B et la protéase DPP-4/CD26 (DiPeptidyl Peptidase 4). Il a été précédemment montré que l'expression de l'uPA était augmentée dans l'épithélium bronchique de patients fumeurs atteints de BPCO et dans des cellules épithéliales

pulmonaires des petites voies respiratoires traitées par des extraits de fumée de cigarette. La surexpression de l'uPA dans ces cellules induit un processus de TEM avec une perte d'interaction entre les cellules, leur allongement, une augmentation de l'expression de la vimentine et une diminution de la E-cadhérine ainsi qu'une augmentation de la migration (Wang et al., 2015). La fixation de l'uPA à son récepteur uPAR est nécessaire pour induire ce mécanisme puisque l'invalidation d'uPAR dans ces cellules surexprimant uPA empêche l'induction de la TEM. De plus l'uPA permet l'activation du plasminogène en plasmine qui est bien connue pour participer à la dégradation de la MEC directement et indirectement en activant certaines MMP. Dans nos cellules 16HBE KLK5 KO, nous avons également une modulation parallèle de l'uPA et du PAI-1, mais dans le sens d'une augmentation. Le PAI-1 est également impliqué dans le déclenchement de l'internalisation de l'intégrine β1, favorisant la TEM et la migration cellulaire (Higgins et al., 2011). Toutes ces études suggèrent donc une régulation étroite entre les 2 systèmes protéasiques, uPA/uPAR et celui des KLK. De plus, le TFPI-2 qui inhibe la KLK5, est connu pour inhiber la plasmine qui est générée à partir du plasminogène grâce à l'uPA (Chand et al., 2005). HAI-2 (*hepatocyte growth factor activator inhibitor*) est le seul inhibiteur de protéase qui a été diminué dans les cellules invalidées pour KLK5. HAI-2 est un inhibiteur de facteur de croissance surtout connu pour être impliqué dans l'inhibition de l'invasion de cellules tumorales pulmonaires (Wu et al., 2019). Dans ces mêmes cellules, HAI-2 inhibe la TEM avec réapparition de l'expression de la E-cadhérine.

La DPP-4/CD26, induite dans les cellules 16HBE KLK5 KO, est une aminopeptidase capable de dégrader de nombreuses molécules telles que des cytokines ou des chimiokines mais participe également à la régulation de l'adhérence, de la TEM et de l'invasion cellulaire (Zou et al., 2020). L'incubation de cellules 16HBE avec de la DPP-4 recombinante soluble a induit une diminution de l'expression de la E-cadhérine tandis que celle de α−SMA était augmentée avec une potentialisation de la TEM induite par le TGF-β1 (Sun et al., 2020). Le rôle de la DPP-4 dans les pathologies pulmonaires est en train d'émerger, notamment dans le cancer pulmonaire, mais pour le moment les liens avec la COPD n'ont pas été déterminés. Dans une autre étude où la DPP-4 a été surexprimée dans des cellules de carcinome ovarien, une augmentation de l'expression de la E-cadhérine et de la β-caténine a été associée avec un changement morphologique des cellules, qui d'un aspect fibroblastique ont pris un aspect épithélial, et s'est accompagnée d'une diminution de leur potentiel invasif (Kajiyama et al., 2003). Cela indique à nouveau que selon l'origine des cellules étudiés, l'addition exogène ou la surexpression endogène, des effets différents peuvent être observés. De plus, dans les

cellules de carcinome ovarien surexprimant la DPP-4, la MMP-2 et la MT1-MMP ont été diminuées tandis que les inhibiteurs de MMP, TIMP-1 et TIMP-2 ont été augmentés. Dans notre étude, le TIMP-2 a également été augmenté conjointement à la DPP-4. TIMP-2 est un inhibiteur des MMP et de facteurs de croissance et participe ainsi à l'inhibition de la dégradation de la MEC. De plus, TIMP-2 inhibe le processus de TEM dans des cellules tumorales mammaires en diminuant l'expression de la vimentine et des facteurs de transcription associés à l'EMT (Peeney, et al., 2020).

Il serait par ailleurs intéressant d'étudier le lien KLK5/ADAM9 (*A Disintegrin And Metalloprotease*) laquelle est une métalloprotéase capable de cliver aussi la fibronectine, libérant ainsi des facteurs de croissance. Elle possède également un domaine disintégrine capable de fixer les intégrines. L'addition du domaine disintégrine recombinant d'ADAM9 à des kératinocytes, qui interagit avec l'intégrine β1, a induit une augmentation de l'expression de la MMP-9 et augmenté la mobilité de ces cellules (Zigrino et al., 2007). *In vivo*, la migration des kératinocytes est aussi un processus important lors de la réparation des lésions épithéliales de la peau et présente des analogies avec les réparations de l'épithélium bronchique lésé. Ceci est d'autant plus intéressant que ADAM9 a été retrouvée augmentée dans les cellules épithéliales et les macrophages alvéolaires issus de biopsies endobronchiques de patients atteints de BPCO (Wang et al., 2018b).

L'invalidation de la KLK5 a aussi augmenté l'expression de certains inhibiteurs de protéases dont la SERPINE B8 (*protease Inhibitor 8*), TIMP-2, et HE4/WFDC2. Les SERPINES sont des inhibiteurs particulièrement bien décrits pour inhiber l'activité des kallicréines, y compris celle de la KLK5 (Jendrny et al, 2016 ; Michael et al, 2005b). L'augmentation de la SERPINE B8 dans les cellules invalidées pour la KLK5 suggère son implication dans la balance protéase/anti-protéase. Cette SERPINE joue aussi un rôle dans l'adhésion cellulaire en régulant les protéines desmosomales (Pigors et al., 2016).

Les TIMP sont également connus pour inhiber l'activité des MMP dans le poumon sain et dans la BPCO où leur expression est souvent diminuée (Uysal et al., 2019). Bien que notre technique ne nous ait pas permis d'identifier les MMP exprimées dans les 16HBE KLK5 KO, l'augmentation de TIMP-2 pourrait également refléter l'action indirecte de la KLK5 sur ces MMP. Ainsi, l'invalidation de la KLK5 pourrait réduire l'activité de certaines MMP, ce qui favoriserait l'expression de TIMP-2. Enfin, l'inhibiteur HE4/WFDC2 est décrit comme un biomarqueur dans les cancers de l'ovaire. Une étude a associé une faible expression de HE4 et une surexpression des KLK6 et 7, dans les stades précoces de la maladie (Tamir et al., 2014).

Les protéases et inhibiteurs de protéases modulés lors de l'invalidation de KLK5 ont donc tous été retrouvés dans la littérature comme jouant un rôle dans la dégradation de la matrice extracellulaire et la TEM. Il serait donc maintenant intéressant de rechercher les mécanismes qui les relient, notamment dans le cas de la cat D, la protéase la plus modulée par KLK5 et également le système uPA/uPAR-plasmine dont la régulation par la KLK5 et le TFPI-2 pourrait être un processus important. L'inhibition de la KLK5 pourrait en effet aider à restaurer cette balance protéases/antiprotéases et favoriser la réparation de l'épithélium bronchique. Des études approfondies sont donc nécessaires pour prouver l'existence de ces réseaux, notamment dans un contexte inflammatoire comme dans la BPCO.

En conclusion, notre étude a montré pour la première fois l'implication de la KLK5 dans les mécanismes de remodelage et de réparation de l'épithélium bronchique. A partir des modèles de différenciation ayant mimé de manière pertinente l'épithélium bronchique, nous avons démontré que la KLK5 exogène était capable d'altérer la partie basale des épithéliums bronchiques reconstitués à partir des cellules de patients BPCO+, sans effet notoire du coté apical des épithéliums. Cette altération était associée à une diminution de l'expression des protéines des jonctions épithéliales adhérentes E-cadhérine et β-caténine. D'une part, l'invalidation du gène de la KLK5 dans les cellules épithéliales 16HBE14o-, exprimant fortement la KLK5 et mimant les cellules épithéliales du coté apical des épithéliums, a permis d'améliorer le temps de réparation de la brèche. L'ajout de la KLK5 exogène sur ces cellules invalidées pour la KLK5 a considérablement ralenti cette réparation de la brèche. D'autre part, l'ajout de la KLK5 sur des cellules BEAS-2B, caractéristique des cellules basales à induit la TEM, la perte d'adhérence à la fibronectine et la migration des cellules. Ces effets étaient la conséquence de la dégradation directe de la fibronectine et des intégrines α5β1 et α6β4. De plus, le TFPI-2, un puissant inhibiteur de la KLK5 a inhibé ces effets induits par la KLK5 sur les cellules BEAS-2B, ouvrant une piste intéressante pour cibler cette protéase. Ces observations ont suggéré le rôle de la KLK5 dans la migration des cellules basales à travers la membrane basale et le remodelage des bronches dans la BPCO. Enfin, nous avons montré que la KLK5 pouvait induire l'autophagie dans les épithéliums des cellules de patients non BPCO et BPCO, un phénomène de survie et d'élimination des débris cellulaires, également décrits dans la physiopathologie de la BPCO. Notre étude apporte donc une preuve intéressante sur l'implication de la KLK5 dans le remodelage structurel de l'épithélium bronchique et suggère cette protéase comme une cible thérapeutique dans cette pathologie.

Perspectives

Il est maintenant clairement établi que de nombreuses protéases à sérine, dont les kallicréines tissulaires, à cystéine ou métalloprotéases sont impliquées dans le remodelage tissulaire et matriciel pulmonaire mais aussi dans les processus de réparation lorsque l'épithélium bronchique est agressé, notamment par la fumée de cigarette.

En ce qui concerne la KLK5, il a été montré qu'elle active le récepteur PAR-2, induisant une signalisation dépendante de NF-κB, laquelle est associée à l'expression de nombreux médiateurs de l'inflammation et à la prolifération cellulaire (Stefansson et al., 2006 ; Johnson et al., 2016). Cette voie d'activation de PAR-2 apparaît au cœur d'un réseau aboutissant à la génération de protéases actives lors d'un processus inflammatoire. Ainsi apparaissent de possibles connexions entre différents systèmes protéasiques dont celui des KLK, des MMP mais aussi des protéases dont l'activation dépend du facteur tissulaire dans le processus de la coagulation sanguine.

Le FT, connu comme l'initiateur majeur de la cascade de coagulation, a été récemment décrit pour améliorer la réparation des épithéliums bronchiques après une agression (Davis et al., 2019). Le FT est une glycoprotéine transmembranaire de 47 kDa dont le rôle majeur est de fixer, avec une très grande affinité, les facteurs VII/VIIa (FVII/FVIIa), ses seuls ligands connus, et ainsi d'initier la cascade protéolytique de la coagulation sanguine (Mackman, 2006). Grâce à son domaine cytoplasmique, le FT participe également à l'activation de différentes protéines à activité tyrosine kinase (voies PI3K/AKT, MAPKinases, p38, C-Jun...), associant le FT à une multitude de fonctions au sein de la cellule dont la prolifération, la migration et la survie. Par ailleurs, l'activation des voies de signalisation dépendantes du FT est fréquemment associée à celle des récepteurs PAR-1 et -2 et nécessite la présence du complexe FT/FVIIa (Schaffner & Ruf, 2009). Cette activation des PAR via le FT a d'ailleurs été montrée à la surface de cellules épithéliales basales des voies respiratoires et l'expression du FT par ces cellules contribue à leur survie (Ahmad et al., 2013). Ce FT est aussi impliqué dans la phase d'adhérence des cellules à la MEC et à la membrane basale, via les intégrines $\alpha 3\beta 1$ et $\alpha 6\beta 1$, qui précède la migration (Versteeg et al., 2008). L'association FT/FVIIa/PAR-2 peut aussi promouvoir la migration cellulaire en induisant la libération d'IL-8 dans les cellules tumorales (Hjortoe et al., 2004) mais aussi de la MMP-9 (Lin et al., 2014).

Dans le contexte d'une agression continue de l'épithélium par le tabac, l'épithélium lésé va s'engager dans un processus de réparation. Comme nous l'avons montré, le peroxyde

d'hydrogène, un des composants générés lors de la combustion de la cigarette, ainsi que les cytokines proinflammatoires (TNF-α, IL-8 et IL-1β) induisent une augmentation de l'expression de la KLK5 par les cellules BEAS-2B. Ces cytokines sont également connues pour stimuler l'expression du FT à la surface de nombreux types cellulaires.

En parallèle de nos travaux exposés dans ce document, nous avons initié une étude qui vise à connecter le système des kallicréines, et notamment de KLK5, avec celui de la voie du facteur tissulaire (FT). En effet, comme lors de la réparation de l'endothélium en situation de brèche vasculaire, le FT pourrait aussi favoriser la réparation de l'épithélium bronchique lorsque son expression est induite. Nous avons ainsi obtenu des résultats préliminaires qui montrent que l'addition de KLK5 exogène augmente l'expression des transcrits du *FT* par les cellules BEAS-2B qui en expriment peu à l'état basal. L'activité procoagulante du FT à la membrane de ces cellules était augmentée en parallèle. De plus, l'inactivation de *KLK5* dans les cellules 16HBE14o- entraine également une augmentation des transcrits du FT et de l'activité procoagulante portée par ces cellules. Cette augmentation du FT a également été observée sur les cellules primaires exposées à la rhKLK5.

Ces données de la littérature et nos travaux préliminaires confortent l'intérêt d'étudier les connexions entre différents systèmes protéasiques, en particulier entre les axes FT/FVIIa/PAR-2 et KLK5/PAR-2 pouvant se mettre en place au sein du microenvironnement pulmonaire sain ou dans un contexte inflammatoire comme dans la BPCO. La compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu suite à ce dialogue permettrait d'envisager des pistes de ciblage visant à améliorer les processus de réparation de l'épithélium bronchique. Il serait pertinent de moduler ces activités protéasiques par les inhibiteurs que sont les TFPI, avec le TFPI-1 pour l'axe FT/FVIIa/PAR-2 et le TFPI-2 pour l'axe KLK5/PAR-2.

Références bibliographiques

Abelous, J. E., & Bardier, E. (1909). Les substances hypotensives de l'urine humaine normale. *CR Soc Biol*, 66 (2), 511-512

Adam, D., Perotin, J. M., Lebargy, F., Birembaut, P., Deslée, G., & Coraux, C. (2014). Régénération de l'épithélium des voies aériennes. *Revue des Maladies Respiratoires*, *31 (4)*, 300–311

Adamopoulos, P. G., Kontos, C. K., & Scorilas, A. (2017). Molecular cloning of novel transcripts of human kallikrein-related peptidases 5, 6, 7, 8 and 9 (KLK5 – KLK9), using Next-generation sequencing. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–14.

Adamopoulos, P. G., Tsiakanikas, P., & Scorilas, A. (2018). Kallikrein-related peptidases and associated microRNAs as promising prognostic biomarkers in gastrointestinal malignancies. *Biological Chemistry*, 399 (8), 821–836.

Ahmad, S., Ahmad, A., Rancourt, R. C., Neeves, K. B., Loader, J. E., Hendry-Hofer, T., Di Paola, J., Reynolds, S. D., & White, C. W. (2013). Tissue factor signals airway epithelial basal cell survival via coagulation and protease-activated receptor isoforms 1 and 2. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *48*(1), 94–104.

Alexander, L. E. C., Shin, S., & Hwang, J. H. (2015). Infl ammatory diseases of the lung induced by conventional cigarette smoke a review. *Chest*, *148*(5), 1307–1322.

Andrade, D., Assis, D. M., Santos, J. A. N., Alves, F. M., Hirata, I. Y., Araujo, M. S., Blaber, S. I., Blaber, M., Juliano, M. A., & Juliano, L. (2011). Substrate specificity of kallikrein-related peptidase 13 activated by salts or glycosaminoglycans and a search for natural substrate candidates. *Biochimie*, *93*(10), 1701–1709.

André, S., Conde, B., Fragoso, E., Boléo-Tomé, J. P., Areias, V., & Cardoso, J. (2019). COPD and Cardiovascular Disease. *Pulmonology*, *25*(3), 168–176.

Andresen, M. S., Stavik, B., Sletten, M., Tinholt, M., Sandset, P. M., Iversen, N., & Skretting, G. (2020). Indirect regulation of TFPI-2 expression by miR-494 in breast cancer cells. *Scientific Reports*, *10*(1), 4036

Angelo, P. F., Lima, A. R., Alves, F. M., Blaber, S. I., Scarisbrick, I. A., Blaber, M., Juliano, L., & Juliano, M. A. (2006). Substrate specificity of human kallikrein 6: Salt and glycosaminoglycan activation effects. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(6), 3116–3126.

Ashby, E. L., Kehoe, P. G., & Love, S. (2010). Kallikrein-related peptidase 6 in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Brain Research*, *1363*, 1–10.

Assis, D., Zalazar, L., Juliano, M., Castro, R., & Cesari, A. (2013). Novel Inhibitory Activity for Serine Protease Inhibitor Kazal Type-3 (Spink3) on Human Recombinant Kallikreins. *Protein & Peptide Letters*, *20*(10), 1098–1107.

Aubier, M., Thabut, G., Hamidi, F., Guillou, N., Brard, J., Dombret, M. C., Borensztajn, K., Aitilalne, B., Poirier, I., Roland-Nicaise, P., Taillé, C., & Pretolani, M. (2016). Airway smooth muscle enlargement is associated with protease-activated receptor 2/ligand overexpression in patients with difficult-to-control severe asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *138*(3), 729-739.

Avgeris, M., Papachristopoulou, G., Polychronis, A., & Scorilas, A. (2011). Down-regulation of kallikrein-related peptidase 5 (KLK5) expression in breast cancer patients: A biomarker for the differential diagnosis of breast lesions. *Clinical Proteomics*, *8*(1), 5.

Bagdonas, E., Raudoniute, J., Bruzauskaite, I., & Aldonyte, R. (2015). Novel aspects of pathogenesis and regeneration mechanisms in COPD. *International Journal of COPD*, *10*, 995–1013.

Bai, J. W., Chen, X. X., Liu, S., Yu, L., & Xu, J. F. (2017). Smoking cessation affects the natural history of COPD. *International Journal of COPD*, 12, 3323–3328.

Bandiera, E., Zanotti, L., Bignotti, E., Romani, C., Tassi, R., Todeschini, P., Tognon, G., Ragnoli, M., Santin, A. D., Gion, M., Pecorelli, S., & Ravaggi, A. (2009). Human kallikrein 5: An interesting novel biomarker in ovarian cancer patients that elicits humoral response. *International Journal of Gynecological Cancer*, *19*(6), 1015-21.

Baraldo, S., Turato, G., & Saetta, M. (2012). Pathophysiology of the small airways in chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration*, 84 (2), 89–97.

Barroso, M. V., Cattani-Cavalieri, I., de Brito-Gitirana, L., Fautrel, A., Lagente, V., Schmidt, M., Porto, L. C., Romana-Souza, B., Valença, S. S., & Lanzetti, M. (2017). Propolis reversed cigarette smoke-induced emphysema through macrophage alternative activation independent of Nrf2. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, *25*(20), 5557–5568.

Batra, J., Tracy O'Mara, Patnala, R., Lose, F., & Clements, J. A. (2012). Genetic polymorphisms in the human tissue kallikrein (KLK) locus and their implication in various malignant and non-malignant diseases. *Biological Chemistry*, *393*(12), 1365-90.

Bayés, A., Tsetsenis, T., Ventura, S., Vendrell, J., Aviles, F. X., & Sotiropoulou, G. (2004). Human kallikrein 6 activity is regulated via an autoproteolytic mechanism of activation/inactivation. *Biological Chemistry*, *385*(6), 517–524.

Beaufort, N., Plaza, K., Utzschneider, D., Schwarz, A., Burkhart, J. M., Creutzburg, S., Debela, M., Schmitt, M., Ries, C., & Magdolen, V. (2010). Interdependence of kallikrein-related peptidases in proteolytic networks. *Biological Chemistry*, *391*(5), 581–587.

Berger, P., Laurent, F., Begueret, H., Perot, V., Rouiller, R., Raherison, C., Molimard, M., Marthan, R., & Tunon-de-Lara, J. M. (2003). Structure and function of small airways in smokers: Relationship between air trapping at CT and airway inflammation. *Radiology*, *228*(1), 85–94.

Billi, A. C., Ludwig, J. E., Fritz, Y., Rozic, R., Swindell, W. R., Tsoi, L. C., Gruzska, D., Abdollahi-Roodsaz, S., Xing, X., Diaconu, D., Uppala, R., Camhi, M. I., Klenotic, P. A., Sarkar, M. K., Husni, M. E., Scher, J. U., McDonald, C., Kahlenberg, J. M., Midura, R. J., … Ward, N. L. (2020). KLK6 expression in skin induces PAR1-mediated psoriasiform dermatitis and inflammatory joint disease. *Journal of Clinical Investigation*, *130*(6), 3151–3157.

Blaber, M., Yoon, H., Blaber, S. I., Li, W., & Scarisbrick, I. A. (2013). Activation profiles of human kallikrein-related peptidases by matrix metalloproteinases. *Biological Chemistry*, 394 (1), 137-147

Boers, J. E., Ambergen, A. W., & Thunnissen, F. B. J. M. (1998). Number and proliferation

of basal and parabasal cells in normal human airway epithelium. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *157*(6-1), 2000–2006

Boers, J. E., Ambergen, A. W., & Thunnissen, F. B. J. M. (1999). Number and proliferation of Clara cells in normal human airway epithelium. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *159*(5-1), 1585–1591.

Bonnart, C., Deraison, C., Lacroix, M., Uchida, Y., Besson, C., Robin, A., Briot, A., Gonthier, M., Lamant, L., Dubus, P., Monsarrat, B., & Hovnanian, A. (2010). Elastase 2 is expressed in human and mouse epidermis and impairs skin barrier function in Netherton syndrome through filaggrin and lipid misprocessing. *Journal of Clinical Investigation*, *120*(3), 871-882.

Borgoño, C. A., & Diamandis, E. P. (2004). The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 4(11), 876–890.

Borgoño, C. A., Michael, I. P., Komatsu, N., Jayakumar, A., Kapadia, R., Clayman, G. L., Sotiropoulou, G., & Diamandis, E. P. (2007). A potential role for multiple tissue kallikrein serine proteases in epidermal desquamation. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(6), 3640–3652.

Borsi, L., Balza, E., Leprini, A., Ponassi, M., & Zardi, L. (1991). Procedure for the purification of the fibronection proteolytic fragments containing the ED-B oncofetal domain. *Analytical Biochemistry*, *192*(2), 372–379.

Brännström, K., Öhman, A., Von Pawel Rammingen, U., Olofsson, A., & Brattsand, M. (2012). Characterization of SPINK9, a KLK5-specific inhibitor expressed in palmo-plantar epidermis. *Biological Chemistry*, *393*(5), 369-377.

Brattsand, M., & Egelrud, T. (1999). Purification, molecular cloning, and expression of a human stratum corneum trypsin-like serine protease with possible function in desquamation. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(42), 30033–30040.

Brattsand, M., Stefansson, K., Lundh, C., Haasum, Y., & Egelrud, T. (2005). A proteolytic cascade of kallikreins in the stratum corneum. *Journal of Investigative Dermatology*, *124*(1), 198–203.

Brattsand, M., Stefansson, K., Hubiche, T., Nilsson, S. K., & Egelrud, T. (2009). SPINK9: A selective, skin-specific kazal-type serine protease inhibitor. *Journal of Investigative Dermatology*, *129*(7), 1656-1665.

Briot, A., Deraison, C., Lacroix, M., Bonnart, C., Robin, A., Besson, C., Dubus, P., & Hovnanian, A. (2009). Kallikrein 5 induces atopic dermatitis-like lesions through PAR2-mediated thymic stromal lymphopoietin expression in Netherton syndrome. *Journal of Experimental Medicine*, *206*(5), 1135–1147.

Broderick, J. B. (2001). Coenzymes and Cofactors. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-11

Burda, J. E., Radulovic, M., Yoon, H., & Scarisbrick, I. A. (2013). Critical role for PAR1 in kallikrein 6-mediated oligodendrogliopathy. *GLIA*, *61*(9), 1456–1470.

Burgstaller, G., Oehrle, B., Gerckens, M., White, E. S., Schiller, H. B., & Eickelberg, O. (2017). The instructive extracellular matrix of the lung: Basic composition and alterations in chronic lung disease. *European Respiratory Journal*, 50(1), 1601805

Bützow, R., Lehto, V. P., Ritvos, O., Ranta, T., & Seppälä, M. (1988). Regulation of the

production of placental protein 5 by human endometrial stromal cells; the role of prostaglandins E2 and F2α. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *60*(2–3), 137–143.

Carroll, V. A., & Binder, B. R. (1999). The role of the plasminogen activation system in cancer. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 25 (2), 183–197.

Casalino-Matsuda, Susana M., Monzon, M. E., Conner, G. E., Salathe, M., & Forteza, R. M. (2004). Role of hyaluronan and reactive oxygen species in tissue kallikrein-mediated epidermal growth factor receptor activation in human airways. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(20), 21606–21616.

Casalino-Matsuda, S. Marina, Monzon, M. E., & Forteza, R. M. (2006). Epidermal growth factor receptor activation by epidermal growth factor mediates oxidant-induced goblet cell metaplasia in human airway epithelium. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *34*(5), 581–591.

Caubet, C., Jonca, N., Brattsand, M., Guerrin, M., Bernard, D., Schmidt, R., Egelrud, T., Simon, M., & Serre, G. (2004). Degradation of corneodesmosome proteins by two serine proteases of the kallikrein family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7. *Journal of Investigative Dermatology*, *122*(5), 1235–1244.

Cavarra, E., Lucattelli, M., Gambelli, F., Bartalesi, B., Fineschi, S., Szarka, A., Giannerini, F., Martorana, P. A., & Lungarella, G. (2001). Human SLPI inactivation after cigarette smoke exposure in a new in vivo model of pulmonary oxidative stress. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, *281*(2), 412-417.

Cepeda, M. A., Evered, C. L., Pelling, J. J. H., & Damjanovski, S. (2017). Inhibition of MT1-MMP proteolytic function and ERK1/2 signalling influences cell migration and invasion through changes in MMP-2 and MMP-9 levels. *Journal of Cell Communication and Signaling*, *11*(2), 167–179.

Cerqueira, C., Samperio Ventayol, P., Vogeley, C., & Schelhaas, M. (2015). Kallikrein-8 Proteolytically Processes Human Papillomaviruses in the Extracellular Space To Facilitate Entry into Host Cells. *Journal of Virology*, *89*(14), 7038–7052.

Chand, H. S., Schmidt, A. E., Bajaj, S. P., & Kisiel, W. (2004). Structure-Function Analysis of the Reactive Site in the First Kunitz-type Domain of Human Tissue Factor Pathway Inhibitor-2. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(17), 17500–17507.

Chand, H. S., Foster, D. C., & Kisiel, W. (2005). Strucure, function and biology of tissue factor pathway inhibitor-2. *Thrombosis and Haemostasis*, 94 (6), 1122–1130.

Chao, J., Wood, J. G., Blanco, V. G., & Gonzalez, N. C. (2009). The systemic inflammation of alveolar hypoxia is initiated by alveolar macrophage-borne mediator(s). *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *41*(5), 573–582.

Chapman, S. J., Walsh, A., Jackson, S. M., & Friedmann, P. S. (1991). Lipids, proteins and corneocyte adhesion. *Archives of Dermatological Research*, *283*(3), 167-173.

Charbonnier, J., Pompe, E., Moore, C., Humphries, S., Van, B., Make, B., Regan, E., Crapo, J. D., Van Rikxoort, E. M., D. A., Lynch (2020). Airway wall thickening on CT: Relation to smoking status and severity of COPD. *Respiratory Medicine*, 146, 36-41.

Charest-Morin, X., Raghavan, A., Charles, M. L., Kolodka, T., Bouthillier, J., Jean, M., Robbins, M. S., & Marceau, F. (2015). Pharmacological effects of recombinant human tissue kallikrein on bradykinin B2 receptors. *Pharmacology Research and Perspectives*,

3(2), 1–13.

Chavanas, S., Bodemer, C., Rochat, A., Hamel-Teillac, D., Ali, M., Irvine, A. D., Bonafé, J. L., Wilkinson, J., Taïeb, A., Barrandon, Y., Harper, J. I., De Prost, Y., & Hovnanian, A. (2000). Mutations in SPINK5, encoding a serine protease inhibitor, cause Netherton syndrome. *Nature Genetics*, *25*(2), 141-142.

Chen, Z. H., Kim, H. P., Sciurba, F. C., Lee, S. J., Feghali-Bostwick, C., Stolz, D. B., Dhir, R., Landreneau, R. J., Schuchert, M. J., Yousem, S. A., Nakahira, K., Pilewski, J. M., Lee, J. S., Zhang, Y., Ryter, S. W., & Choi, A. M. K. (2008). Egr-1 regulates autophagy in cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One*, *3*(10), e3316.

Chen, Z. H., Lam, H. C., Jin, Y., Kim, H. P., Cao, J., Lee, S. J., Ifedigbo, E., Parameswaran, H., Ryter, S. W., & Choi, A. M. K. (2010). Autophagy protein microtubule-associated protein 1 light chain-3B (LC3B) activates extrinsic apoptosis during cigarette smoke-induced emphysema. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(44), 18880–18885.

Chen, L. C., Shibu, M. A., Liu, C. J., Han, C. K., Ju, D. T., Chen, P. Y., Viswanadha, V. P., Lai, C. H., Kuo, W. W., & Huang, C. Y. (2019). ERK1/2 mediates the lipopolysaccharide-induced upregulation of FGF-2, uPA, MMP-2, MMP-9 and cellular migration in cardiac fibroblasts. *Chemico-Biological Interactions*, *306*, 62–69.

Chillappagari, S., Preuss, J., Licht, S., Müller, C., Mahavadi, P., Sarode, G., Vogelmeier, C., Guenther, A., Nahrlich, L., Rubin, B. K., & Henke, M. O. (2015). Altered protease and antiprotease balance during a COPD exacerbation contributes to mucus obstruction. *Respiratory Research*, *16*(1), 85.

Cho, A., Haruyama, N., Hall, B., Danton, M. J. S., Zhang, L., Arany, P., Mooney, D. J., Harichane, Y., Goldberg, M., Gibson, C. W., & Kulkarni, A. B. (2013). TGF-β regulates enamel mineralization and maturation through KLK4 expression. *PLoS One*, *8*(11), e82267.

Chow, T. F. F., Crow, M., Earle, T., El-Said, H., Diamandis, E. P., & Yousef, G. M. (2008). Kallikreins as microRNA targets: An in silico and experimental-based analysis. *Biological Chemistry*, *389*(6), 731–738.

Churg, A., Zay, K., Shay, S., Xie, C., Shapiro, S. D., Hendricks, R., & Wright, J. L. (2002). Acute cigarette smoke-induced connective tissue breakdown requires both neutrophils and macrophage metalloelastase in mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *27*(3), 368–374.

Churg, A., Wang, R. D., Tai, H., Wang, X., Xie, C., & Wright, J. L. (2004). Tumor necrosis factor-α drives 70% of cigarette smoke-induced emphysema in the mouse. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *170*(5), 492–498.

Clements, J., Hooper, J., Dong, Y., & Harvey, T. (2001). The expanded human kallikrein (KLK) gene family: Genomic organisation, tissue-specific expression and potential functions. *Biological Chemistry*, 382 (1), 5–14.

Cloonan, S. M., Lam, H. C., Ryter, S. W., & Choi, A. M. (2014). Ciliophagy : The consumption of cilia components by autophagy. *Autophagy*, *10*(3), 532–534.

Comandini, A., Rogliani, P., Nunziata, A., Cazzola, M., Curradi, G., & Saltini, C. (2009).

Biomarkers of lung damage associated with tobacco smoke in induced sputum. In *Respiratory Medicine*, 103 (11), 1592–1613.

Copeland, N. A., & Kleanthous, C. (2005). The role of an activating peptide in protease-mediated suicide of Escherichia coli K12. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(1), 112–117.

Cowden Dahl, K. D., Symowicz, J., Ning, Y., Gutierrez, E., Fishman, D. A., Adley, B. P., Stack, M. S., & Hudson, L. G. (2008). Matrix metalloproteinase 9 is a mediator of epidermal growth factor-dependent E-cadherin loss in ovarian carcinoma cells. *Cancer Research*, *68*(12), 4606–4613.

Cozens, A. L., Yezzi, M. J., Kunzelmann, K., Ohrui, T., Chin, L., Eng, K., Finkbeiner, W. E., Widdicombe, J. H., & Gruenert, D. C. (1994). CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *10*(1), 38–47.

Crawley, J. T. B., Goulding, D. A., Ferreira, V., Severs, N. J., & Lupu, F. (2002). Expression and localization of tissue factor pathway inhibitor-2 in normal and atherosclerotic human vessels. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *22*(2), 218–224.

Crispel, Y., Ghanem, S., Attias, J., Kogan, I., Brenner, B., & Nadir, Y. (2017). Involvement of the heparanase procoagulant domain in bleeding and wound healing. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, *15*(7), 1463–1472.

Darmoul, D., Rie Gratio, V., Lè Ne Devaud, H., & Laburthe, M. (2004). Protease-activated Receptor 2 in Colon Cancer trypsin-induced mapk phosphorylation and cell proliferation are mediated by epidermal growth factor receptor transactivation. *Journal of Biological Chemestry,* 279 (20), 20927

Davis, M. D., Suzaki, I., Kawano, S., Komiya, K., Cai, Q., Oh, Y., & Rubin, B. K. (2019). Tissue Factor Facilitates Wound Healing in Human Airway Epithelial Cells. *Chest*, *155*(3), 534–539.

De Boer, W. I., Sharma, H. S., Baelemans, S. M. I., Hoogsteden, H. C., Lambrecht, B. N., & Braunstahl, G. J. (2008). Altered expression of epithelial junctional proteins in atopic asthma: Possible role in inflammation. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *86*(3), 105–112.

De Ménonville, S., Rosignoli, C., Soares, E., Roquet, M., Bertino, B., Chappuis, J. P., Defoin-PlatelChaussade, C., & Piwnica, D. (2017). Topical Treatment of Rosacea with Ivermectin Inhibits Gene Expression of Cathelicidin Innate Immune Mediators, LL-37 and KLK5, in Reconstructed and Ex Vivo Skin Models. *Dermatology and Therapy*, *7*(2), 213-225.

De Sousa, M. C., Gjorgjieva, M., Dolicka, D., Sobolewski, C., & Foti, M. (2019). Deciphering miRNAs' action through miRNA editing. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24), 6249.

De Souza, A. S., Pacheco, B. D. C., Pinheiro, S., Muri, E. M. F., Dias, L. R. S., Lima, C. H. S., Garrett, R., de Moraes, M. B. M., de Souza, B. E. G., & Puzer, L. (2019). 3-Acyltetramic acids as a novel class of inhibitors for human kallikreins 5 and 7. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, *29*(9), 1094-1098.

Debela, M., Magdolen, V., Grimminger, V., Sommerhoff, C., Messerschmidt, A., Huber, R.,

Friedrich, R., Bode, W., & Goettig, P. (2006). Crystal Structures of Human Tissue Kallikrein 4: Activity Modulation by a Specific Zinc Binding Site. *Journal of Molecular Biology*, *362*(5), 1094–1107.

Debela, M., Goettig, P., Magdolen, V., Huber, R., Schechter, N. M., & Bode, W. (2007a). Structural Basis of the Zinc Inhibition of Human Tissue Kallikrein 5. *Journal of Molecular Biology*, *373*(4), 1017–1031.

Debela, M., Hess, P., Magdolen, V., Schechter, N. M., Steiner, T., Huber, R., Bode, W., & Goettig, P. (2007b). Chymotryptic specificity determinants in the 1.0 Å structure of the zinc-inhibited human tissue kallikrein 7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(41), 16086–16091.

Debela, M., Beaufort, N., Magdolen, V., Schechter, N. M., Craik, C. S., Schmitt, M., Bode, W., and Goettig, P (2008). Structures and specificity of the human kallikrein-related peptidases KLK 4, 5, 6, and 7. *Biological Chemistry*, 389 (6) : 623-632.

Delbrel, E., Uzunhan, Y., Soumare, A., Gille, T., Marchant, D., Planès, C., & Boncoeur, E. (2019). ER stress is involved in epithelial-to-mesenchymal transition of alveolar epithelial cells exposed to a hypoxic microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(6), 1299.

Descargues, P., Draison, C., Bonnart, C., Kreft, M., Kishibe, M., Ishida-Yamamoto, A., Elias, P., Barrandon, Y., Zambruno, G., Sonnenberg, A., & Hovnanian, A. (2005). Spink5-deficient mice mimic Netherton syndrome through degradation of desmoglein 1 by epidermal protease hyperactivity. *Nature Genetics*, *37*(1), 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. (2006). Corneodesmosomal cadherins are preferential targets of stratum corneum trypsin- and chymotrypsin-like hyperactivity in Netherton syndrome. *Journal of Investigative Dermatology*, *126*(7), 1622-1632.

Dey, T., Kalita, J., Weldon, S., & Taggart, C. (2018). Proteases and Their Inhibitors in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Journal of Clinical Medicine*, *7*(9), 244.

Di Paolo, C. T., Filippou, P. S., Yu, Y., Poda, G., Diamandis, E. P., & Prassas, I. (2019). Screening of chemical libraries in pursuit of kallikrein-5 specific inhibitors for the treatment of inflammatory dermatoses. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 57 (11), 1737-1743.

Donaldson, G. C., Seemungal, T. A. R., Patel, I. S., Bhowmik, A., Wilkinon, T. M. A., Hurst, J. R., MacCallum, P. K., & Wedzicha, J. A. (2005). Airway and systemic inflammation and decline in lung function in patients with COPD. *Chest*, *128*(4), 1995–2004.

Dong, Y., Kaushal, A., Brattsand, M., Nicklin, J., & Clements, J. A. (2003). Differential splicing of KLK5 and KLK7 in epithelial ovarian cancer produces novel variants with potential as cancer biomarkers. *Clinical Cancer Research*, *9*(5), 1710–1720.

Dong, Y., Harrington, B. S., Adams, M. N., Wortmann, A., Stephenson, S. A., Lisle, J., Herington, A., Hooper, J. D., & Clements, J. A. (2014a). Activation of membrane-bound proteins and receptor systems: A link between tissue kallikrein and the KLK-related peptidases. *Biological Chemistry*, *395*(9), 977-990.

Dong, Y., Loessner, D., Irving-Rodgers, H., Obermair, A., Nicklin, J. L., & Clements, J. A.

(2014b). Metastasis of ovarian cancer is mediated by kallikrein related peptidases. In *Clinical and Experimental Metastasis*. *Clinical & Experimental Metastasis*, 31(1), 135-147.

Dorn, J., Magdolen, V., Gkazepis, A., Gerte, T., Harlozinska, A., Sedlaczek, P., Diamandis, E. P., Schuster, T., Harbeck, N., Kiechle, M., & Schmitt, M. (2011). Circulating biomarker tissue kallikrein-related peptidase KLK5 impacts ovarian cancer patients' survival. *Annals of Oncology*, *22*(8), 1783-1790

Dorn, J., Yassouridis, A., Walch A., Diamandis E. P., Schmitt M., Kiechle M., Wang P., Drecoll A., Schmalfeldt B., Loessner D., Kootzsch M., Magdolen V. (2015).asessment Assessment of kallikrein-related peptidase 5 (KLK5) protein expression in tumor tissue of advanced ovarian cancer patients by immunohistochemistry and ELISA: correlation with clinical outcome. *American Journal of Cancer Research*, 6(1), 61-70.

Dorschner, R. A., Pestonjamasp, V. K., Tamakuwala, S., Ohtake, T., Rudisill, J., Nizet, V., Agerberth, B., Gudmundsson, G. H., & Gallo, R. L. (2001). Cutaneous injury induces the release of cathelicidin anti-microbial peptides active against group A streptococcus. *Journal of Investigative Dermatology*, *117*(1), 91-97.

Drucker, K. L., Paulsen, A. R., Giannini, C., Decker, P. A., Blaber, S. I., Blaber, M., Uhm, J. H., O'Neill, B. P., Jenkins, R. B., & Scarisbrick, I. A. (2013). Clinical significance and novel mechanism of action of kallikrein 6 in glioblastoma. *Neuro-Oncology*, *15*(3), 305–318.

Du, X., Chand, H. S., & Kisiel, W. (2003). Human tissue factor pathway inhibitor-2 does not bind or inhibit activated matrix metalloproteinase-1. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, *1621*(3), 242–245.

Dumas, J. F., Brisson, L., Chevalier, S., Mahéo, K., Fromont, G., Moussata, D., Besson, P., & Roger, S. (2017). Metabolic reprogramming in cancer cells, consequences on pH and tumour progression: Integrated therapeutic perspectives with dietary lipids as adjuvant to anticancer treatment. *Seminars in Cancer Biology*, 43, 90–110.

Dupuit, F., Gaillard, D., Hinnrasky, J., Mongodin, E., De Bentzmann, S., Copreni, E., & Puchelle, E. (2000). Differentiated and functional human airway epithelium regeneration in tracheal xenografts. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, *278*(1), 165-176.

Eady, R. A. J. (1990). The Ichthyoses. A Guide to Clinical Diagnosis, Genetic Counselling, and Therapy. *Journal of Medical Genetics*, *27*(10), 663-664.

Egelrud, T., Brattsand, M., Kreutzmann, P., Walden, M., Vitzithum, K., Marx, U. C., Forssmann, W. G., & Mägert, H. J. (2005). hK5 and hK7, two serine proteinases abundant in human skin, are inhibited by LEKTI domain 6. *British Journal of Dermatology*, *153*(6), 1200–1203.

Eissa, A., & Diamandis, E. P. (2008). Human tissue kallikreins as promiscuous modulators of homeostatic skin barrier functions. *Biological Chemistry*, *389*(6), 669–680.

Ekstrand, J., Razuvaev, A., Folkersen, L., Roy, J., & Hedin, U. (2010). Tissue factor pathway inhibitor-2 is induced by fluid shear stress in vascular smooth muscle cells and affects cell proliferation and survival. *Journal of Vascular Surgery*, *52*(1), 167–175.

Ekholm, I., Brattsand, M., & Egelrud, T. (2000). Stratum corneum tryptic enzyme in normal

epidermis: A missing link in the desquamation process? *Journal of Investigative Dermatology*, *114*(1), 56–63.

Emami, N., & Diamandis, E. P. (2007). New insights into the functional mechanisms and clinical applications of the kallikrein-related peptidase family. *Molecular Oncology*, 1 (3), 269–287.

Emami, N., & Diamandis, E. P. (2008). Human kallikrein-related peptidase 14 (KLK14) is a new activator component of the KLK proteolytic cascade: Possible function in seminal plasma and skin. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(6), 3031–3041.

Erjefält, J. S., Erjefält, I., Sundler, F., & Persson, C. G. A. (1995). In vivo restitution of airway epithelium. *Cell & Tissue Research*, *281*(2), 305–316.

Erjefält, J. S., Sundler, F., & Persson, C. G. A. (1997). Epithelial barrier formation by airway basal cells. *Thorax*, *52*(3), 213–217.

Feng, Y., Li, Q., Chen, J., Yi, P., Xu, X., Fan, Y., Cui, B., Yu, Y., Li, X., Du, Y., Chen, Q., Zhang, L., Jiang, J., Zhou, X., & Zhang, P. (2019). Salivary protease spectrum biomarkers of oral cancer. *International Journal of Oral Science*, *11*(1), 7.

Fischer, J., & Meyer-Hoffert, U. (2013). Regulation of kallikrein-related peptidases in the skin - From physiology to diseases to therapeutic options. *Thrombosis and Haemostasis*, *110*(3), 442–449.

Fischer, J., Wu, Z., Kantyka, T., Sperrhacke, M., Dimitrieva, O., Koblyakova, Y., Ahrens, K., Graumann, N., Baurecht, H., Reiss, K., Schröder, J. M., Proksch, E., & Meyer-Hoffert, U. (2014). Characterization of Spink6 in mouse skin: The conserved inhibitor of kallikrein-related peptidases is reduced by barrier injury. *Journal of Investigative Dermatology*, *134*(5), 1305–1312.

Fletcher, C., & Peto, R. (1977). The natural history of chronic airflow obstruction. *British Medical Journal*, *1*(6077), 1645–1648.

Forteza, R., Casalino-Matsuda, S. M., Monzon, M. E., Fries, E., Rugg, M. S., Milner, C. M., & Day, A. J. (2007). TSG-6 potentiates the antitissue kallikrein activity of inter-α-inhibitor through bikunin release. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *36*(1), 20–31.

Fortugno, P., Bresciani, A., Paolini, C., Pazzagli, C., El Hachem, M., D'Alessio, M., & Zambruno, G. (2011). Proteolytic activation cascade of the netherton syndrome-defective protein, LEKTI, in the epidermis: Implications for skin homeostasis. *Journal of Investigative Dermatology*, *131*(11), 2223–2232.

Fortugno, P., Furio, L., Teson, M., Berretti, M., El hachem, M., Zambruno, G., Hovnanian, A., & D'Alessio, M. (2012). The 420k LEKTI variant alters LEKTI proteolytic activation and results in protease deregulation: Implications for atopic dermatitis. *Human Molecular Genetics*, *21*(19), 4187–4200.

Franssen, F. M. E., Alter, P., Bar, N., Benedikter, B. J., Iurato, S., Maier, D., Maxheim, M., Roessler, F. K., Spruit, M. A., Vogelmeier, C. F., Wouters, E. F. M., & Schmeck, B. (2019). Personalized medicine for patients with COPD: Where are we ? *International Journal of COPD*, *14*, 1465–1484.

Franzke, C. W., Baici, A., Bartels, J., Christophers, E., & Wiedow, O. (1996). Antileukoprotease inhibits stratum corneum chymotryptic enzyme: Evidence for a

regulative function in desquamation. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(36), 21886–21890.

Frohm, M., Agerberth, B., Ahangari, G., Ståhle-Bäckdahl, M., Lidén, S., Wigzell, H., & Gudmundsson, G. H. (1997). The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *Journal of Biological Chemistry*, 272(24): 15258-15263.

Fullár, A., Karászi, K., Hollósi, P., Lendvai, G., Oláh, L., Reszegi, A., Papp, Z., Sobel, G., Dudás, J., & Kovalszky, I. (2020). Two ways of epigenetic silencing of TFPI2 in cervical cancer. *PLoS One*, *15*(6), e0234873.

Furio, L., De Veer, S., Jaillet, M., Briot, A., Robin, A., Deraison, C., & Hovnanian, A. (2014). Transgenic kallikrein 5 mice reproduce major cutaneous and systemic hallmarks of Netherton syndrome. *Journal of Experimental Medicine*, *211*(3), 499–513.

Gallagher, L. E., Williamson, L. E., & Chan, E. Y. W. (2016). Advances in Autophagy Regulatory Mechanisms. *Cells*, *5*(2), 24.

Gao, J., Collard, R. L., Bui, L., Herington, A. C., Nicol, D. L., & Clements, J. A. (2007). Kallikrein 4 is a potential mediator of cellular interactions between cancer cells and osteoblasts in metastatic prostate cancer. *Prostate*, *67*(4), 348–360.

Gao, F., Wang, F. Q., Liu, R. R., Xue, F., Jian, Z., Xu, G. Q., Bi, J. H., Zhen, M., & Huo, R. (2017). Epigenetic silencing of miR-130a ameliorates hemangioma by targeting tissue factor pathway inhibitor 2 through FAK/PI3K/Rac1/mdm2 signaling. *International Journal of Oncology*, *50*(5), 1821–1831.

Gaud, G., Iochmann, S., Guillon-Munos, A., Brillet, B., Petiot, S., Seigneuret, F., Touzé, A., Heuzé-Vourc'h, N., Courty, Y., Lerondel, S., Gruel, Y., & Reverdiau, P. (2011). TFPI-2 silencing increases tumour progression and promotes metalloproteinase 1 and 3 induction through tumour-stromal cell interactions. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *15*(2), 196–208.

George, J., Gondi, C. S., Dinh, D. H., Gujrati, M., & Rao, J. S. (2007). Restoration of tissue factor pathway inhibitor-2 in a human glioblastoma cell line triggers caspase-mediated pathway and apoptosis. *Clinical Cancer Research*, *13*(12), 3507–3517.

Goettig, P., Magdolen, V., & Brandstetter, H. (2010). Natural and synthetic inhibitors of kallikrein-related peptidases (KLKs). *Biochimie*, 92 (11), 1546–1567.

Goldhardt, O., Warnhoff, I., Yakushev, I., Begcevic, I., Förstl, H., Magdolen, V., Soosaipillai, A., Diamandis, E., Alexopoulos, P., & Grimmer, T. (2019). Kallikrein-related peptidases 6 and 10 are elevated in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and associated with CSF-TAU and FDG-PET. *Translational Neurodegeneration*, *8*, 25.

Gong, W., Liu, Y., Seidl, C., Diamandis, E. P., Kiechle, M., Drecoll, E., Kotzsch, M., Magdolen, V., & Dorn, J. (2019). Quantitative assessment and clinical relevance of kallikrein-related peptidase 5 mRNA expression in advanced high-grade serous ovarian cancer. *BMC Cancer*, *19*(1), 696.

Graveley, B. R. (2001). Alternative splicing: Increasing diversity in the proteomic world. In *Trends in Genetics*, 17(2), 100–107.

Graziani, D., Soriano, J. B., Del Rio-Bermudez, C., Morena, D., Díaz, T., Castillo, M., Alonso, M., Ancochea, J., Lumbreras, S., & Izquierdo, J. L. (2020). Characteristics and

Prognosis of COVID-19 in Patients with COPD. *Journal of Clinical Medicine*, *9*(10), 3259.

Guillon-Munos, A., Oikonomopoulou, K., Michel, N., Smith, C. R., Petit-Courty, A., Canepa, S., Reverdiau, P., Heuzè-Vourc'h, N., Diamandis, E. P., & Courty, Y. (2011). 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*, *286*(29), 25505–25518.

Gumbiner, B., Stevenson, B., & Grimaldi, A. (1988). The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex. *The Journal of Cell Biology*, *107*(4), 1575–1587.

Guo, S., Skala, W., Magdolen, V., Brandstetter, H., & Goettig, P. (2014). Sweetened kallikrein-related peptidases (KLKs): Glycan trees as potential regulators of activation and activity. *Biological Chemistry*, *395*(9), 959–976.

Gusarova, G. A., Trejo, H. E., Dada, L. A., Briva, A., Welch, L. C., Hamanaka, R. B., Mutlu, G. M., Chandel, N. S., Prakriya, M., & Sznajder, J. I. (2011). Hypoxia Leads to Na,K-ATPase Downregulation via Ca2+ Release-Activated Ca2+ Channels and AMPK Activation. *Molecular and Cellular Biology*, *31*(17), 3546–3556.

Hackett, T. L., Warner, S. M., Stefanowicz, D., Shaheen, F., Pechkovsky, D. V., Murray, L. A., Argentieri, R., Kicic, A., Stick, S. M., Bai, T. R., & Knight, D. A. (2009). Induction of epithelial-mesenchymal transition in primary airway epithelial cells from patients with asthma by transforming growth factor-β1. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *180*(2), 122–133.

Haddada, M., Draoui, H., Deschamps, L., Walker, F., Delaunay, T., Brattsand, M., Magdolen, V., & Darmoul, D. (2018). Kallikrein-related peptidase 7 overexpression in melanoma cells modulates cell adhesion leading to a malignant phenotype. *Biological Chemistry*, *399*(9), 1099-1105.

Hajj, R., Baranek, T., Le Naour, R., Lesimple, P., Puchelle, E., & Coraux, C. (2007). Basal Cells of the Human Adult Airway Surface Epithelium Retain Transit-Amplifying Cell Properties. *Stem Cells*, *25*(1), 139–148.

Hamilton, B.S. and Whittaker, G.R. (2013). Cleavage activation of human-adapted influenza virus subtypes by kallikrein-related peptidases 5 and 12. *Journal of Biological Chemistry*. 288, 17399-17407.

Han, X., Na, T., Wu, T., & Yuan, B. Z. (2020). Human lung epithelial BEAS-2B cells exhibit characteristics of mesenchymal stem cells. *PLoS One*, *15*(1), e0227174.

Hansson, L., Bäckman, A., Ny, A., Edlund, M., Ekholm, E., Hammarström, B. E., Törnell, J., Wallbrandt, P., Wennbo, H., & Egelrud, T. (2002). Epidermal overexpression of stratum corneum chymotryptic enzyme in mice: A model for chronic itchy dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*, *118*(3), 444–449.

Hart, P. S., Hart, T. C., Michalec, M. D., Ryu, O. H., Simmons, D., Hong, S., & Wright, J. T. (2004). Mutation in kallikrein 4 causes autosomal recessive hypomaturation amelogenesis imperfecta. *Journal of Medical Genetics*, *41*(7), 545–549.

Harvey, T. J., Hooper, J. D., Myers, S. A., Stephenson, S. A., Ashworth, L. K., & Clements, J. A. (2000). Tissue-specific expression patterns and fine mapping of the human kallikrein

(KLK) locus on proximal 19q13.4. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(48), 37397–37406.

Hebb, L.O. A., Bhan, V., D. Wishart, A., S. Moore, C., & S. Robertson, G. (2014). Human Kallikrein 6 Cerebrospinal Levels are Elevated in Multiple Sclerosis. *Current Drug Discovery Technologies*, *7*(2), 137–140.

Hedstrom, L. (2001). An Overview of Serine Proteases. *Current Protocols in Protein Science*, *21,* 21-10.

Heijink, I. H., Brandenburg, S. M., Noordhoek, J. A., Postma, D. S., Slebos, D. J., & Van Oosterhout, A. J. M. (2010). Characterisation of cell adhesion in airway epithelial cell types using electric cell-substrate impedance sensing. *European Respiratory Journal*, *35*(4), 894–903.

Herman, J. G., & Baylin, S. B. (2003). Gene Silencing in Cancer in Association with Promoter Hypermethylation. *New England Journal of Medicine*, *349*(21), 2042–2054.

Herman, M. P., Sukhova, G. K., Kisiel, W., Foster, D., Kehry, M. R., Libby, P., & Schönbeck, U. (2001). Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with implications for atherosclerosis. *Journal of Clinical Investigation*, *107*(9), 1117–1126.

Herrala, A. M., Porvari, K. S., Kylloand, A. P., & Vihko, P. T. (2001). Comparison of human prostate specific glandular kallikrein 2 and prostate specific antigen gene expression in prostate with gene amplification and overexpression of prostate specific glandular kallikrein 2 in tumor tissue. *Cancer*, *92*(12), 2975–2984.

Heuzé-Vourc'h, N., Leblond, V., & Courty, Y. (2003). Complex alternative splicing of the hKLK3 gene coding for the tumor marker PSA (prostate-specific-antigen). *European Journal of Biochemistry*, *270*(4), 706–714.

Hiemstra, P. S., Grootaers, G., van der Does, A. M., Krul, C. A. M., & Kooter, I. M. (2018). Human lung epithelial cell cultures for analysis of inhaled toxicants: Lessons learned and future directions. *Toxicology in Vitro*, 47, 137–146.

Hiemstra, P. S. (2019). Macrophage function in chronic obstructive pulmonary disease: The many faces of notch signalling. *EBioMedicine*, *43*, 22–23.

Higgins, D. F., Kimura, K., Bernhardt, W. M., Shrimanker, N., Akai, Y., Hohenstein, B., Saito, Y., Johnson, R. S., Kretzler, M., Cohen, C. D., Eckardt, K. U., Iwano, M., & Haase, V. H. (2007). Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation*, *117*(12), 3810–3820.

Higgins, P. J., Czekay, R. P., Wilkins-Port, C. E., Higgins, S. P., Freytag, J., Overstreet, J. M., Klein, R. M., Higgins, C. E., & Samarakoon, R. (2011). PAI-1: An integrator of cell signaling and migration. *International Journal of Cell Biology*, 2011, 562481.

Hisaka, T., Lardeux, B., Lamrieau, T., Wüestefeld, T., Lalor, P. F., Neaud, V., Maurel, P., Desmoulière, A., Kisiel, W., Trautwein, C., & Rosenbaum, J. (2004). Expression of tissue factor pathway inhibitor-2 in murine and human liver regulation during inflammation. *Thrombosis and Haemostasis*, *91*(3), 569–575.

Hjortoe, G. M., Petersen, L. C., Albrektsen, T., Sorensen, B. B., Norby, P. L., Manda, S. K., Pendurthi, U. R., & Rao, L. V. M. (2004). Tissue factor-factor VIIa-specific up-regulation of IL-8 expression in MDA-MB-231 cells is mediated by PAR-2 and results in increased cell migration. *Blood*, *103*(8), 3029–3037.

Hogg, J. C., Chu, F., Utokaparch, S., Woods, R., Elliott, W. M., Buzatu, L., Cherniack, R. M., Rogers, R. M., Sciurba, F. C., Coxson, H. O., & Paré, P. D. (2004). The Nature of Small-Airway Obstruction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *New England Journal of Medicine*, *350*(26), 2645–2653.

Hollenberg, M. D., Mihara, K., Polley, D., Suen, J. Y., Han, A., Fairlie, D. P., & Ramachandran, R. (2014). Biased signalling and proteinase-activated receptors (PARs): Targeting inflammatory disease. *British Journal of Pharmacology*, 171(5), 1180–1194.

Horrevoets, A. J. G., Fontijn, R. D., Van Zonneveld, A. J., De Vries, C. J. M., Ten Cate, J. W., & Pannekoek, H. (1999). Vascular endothelial genes that are responsive to tumor necrosis factor- α in vitro are expressed in atherosclerotic lesions, including inhibitor of apoptosis protein-1, stannin, and two novel genes. *Blood*, *93*(10), 3418-31.

Hou, H. H., Cheng, S. L., Chung, K. P., Kuo, M. Y. P., Yeh, C. C., Chang, B. E., Lu, H. H., Wang, H. C., & Yu, C. J. (2014). Elastase induces lung epithelial cell autophagy through placental growth factor A new insight of emphysema pathogenesis. *Autophagy*, *10*(9), 1509–1521.

Howell, C., Smith, J. R., & Shute, J. K. (2018). Targeting matrix metalloproteinase-13 in bronchial epithelial repair. *Clinical and Experimental Allergy*, *48*(9), 1214–1221.

Hubé, F., Reverdiau, P., Iochmann, S., Cherpi-Antar, C., & Gruel, Y. (2003a). Characterization and functional analysis of TFPI-2 gene promoter in a human choriocarcinoma cell line. *Thrombosis Research*, *109*(4), 207–215.

Hubé, Florent, Reverdiau, P., Iochmann, S., Rollin, J., Cherpi-Antar, C., & Gruel, Y. (2003b). Transcriptional silencing of the TFPI-2 gene by promoter hypermethylation in choriocarcinoma cells. *Biological Chemistry*, *384*(7), 1029–1034.

Huntington, J. A. (2011). Serpin structure, function and dysfunction. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 9 (1), 26–34.

Iino, M., Foster, D. C., & Kisiel, W. (1998). Quantification and characterization of human endothelial cell-derived tissue factor pathway inhibitor-2. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *18*(1), 40–46.

Iochmann, S., Bléchet, C., Chabot, V., Saulnier, A., Amini, A., Gaud, G., Gruel, Y., & Reverdiau, P. (2009). Transient RNA silencing of tissue factor pathway inhibitor-2 modulates lung cancer cell invasion. *Clinical and Experimental Metastasis*, *26*(5), 457–467.

Ito, J. T., Lourenço, J. D., Righetti, R. F., Tibério, I. F. L. C., Prado, C. M., & Lopes, F. D. T. Q. S. (2019). Extracellular Matrix Component Remodeling in Respiratory Diseases: What Has Been Found in Clinical and Experimental Studies ? *Cells*, *8*(4), 342.

Ivanciu, L., Gerard, R. D., Tang, H., Lupu, F., & Lupu, C. (2007). Adenovirus-mediated expression of tissue factor pathway inhibitor-2 inhibits endothelial cell migration and angiogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, *27*(2), 310–316.

Izumi, H., Takahashi, C., Oh, J., & Noda, M. (2000). Tissue factor pathway inhibitor-2

suppresses the production of active matrix metalloproteinase-2 and is down-regulated in cells harboring activated ras oncogenes. *FEBS Letters*, *481*(1), 31–36.

Jang, H., Matsuda, A., Jung, K., Karasawa, K., Matsuda, K., Oida, K., Ishizaka, S., Ahn, G., Amagai, Y., Moon, C., Kim, S. H., Arkwright, P. D., Takamori, K., Matsuda, H., & Tanaka, A. (2016). Skin pH Is the master switch of kallikrein 5-mediated skin barrier destruction in a murine atopic dermatitis model. *Journal of Investigative Dermatology*, *136*(1), 127-135.

Janus, E. D., Phillips, N. T., & Carrell, R. W. (1985). smoking, lung function, and α1-antitrypsin deficiency. *The Lancet*, *325*(8421), 152–154.

Jayakumar, A., Kang, Y., Mitsudo, K., Henderson, Y., Frederick, M. J., Wang, M., El-Naggar, A. K., Marx, U. C., Briggs, K., & Clayman, G. L. (2004). Expression of LEKTI domains 6-9′ in the baculovirus expression system: Recombinant LEKTI domains 6-9′ inhibit trypsin and subtilisin A. *Protein Expression and Purification*, *35*(1), 93–101.

Jeffery, P. K. (2004). Remodeling and inflammation of bronchi in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 1(3), 176–183.

Jendrny, C., & Beck-Sickinger, A. G. (2016). Inhibition of Kallikrein-Related Peptidases 7 and 5 by Grafting Serpin Reactive-Center Loop Sequences onto Sunflower Trypsin Inhibitor-1 (SFTI-1). *ChemBioChem*, *17*(8), 719–726.

Jeon, S. Y., Go, R. E., Heo, J. R., Kim, C. W., Hwang, K. A., & Choi, K. C. (2016). Effects of cigarette smoke extracts on the progression and metastasis of human ovarian cancer cells via regulating epithelial-mesenchymal transition. *Reproductive Toxicology*, *65*, 1–10.

Jia, L., Shen, H. C., Wantroba, M., Khalid, O., Liang, G., Wang, Q., Gentzschein, E., Pinski, J. K., Stanczyk, F. Z., Jones, P. A., & Coetzee, G. A. (2006). Locus-Wide Chromatin Remodeling and Enhanced Androgen Receptor-Mediated Transcription in Recurrent Prostate Tumor Cells. *Molecular and Cellular Biology*, *26*(19), 7331–7341.

Jiang, R., Shi, Z., Johnson, J. J., Liu, Y., & Stack, M. S. (2011). Kallikrein-5 promotes cleavage of desmoglein-1 and loss of cell-cell cohesion in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(11), 9127–9135.

Jin, M. S., Udagawa, K., Miyagi, E., Nakazawa, T., Hirahara, F., Yasumitsu, H., Miyazaki, K., Nagashima, Y., Aoki, I., & Miyagi, Y. (2001). Expression of serine proteinase inhibitor PP5/TFPI-2/MSPI decreases the invasive potential of human choriocarcinoma cells in Vitro and in Vivo. *Gynecologic Oncology*, *83*(2), 325–333.

Johnson, J. J., Miller, D. L., Jiang, R., Liu, Y., Shi, Z., Tarwater, L., Williams, R., Balsara, R., Sauter, E. R., & Stack, M. S. (2016). Protease-activated Receptor-2 (PAR-2)-mediated Nf-κB activation suppresses inflammation-associated tumor suppressor MicroRNAs in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(13), 6936–6945.

Jonsson, M., Linse, S., Frohm, B., Lundwall, Å., & Malm, J. (2005). Semenogelins I and II bind zinc and regulate the activity of prostate-specific antigen. *Biochemical Journal*, *387*(2), 447–453.

Jun, J. Il, & Lau, L. F. (2011). Taking aim at the extracellular matrix: CCN proteins as emerging therapeutic targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10(12), 945-963.

Kajiyama, H., Kikkawa, F., Khin, E. E., Shibata, K., Ino, K., & Mizutani, S. (2003).

Dipeptidyl peptidase IV overexpression induces up-regulation of E-cadherin and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, resulting in decreased invasive potential in ovarian carcinoma cells. *Cancer Research*, *63*(9), 2278–2283.

Kalinska, M., Meyer-Hoffert, U., Kantyka, T., & Potempa, J. (2016). Kallikreins - The melting pot of activity and function. *Biochimie*, *122*, 270–282.

Kamei, S., Kazama, Y., Kuijper, J. L., Foster, D. C., & Kisiel, W. (2001). Genomic structure and promoter activity of the human tissue factor pathway inhibitor-2 gene. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, *1517*(3), 430–435.

Kang, Z., Jänne, O. A., & Palvimo, J. J. (2004). Coregulator recruitment and histone modifications in transcriptional regulation by the androgen receptor. *Molecular Endocrinology*, *18*(11), 2633–2648.

Kasetty, G., Papareddy, P., Kalle, M., Rydengrd, V., Walse, B., Svensson, B., Mörgelin, M., Malmsten, M., & Schmidtchen, A. (2011). The C-terminal sequence of several human serine proteases encodes host defense functions. *Journal of Innate Immunity*, *3*(5), 471–482.

Kasparek, P., Ileninova, Z., Zbodakova, O., Kanchev, I., Benada, O., Chalupsky, K., Brattsand, M., Beck, I. M., & Sedlacek, R. (2017). KLK5 and KLK7 Ablation Fully Rescues Lethality of Netherton Syndrome-Like Phenotype. *PLoS Genetics*, *13*(1), e1006566.

Khouri, C., Dittrich, A., Sackett, S. D., Denecke, B., Trautwein, C., & Schaper, F. (2011). Glucagon counteracts interleukin-6-dependent gene expression by redundant action of EPAC and PKA. *Biological Chemistry*, *392*(12), 1123–1134.

Kim, H., Scorilas, A., Katsaros, D., Yousef, G. M., Massobrio, M., Fracchioli, S., Piccinno, R., Gordini, G., & Diamandis, E. P. (2001). Human kallikrein gene 5 (KLK5) expression is an indicator of poor prognosis in ovarian cancer. *British Journal of Cancer*, *84*(5), 643–650.

Kim, S., & Nadel, J. A. (2004). Role of neutrophils in mucus hypersecretion in COPD and implications for therapy. *Treatments in Respiratory Medicine*, 3(3), 147–159.

Kim, K. K., Kugler, M. C., Wolters, P. J., Robillard, L., Galvez, M. G., Brumwell, A. M., Sheppard, D., & Chapman, H. A. (2006). Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(35), 13180–13185.

Kirihara, T., Matsumoto-Miyai, K., Nakamura, Y., Sadayama, T., Yoshida, S., & Shiosaka, S. (2003). Prolonged recovery of ultraviolet B-irradiated skin in neuropsin (KLK8)-deficient mice. *British Journal of Dermatology*, *149*(4), 700–706.

Kirkham, S., Kolsum, U., Rousseau, K., Singh, D., Vestbo, J., & Thornton, D. J. (2008). MUC5B is the major mucin in the gel phase of sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *178*(10), 1033–1039.

Kishibe, M. (2019). Physiological and pathological roles of kallikrein-related peptidases in the epidermis. *Journal of Dermatological Science*, 95(2), 50–55.

Kisiel, W., Sprecher, C. A., & Foster, D. C. (1994). Evidence that a second human tissue

factor pathway inhibitor (TFPI-2) and human placental protein 5 are equivalent. *Blood*, 84(12), 4384–4385.

Knauer, D. J., Thompson, J. A., & Cunningham, D. D. (1983). Protease nexins: Cell-secreted proteins that mediate the binding, internalization, and degradation of regulatory serine proteases. *Journal of Cellular Physiology*, *117*(3), 385–396.

Köhnlein, T., & Welte, T. (2008). Alpha-1 Antitrypsin Deficiency: Pathogenesis, Clinical Presentation, Diagnosis, and Treatment. *American Journal of Medicine*, 121(1), 3–9.

Komatsu, N., Tsai, B., Sidiropoulos, M., Saijoh, K., Levesque, M. A., Takehara, K., & Diamandis, E. P. (2006). Quantification of eight tissue kallikreins in the stratum corneum and sweat. *Journal of Investigative Dermatology*, 126(4), 927–931.

Konduri, Santhi D., Tasiou, A., Chandrasekar, N., Nicolson, G. L., & Rao, J. S. (2000). Role of tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2) in amelanotic melanoma (C-32) invasion. *Clinical and Experimental Metastasis*, *18*(4), 303–308.

Konduri, Santhi D., Rao, C. N., Chandrasekar, N., Tasiou, A., Mohanam, S., Kin, Y., Lakka, S. S., Dinh, D., Olivero, W. C., Gujrati, M., Foster, D. C., Kisiel, W., & Rao, J. S. (2001a). A novel function of tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2) in human glioma invasion. *Oncogene*, *20*(47), 6938–6945.

Konduri, S. D., Tasiou, A., Chandrasekar, N., & Rao, J. S. (2001b). Overexpression of tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2), decreases the invasiveness of prostate cancer cells in vitro. *International Journal of Oncology*, *18*(1), 127–131.

Konduri, Santhi D., Yanamandra, N., Dinh, D. H., Olivero, W. C., Gujrati, M., Foster, D. C., Kisiel, W., & Rao, J. S. (2003). Physiological and chemical inducers of tissue factor pathway inhibitor-2 in human glioma cells. *International Journal of Oncology*, *22*(6), 1277–1283.

Kong, D., Ma, D., Bai, H., Guo, H., Cai, X., Mo, W., Tang, Q., & Song, H. (2004). Expression and characterization of the first kunitz domain of human tissue factor pathway inhibitor-2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *324*(4), 1179–1185.

Korbakis, D., Gregorakis, A. K., & Scorilas, A. (2009). Quantitative analysis of human kallikrein 5 (KLK5) expression in prostate needle biopsies: An independent cancer biomarker. *Clinical Chemistry*, *55*(5), 904-913.

Korkmaz, K. S., Korkmaz, C. G., Pretlow, T. G., & Saatcioglu, F. (2001). 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*, *20*(7), 435–445.

Kraen, M., Frantz, S., Nihlén, U., Engström, G., Löfdahl, C. G., Wollmer, P., & Dencker, M. (2019). Matrix Metalloproteinases in COPD and atherosclerosis with emphasis on the effects of smoking. *PLoS One*, *14*(2), 1–10.

Kriegel, A. J., Liu, Y., Cohen, B., Usa, K., Liu, Y., & Liang, M. (2012). MiR-382 targeting of kallikrein 5 contributes to renal inner medullary interstitial fibrosis. *Physiological Genomics*, *44*(4), 259–267.

Kryza, T., Achard, C., Parent, C., Marchand-Adam, S., Guillon-Munos, A., Iochmann, S.,

Korkmaz, B., Respaud, R., Courty, Y., & Heuzé-Vourc'h, N. (2014). Angiogenesis stimulated by human kallikrein-related peptidase 12 acting via a platelet-derived growth factor B-dependent paracrine pathway. *FASEB Journal*, *28*(2), 740–751.

Kryza, T., Silva, M. L., Loessner, D., Heuzé-Vourc'h, N., & Clements, J. A. (2016). The kallikrein-related peptidase family: Dysregulation and functions during cancer progression. *Biochimie*, 122, 283–299.

Kryza, T., Parent, C., Pardessus, J., Petit, A., Burlaud-Gaillard, J., Reverdiau, P., Iochmann, S., Labas, V., Courty, Y., & Heuzé-Vourc'H, N. (2018). Human kallikrein-related peptidase 12 stimulates endothelial cell migration by remodeling the fibronectin matrix. *Scientific Reports*, *8*(1), 6331.

Kryza, T., Bock, N., Lovell, S., Rockstroh, A., Lehman, M. L., Lesner, A., Panchadsaram, J., Silva, L. M., Srinivasan, S., Snell, C. E., Williams, E. D., Fazli, L., Gleave, M., Batra, J., Nelson, C., Tate, E. W., Harris, J., Hooper, J. D., & Clements, J. A. (2020). The molecular function of kallikrein-related peptidase 14 demonstrates a key modulatory role in advanced prostate cancer. *Molecular Oncology*, *14*(1), 105–128.

Kulasingam, V., & Diamandis, E. P. (2007). Proteomics analysis of conditioned media from three breast cancer cell lines: A mine for biomarkers and therapeutic targets. *Molecular and Cellular Proteomics*, *6*(11), 1997-2011.

Kurlender, L., Yousef, G. M., Memari, N., Robb, J. D., Michael, I. P., Borgoño, C., Katsaros, D., Stephan, C., Jung, K., & Diamandis, E. P. (2004). Differential expression of a human kallikrein 5 (KLK5) splice variant in ovarian and prostate cancer. *Tumor Biology*, *25*(3), 149–156.

Kuzmanov, U., Jiang, N., Smith, C. R., Soosaipillai, A., & Diamandis, E. P. (2009). Differential N-glycosylation of kallikrein 6 derived from ovarian cancer cells or the central nervous system. *Molecular and Cellular Proteomics*, *8*(4), 791–798.

Kuzmanov, U., Smith, C. R., Batruch, I., Soosaipillai, A., Diamandis, A., & Diamandis, E. P. (2012). Separation of kallikrein 6 glycoprotein subpopulations in biological fluids by anion-exchange chromatography coupled to ELISA and identification by mass spectrometry. *Proteomics*, *12*(6), 799–809.

Laflamme, B. A., & Wolfner, M. F. (2013). Identification and function of proteolysis regulators in seminal fluid. In *Molecular Reproduction and Development*, 80 (2), 80–101.

Lagente, V., Planquois, J. M., Leclerc, O., Schmidlin, F., & Bertrand, C. P. (2008). Oxidative stress is an important component of airway inflammation in mice exposed to cigarette smoke or lipopolysaccharide. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, *35*(5–6), 601–605.

Lai, J., Kedda, M. A., Hinze, K., Smith, R. L. G., Yaxley, J., Spurdle, A. B., Morris, C. P., Harris, J., & Clements, J. A. (2007). PSA/KLK3 AREI promoter polymorphism alters androgen receptor binding and is associated with prostate cancer susceptibility. *Carcinogenesis*, *28*(5), 1032–1039.

Lai, J., An, J., Nelson, C. C., Lehman, M. L., Batra, J., & Clements, J. A. (2014). Analysis of androgen and anti-androgen regulation of KLK-related peptidase 2, 3, and 4 alternative transcripts in prostate cancer. *Biological Chemistry*, *395*(9), 1127–1132.

Lakka, S. S., Konduri, S. D., Mohanam, S., Nicolson, G. L., & Rao, J. S. (2000). In vitro modulation of human lung cancer cell line invasiveness by antisense cDNA of tissue factor pathway inhibitor-2. *Clinical and Experimental Metastasis*, *18*(3), 239–244.

Laporte, L., Hermetet, C., Jouan, Y., Gaborit, C., Rouve, E., Shea, K. M., Si-Tahar, M., Dequin, P. F., Grammatico-Guillon, L., & Guillon, A. (2018). Ten-year trends in intensive care admissions for respiratory infections in the elderly. *Annals of Intensive Care*, *8*(1), 84.

Laurell, C. B., & Eriksson, S. (2013). The electrophoretic α1-globulin pattern of serum in α1-antitrypsin deficiency. *Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 10 (S1), 3–8.

Lavergne, M., Jourdan, M. L., Blechet, C., Guyetant, S., Pape, A. Le, Heuze-Vourc'h, N., Courty, Y., Lerondel, S., Sobilo, J., Iochmann, S., & Reverdiau, P. (2013). Beneficial role of overexpression of TFPI-2 on tumour progression in human small cell lung cancer. *FEBS Open Bio*, *3*, 291–301.

Lawrence, M. G., Lai, J., & Clements, J. A. (2010). Kallikreins on Steroids: Structure, Function, and Hormonal Regulation of Prostate-Specific Antigen and the Extended Kallikrein Locus. *Endocrine Reviews,* 31(4), 407-46.

Le Rouzic, O., Pichavant, M., Frealle, E., Guillon, A., Si-Tahar, M., & Gosset, P. (2017). Th17 cytokines: Novel potential therapeutic targets for COPD pathogenesis and exacerbations. *European Respiratory Journal*, 50(4), 1602434.

Lee, M. K., Hong, Y., Kim, S. Y., Kim, W. J., & London, S. J. (2017). Epigenome-wide association study of chronic obstructive pulmonary disease and lung function in Koreans. *Epigenomics*, *9*(7), 971–984.

Lenga Ma Bonda, W., Iochmann, S., Magnen, M., Courty, Y., & Reverdiau, P. (2018). Kallikrein-related peptidases in lung diseases. *Biological Chemistry*, *399*(9), 959–971.

Leu, C.H., Yang, M.L., Chung, N.H., Huang, Y.J., Su, Y.C., Chen, Y.C., Lin, C.C., Shieh,G.S., Chang, M.Y., Wang, S.W. et al. (2015). Kallistatin ameliorates influenza virus pathogenesis by inhibition of kallikrein-related peptidase 1-mediated cleavage of viral hemagglutinin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59, 5619-5630.

Leusink, F. K. J., Van Diest, P. J., Frank, M. H., Broekhuizen, R., Braunius, W., Van Hooff, S. R., Willems, S. M., & Koole, R. (2015). The Co-Expression of Kallikrein 5 and Kallikrein 7 Associates with Poor Survival in Non-HPV Oral Squamous-Cell Carcinoma. *Pathobiology*, *82*(2), 58–67.

Lewis, J. D., Meehan, R. R., Henzel, W. J., Maurer-Fogy, I., Jeppesen, P., Klein, F., & Bird, A. (1992). Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to Methylated DNA. *Cell*, *69*(6), 905–914.

Li, H.-X., Hwang, B.-Y., Laxmikanthan, G., Blaber, S. I., Blaber, M., Golubkov, P. A., Ren, P., Iverson, B. L., & Georgiou, G. (2008). Substrate specificity of human kallikreins 1 and 6 determined by phage display. *Protein Science*, *17*(4), 664–672.

Li, X., Liu, J., Wang, Y., Zhang, L., Ning, L., & Feng, Y. (2009). Parallel underexpression of kallikrein 5 and kallikrein 7 mRNA in breast malignancies. *Cancer Science*, *100*(4), 601-607.

Li, Y., Xie, H., Deng, Z., Wang, B., Tang, Y., Zhao, Z., Yuan, X., Zuo, Z., Xu, S., Zhang, Y., & Li, J. (2019). Tranexamic acid ameliorates rosacea symptoms through regulating

immune response and angiogenesis. *International Immunopharmacology*, *67*, 326–334.

Lieb, W., Chen, M. H., Teumer, A., De Boer, R. A., Lin, H., Fox, E. R., Musani, S. K., Wilson, J. G., Wang, T. J., Völzke, H., Petersen, A. K., Meisinger, C., Nauck, M., Schlesinger, S., Li, Y., Menard, J., Hercberg, S., Wichmann, H. E., Völker, U., Vasan, R. S. (2015). Genome-wide meta-analyses of plasma renin activity and concentration reveal association with the kininogen 1 and prekallikrein genes. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, *8*(1), 131–140.

Lin, Z. M., Zhao, J. X., Duan, X. N., Zhang, L. B., Ye, J. M., Xu, L., & Liu, Y. H. (2014). Effects of tissue factor, PAR-2 and MMP-9 expression on human breast cancer cell line MCF-7 invasion. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, *15*(2), 643–646.

Liu, X. F., Essand, M., Vasmatzis, G., Lee, B., & Pastan, I. (1999). Identification of three new alternate human kallikrein 2 transcripts: Evidence of long transcript and alternative splicing. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *264*(3), 833–839.

Liu, Y., Gao, W., & Zhang, D. (2010). Effects of cigarette smoke extract on A549 cells and human lung fibroblasts treated with transforming growth factor-beta1 in a coculture system. *Clinical and Experimental Medicine*, *10*(3), 159–167.

Lizama, A. J., Andrade, Y., Colivoro, P., Sarmiento, J., Matus, C. E., Gonzalez, C. B., Bhoola, K. D., Ehrenfeld, P., & Figueroa, C. D. (2015). Expression and bioregulation of the kallikrein-related peptidases family in the human neutrophil. *Innate Immunity*, *21*(6), 575–586.

Loessner, D., Quent, V. M. C., Kraemer, J., Weber, E. C., Hutmacher, D. W., Magdolen, V., & Clements, J. A. (2012). Combined expression of KLK4, KLK5, KLK6, and KLK7 by ovarian cancer cells leads to decreased adhesion and paclitaxel-induced chemoresistance. *Gynecologic Oncology*, *127*(3), 569-578.

Logan, C. Y., & Nusse, R. (2004). the wnt signaling pathway in development and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *20*(1), 781–810.

Logothetis, C. J., & Lin, S. H. (2005). Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone. *Nature Reviews Cancer*, 5(1), 21–28.

Lou, J., Si, H., Chen, Y., Sun, X., Zhang, H., Niu, A., & Hu, C. (2014). Correlation between KLK6 expression and the clinicopathological features of glioma. *Contemporary oncology*, *18*(4), 246–251.

Lu, J., Shi, Q., Zhang, L., Wu, J., Lou, Y., Qian, J., Zhang, B., Wang, S., Wang, H., Zhao, X., & Han, B. (2019). Integrated Transcriptome Analysis Reveals KLK5 and L1CAM Predict Response to Anlotinib in NSCLC at 3rd Line. *Frontiers in Oncology*, *9, 886*.

Lundstrom, A., & Egelrud, T. (1991). Stratum corneum chymotryptic enzyme: A proteinase which may be generally present in the stratum corneum and with a possible involvement in desquamation. *Acta Dermato-Venereologica*, *71*(6), 471–474.

Lundwall, Å., & Brattsand, M. (2008). Kallikrein-related peptidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65 (13), 2019–2038.

Luo, L. Y., Yousef, G., Diamandis, E. P., Looijenga, L., & Bjartell, A. (2003). Human tissue kallikreins and testicular cancer. *APMIS*, *111*(1), 225–233.

Ma, S., Chan, Y. P., Kwan, P. S., Lee, T. K., Yan, M., Tang, K. H., Ling, M. T., Vielkind, J.

R., Guan, X. Y., & Chan, K. W. (2011). MicroRNA-616 induces androgen-independent growth of prostate cancer cells by suppressing expression of tissue factor pathway inhibitor TFPI-2. *Cancer Research*, *71*(2), 583–592.

Ma, H., Hockla, A., Mehner, C., Coban, M., Papo, N., Radisky, D. C., & Radisky, E. S. (2019). PRSS3/Mesotrypsin and kallikrein-related peptidase 5 are associated with poor prognosis and contribute to tumor cell invasion and growth in lung adenocarcinoma. *Scientific Reports*, *9*(1), 1844.

Mackman, N. (2006). Role of tissue factor in hemostasis and thrombosis. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, *36*(2), 104–107.

MacNee, W. (2005). Pulmonary and systemic oxidant/antioxidant imbalance in chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the American Thoracic Society*, *2*(1), 50–60.

Mägert, H. J., Ständker, L., Kreutzmann, P., Zucht, H. D., Reinecke, M., Sommerhoff, C. P., Fritz, H., & Forssmann, W. G. (1999). LEKTI, a novel 15-domain type of human serine proteinase inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(31), 21499–21502.

Magnen, M., Gueugnon, F., Guillon, A., Baranek, T., Thibault, V. C., Petit-Courty, A., de Veer, S. J., Harris, J., Humbles, A. A., Si-Tahar, M., & Courty, Y. (2017). Kallikrein-Related Peptidase 5 Contributes to H3N2 Influenza Virus Infection in Human Lungs. *Journal of Virology*, *91*(16), e00421-17.

Mandal, S. K., Pendurthi, U. R., & Rao, L. V. M. (2007). Tissue factor trafficking in fibroblasts: Involvement of protease-activated receptor-mediated cell signaling. *Blood*, *110*(1), 161–170.

Marchand, E. (2010). Études de longue durée évaluant les traitements pharmacologiques dans la BPCO. Enseignements et limites. *Revue des Maladies Respiratoires*, 27(2), 125–140.

Markovic, Z., Engel, J., Richter, H., & Hürmann, H. (1983). Discrimination of different domains in fibronectin on the basis of their stability against urea denaturation. *Hoppe-Seyler's Z Physiological Chemestry*, *364*(1), 551–562.

Matsumoto-Miyai, K., Ninomiya, A., Yamasaki, H., Tamura, H., Nakamura, Y., & Shiosaka, S. (2003). NMDA-dependent proteolysis of presynaptic adhesion molecule L1 in the hippocampus by neuropsin. *Journal of Neuroscience*, *23*(21), 7727–7736.

Matsumura, M., Bhatt, A. S., Andress, D., Clegg, N., Takayama, T. K., Craik, C. S., & Nelson, P. S. (2005). Substrates of the prostate-specific serine protease prostase/KLK4 defined by positional-scanning peptide libraries. *Prostate*, *62*(1), 1–13.

Matsunaga, K., Harada, M., Suizu, J., Oishi, K., Asami-Noyama, M., & Hirano, T. (2020). Comorbid Conditions in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Potential Therapeutic Targets for Unmet Needs. *Journal of Clinical Medicine*, *9*(10), 3078.

Mattsson, J. M., Ravela, S., Hekim, C., Jonsson, M., Malm, J., Närvänen, A., Stenman, U. H., & Koistinen, H. (2014). Proteolytic activity of prostate-specific antigen (PSA) towards protein substrates and effect of peptides stimulating PSA activity. *PLoS One*, *9*(9), e107819.

Mavridis, K., Talieri, M., & Scorilas, A. (2010). KLK5 gene expression is severely upregulated in androgen-independent prostate cancer cells after treatment with the chemotherapeutic agents docetaxel and mitoxantrone. *Biological Chemistry*, *391*(4),

467-474.

McAlinden, K. D., Deshpande, D. A., Ghavami, S., Xenaki, D., Sohal, S. S., Oliver, B. G., Haghi, M., & Sharma, P. (2019). Autophagy activation in asthma airways remodeling. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *60*(5), 541–553.

Meyer-Hoffert, U., Wu, Z., & Schröder, J. M. (2009). Identification of lympho-epithelial kazal-type inhibitor 2 in human skin as a kallikrein-related peptidase 5-specific protease inhibitor. *PLoS One*, *4*(2), e4372.

Meyer-Hoffert, U., Wu, Z., Kantyka, T., Fischer, J., Latendorf, T., Hansmann, B., Bartels, J., He, Y., Gläser, R., & Schröder, J. M. (2010). Isolation of SPINK6 in human skin: Selective inhibitor of kallikrein-related peptidases. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(42), 32174-32181.

Meyer-Hoffert, U., & Schröder, J. M. (2011). Epidermal proteases in the pathogenesis of rosacea. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, *15*(1), 16-23.

Michael, I. P., Kurlender, L., Memari, N., Yousef, G. M., Du, D., Grass, L., Stephan, C., Jung, K., & Diamandis, E. P. (2005a). Intron retention: A common splicing event within the human kallikrein gene family. *Clinical Chemistry*, *51*(3), 506–515.

Michael, I. P., Sotiropoulou, G., Pampalakis, G., Magklara, A., Ghosh, M., Wasney, G., & Diamandis, E. P. (2005b). Biochemical and enzymatic characterization of human kallikrein 5 (hK5), a novel serine protease potentially involved in cancer progression. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(15), 14628–14635.

Michael, I. P., Pampalakis, G., Mikolajczyk, S. D., Malm, J., Sotiropoulou, G., & Diamandis, E. P. (2006). 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*, *281*(18), 12743–12750.

Milara, J., Peiró, T., Serrano, A., & Cortijo, J. (2013). Epithelial to mesenchymal transition is increased in patients with COPD and induced by cigarette smoke. *Thorax*, *68*(5), 410–420.

Mitsudo, K., Jayakumar, A., Henderson, Y., Frederick, M. J., Kang, Y., Wang, M., El-Naggar, A. K., & Clayman, G. L. (2003). Inhibition of serine proteinases plasmin, trypsin, subtilisin A, cathepsin G, and elastase by LEKTI: A kinetic analysis. *Biochemistry*, *42*(13), 3874–3881.

Mitsui, S., Tsuruoka, N., Yamashiro, K., Nakazato, H., & Yamaguchi, N. (1999). A novel form of human neuropsin, a brain-related serine protease, is generated by alternative splicing and is expressed preferentially in human adult brain. *European Journal of Biochemistry*, *260*(3), 627–634.

Miyagi, Y., Koshikawa, N., Yasumitsu, H., Miyagi, E., Hirahara, F., Aoki, I., Misugi, K., Umeda, M., & Miyazaki, K. (1994). cDNA cloning and mRNA expression of a serine proteinase inhibitor secreted by cancer cells: Identification as placental protein 5 and tissue factor pathway inhibitor-2. *Journal of Biochemistry*, *116*(5), 939–942.

Miyai, M., Matsumoto, Y., Yamanishi, H., Yamamoto-Tanaka, M., Tsuboi, R., & Hibino, T. (2014). Keratinocyte-Specific Mesotrypsin Contributes to the Desquamation Process via Kallikrein Activation and LEKTI Degradation. *Journal of Investigative Dermatology*, *134*(6), 1665–1674.

Monzon, M. E., Casalino-Matsuda, S., & Forteza, R. M. (2006). Identification of glycosaminoglycans in human airway secretions. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *34*(2), 135–141.

Morse, J. O. (1978). Alpha 1-Antitrypsin Deficiency. *New England Journal of Medicine*, *299*(19), 1045–1048.

Morizane, S., Yamasaki, K., Kabigting, F. D., & Gallo, R. L. (2010). Kallikrein expression and cathelicidin processing are independently controlled in keratinocytes by calcium, vitamin D 3, and retinoic acid. *Journal of Investigative Dermatology*, 130(5), 1297–1306.

Mukai, S., Fukushima, T., Naka, D., Tanaka, H., Osada, Y., & Kataoka, H. (2008). Activation of hepatocyte growth factor activator zymogen (pro-HGFA) by human kallikrein 1-related peptidases. *FEBS Journal*, *275*(5), 1003–1017.

Mungai, P. T., Waypa, G. B., Jairaman, A., Prakriya, M., Dokic, D., Ball, M. K., & Schumacker, P. T. (2011). Hypoxia Triggers AMPK Activation through Reactive Oxygen Species-Mediated Activation of Calcium Release-Activated Calcium Channels. *Molecular and Cellular Biology*, *31*(17), 3531–3545.

Nadir, Y., & Brenner, B. (2016). Heparanase procoagulant activity in cancer progression. *Thrombosis Research*, *140*, 44–48.

Nam, R. K., Diamandis, E. P., Toi, A., Trachtenberg, J., Magklara, A., Scorilas, A., Papnastasiou, P. A., Jewett, M. A. S., & Narod, S. A. (2000). Serum human glandular kallikrein-2 protease levels predict the presence of prostate cancer among men with elevated prostate-specific antigen. *Journal of Clinical Oncology*, *18*(5), 1036–1042.

Neaud, V., Hisaka, T., Monvoisin, A., Bedin, C., Balabaud, C., Foster, D. C., Desmoulière, A., Kisiel, W., & Rosenbaum, J. (2000). Paradoxical pro-invasive effect of the serine proteinase inhibitor tissue factor pathway inhibitor-2 on human hepatocellular carcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(45), 35565–35569.

Needham, M., & Stockley, R. A. (2004). α1-Antitrypsin deficiency·3: Clinical manifestations and natural history. *Thorax*, 59(5), 441–445.

Nénan, S., Boichot, E., Lagente, V., & Bertrand, C. P. (2005). Macrophage elastase (MMP-12): A pro-inflammatory mediator ? *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *100* (supp 1), 167–172.

Neumann, G. and Kawaoka, Y. (2015). Transmission of influenza A viruses. Virology, 1. 234-246

Nisbet, A. D., Bremner, R. D., Herriot, R., Jandial, V., Horne, C. H. W., & Bohn, H. (1981). placental protein 5 (pp5): development of a radioimmunoassay and measurement of circulating levels in normal pregnancy. BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology, 88(5), 484–491.

Nylander-Lundqvist, E., & Egelrud, T. (1997). Formation of active IL-1β from pro-IL-1β catalyzed by stratum corneum chymotryptic enzyme in vitro. *Acta Dermato-Venereologica*, *77*(3), 203–206.

Ogawa, K., Yamada, T., Tsujioka, Y., Taguchi, J., Takahashi, M., Tsuboi, Y., Ujino, Y., Nakajima, M., Yamamoto, T., Akatsu, H., Mitsui, S., & Yamaguchi, N. (2000). Localization of a novel type trypsin-like serine protease, neurosin, in brain tissues of

Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, *54*(4), 419–426.

Ogushi, F., Fells, G. A., Hubbard, R. C., Straus, S. D., & Crystal, R. G. (1987). Z-Type α1-antitrypsin is less competent than M1-type α1-antitrypsin as an inhibitor of neutrophil elastase. *Journal of Clinical Investigation*, *80*(5), 1366–1374.

Oliveira, J. R., Bertolin, T. C., Andrade, D., Oliveira, L. C. G., Kondo, M. Y., Santos, J. A. N., Blaber, M., Juliano, L., Severino, B., Caliendo, G., Santagada, V., & Juliano, M. A. (2015). Specificity studies on Kallikrein-related peptidase 7 (KLK7) and effects of osmolytes and glycosaminoglycans on its peptidase activity. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, *1854*(1), 73–83.

Omori, H., Nonami, Y., & Morimoto, Y. (2005). Effect of smoking on FEV1 decline in a cross-sectional and longitudinal study of a large cohort of Japanese males. *Respirology*, *10*(4), 464–469.

Öner, D., Ghosh, M., Coorens, R., Bové, H., Moisse, M., Lambrechts, D., Ameloot, M., Godderis, L., & Hoet, P. H. M. (2020). Induction and recovery of CpG site specific methylation changes in human bronchial cells after long-term exposure to carbon nanotubes and asbestos. *Environment International*, *137*, 105530.

Ortloff, A., Bustamante, F. A., Molina, L., Ojeda, J., Figueroa, C. D., & Ehrenfeld, P. (2020). Kallikrein-related Peptidase 5 (KLK5) Expression and Distribution in Canine Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Comparative Pathology*, *174*, 113–119.

Ouagued, M., Martin-Chouly, C. A. E., Brinchault, G., Leportier-Comoy, C., Depincé, A., Bertrand, C., Lagente, V., Belleguic, C., & Pruniaux, M. P. (2005). The novel phosphodiesterase 4 inhibitor, CI-1044, inhibits LPS-induced TNF-α production in whole blood from COPD patients. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, *18*(1), 49–54.

Ozge, C., Bozlu, M., Ozgur, E. S., Tek, M., Tunckiran, A., Muslu, N., & Ilvan, A. (2015). The impact of hypoxemia on serum total and free prostate-specific antigen levels in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Medical Oncology*, *32*(5), 1–4.

Pain, M., Bermudez, O., Lacoste, P., Royer, P. J., Botturi, K., Tissot, A., Brouard, S., Eickelberg, O., & Magnan, A. (2014). Tissue remodelling in chronic bronchial diseases: From the epithelial to mesenchymal phenotype. *European Respiratory Review*, 23 (131), 118–130.

Pampalakis, G., Diamandis, E. P., & Sotiropoulou, G. (2006). The epigenetic basis for the aberrant expression of kallikreins in human cancers. *Biological Chemistry*, *387*(6), 795–799.

Pampalakis, G., & Sotiropoulou, G. (2007). Tissue kallikrein proteolytic cascade pathways in normal physiology and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Cancer*, 1776 (1), 22–31.

Pampalakis, G., Prosnikli, E., Agalioti, T., Vlahou, A., Zoumpourlis, V., & Sotiropoulou, G. (2009). A tumor-protective role for Human kallikrein-related peptidase 6 in breast cancer mediated by inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Research*, *69*(9), 3779–3787.

Pampalakis, G., Zingkou, E., & Sotiropoulou, G. (2018). KLK5, a novel potential suppressor

of vaginal carcinogenesis. *Biological Chemistry*, *399*(9), 1107-1111.

Pampalakis, G., Zingkou, E., Kaklamanis, L., Spella, M., Stathopoulos, G. T., & Sotiropoulou, G. (2019). Elimination of KLK5 inhibits early skin tumorigenesis by reducing epidermal proteolysis and reinforcing epidermal microstructure. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1865*(11), 165520.

Panos, M., Christophi, G. P., Rodriguez, M., & Scarisbrick, I. A. (2014). Differential expression of multiple kallikreins in a viral model of multiple sclerosis points to unique roles in the innate and adaptive immune response. *Biological Chemistry*, *395*(9), 1063–1073.

Papachristopoulou, G., Talieri, M., & Scorilas, A. (2013). Significant alterations in the expression pattern of kallikrein-related peptidase genes KLK4, KLK5 and KLK14 after treatment of breast cancer cells with the chemotherapeutic agents epirubicin, docetaxel and methotrexate. *Tumor Biology*, *34*(1), 369-378.

Papagerakis, P., Pannone, G., Zheng, L., Athanassiou-Papaefthymiou, M., Yamakoshi, Y., McGuff, H. S., Shkeir, O., Ghirtis, K., & Papagerakis, S. (2015). Clinical significance of kallikrein-related peptidase-4 in oral cancer. *Anticancer Research*, *35*(4), 1861–1866.

Papandreou, I., Lim, A. L., Laderoute, K., & Denko, N. C. (2008). Hypoxia signals autophagy in tumor cells via AMPK activity, independent of HIF-1, BNIP3, and BNIP3L. *Cell Death and Differentiation*, *15*(10), 1572–1581.

Pasic, M. D., Olkhov, E., Bapat, B., & Yousef, G. M. (2012). Epigenetic regulation of kallikrein-related peptidases: There is a whole new world out there. *Biological Chemistry*, *393*(5), 319–330.

Peeney, D., Jensen, S. M., Castro, N. P., Kumar, S., Noonan, S., Handler, C., Kuznetsov, A., Shih, J., Tran, A. D., Salomon, D. S., & Stetler-Stevenson, W. G. (2020). TIMP-2 suppresses tumor growth and metastasis in murine model of triple-negative breast cancer. *Carcinogenesis*, *41*(3), 313–325.

Peerschke, E. I. B., Petrovan, R. J., Ghebrehiwet, B., & Ruf, W. (2004). Tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2) recognizes the complement and kininogen binding protein gCIqR/p33 (gCIqR): Implications for vascular inflammation. *Thrombosis and Haemostasis*, *92*(4), 811–819.

Perona, J. J., & Craik, C. S. (1997). Evolutionary divergence of substrate specificity within the chymotrypsin-like serine protease fold. *Journal of Biological Chemistry*, 272 (48), 29987–29990.

Perotin, J. M., Adam, D., Vella-Boucaud, J., Delepine, G., Sandu, S., Jonvel, A. C., Prevost, A., Berthiot, G., Pison, C., Lebargy, F., Birembaut, P., Coraux, C., & Deslee, G. (2014). Delay of airway epithelial wound repair in COPD is associated with airflow obstruction severity. *Respiratory Research*, *15*(1), 151.

Petersen, L. C., Sprecher, C. A., Foster, D. C., Blumberg, H., Hamamoto, T., & Kisiel, W. (1996). Inhibitory properties of a novel human Kunitz-type protease inhibitor homologous to tissue factor pathway inhibitor. *Biochemistry*, *35*(1), 266–272.

Pigors, M., Sarig, O., Heinz, L., Plagnol, V., Fischer, J., Mohamad, J., Malchin, N., Rajpopat, S., Kharfi, M., Lestringant, G. G., Sprecher, E., Kelsell, D. P., & Blaydon, D. C. (2016). Loss-of-Function Mutations in SERPINB8 Linked to Exfoliative Ichthyosis with

Impaired Mechanical Stability of Intercellular Adhesions. *American Journal of Human Genetics*, *99*(2), 430–436.

Planque, C., De Monte, M., Guyetant, S., Rollin, J., Desmazes, C., Panel, V., Lemarié, E., & Courty, Y. (2005). KLK5 and KLK7, two members of the human tissue kallikrein family, are differentially expressed in lung cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *329*(4), 1260–1266.

Planque, C., Li, L., Zheng, Y., Soosaipillai, A., Reckamp, K., Chia, D., Diamandis, E. P., & Goodglick, L. (2008). A multiparametric serum kallikrein panel for diagnosis of non-small cell lung carcinoma. *Clinical Cancer Research*, *14*(5), 1355–1362.

Pou, J., Rebollo, A., Piera, L., Merlos, M., Roglans, N., Laguna, J. C., & Alegret, M. (2011). Tissue factor pathway inhibitor 2 is induced by thrombin in human macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1813*(6), 1254–1260.

Prassas, I., Eissa, A., Poda, G., & Diamandis, E. P. (2015). Unleashing the therapeutic potential of human kallikrein-related serine proteases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14 (3), 183–202.

Ramsay A. J., Dong Y., Hunt M. L., Linn M., Samaratunga H., Clements J. A., Hooper J. D. (2008). Kallikrein-related peptidase 4 (KLK4) initiates intracellular signaling via protease-activated receptors (PARs). KLK4 and PAR-2 are co-expressed during prostate cancer progression. *Journal of Biological Chemistry, 2083 (18) : 1229-1304.*

Rao, C. N., Liu, Y. Y., Peavey, C. L., & Woodley, D. T. (1995). Novel extracellular matrix-associated serine proteinase inhibitors from human skin fibroblasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *317*(1), 311–314.

Rao, C. N., Reddy, P., Liu, Y., O'Toole, E., Reeder, D., Foster, D. C., Kisiel, W., & Woodley, D. T. (1996). Extracellular matrix-associated serine protease inhibitors (M(r) 33,000, 31,000, and 27,000) are single-gene products with differential glycosylation: cDNA cloning of the 33-kDa inhibitor reveals its identity to tissue factor pathway inhibitor-2. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *335*(1), 82–92.

Rao, C. N., Cook, B., Liu, Y., Chilukuri, K., Stack, M. S., Foster, D. C., Kisiel, W., & Woodley, D. T. (1998). HT-1080 fibrosarcoma cell matrix degradation and invasion are inhibited by the matrix-associated serine protease inhibitor TFPI-2/33 kDa MSPI. *International Journal of Cancer*, *76*(5), 749–756.

Rao, C. N., Mohanam, S., Puppala, A., & Rao, J. S. (1999). Regulation of ProMMP-1 and ProMMP-3 activation by tissue factor pathway Inhibitor-2/Matrix-Associated serine protease inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *255*(1), 94–98.

Ravikumar, B., Sarkar, S., Davies, J. E., Futter, M., Garcia-Arencibia, M., Green-Thompson, Z. W., Jimenez-Sanchez, M., Korolchuk, V. I., Lichtenberg, M., Luo, S., Massey, D. C. O., Menzies, F. M., Moreau, K., Narayanan, U., Renna, M., Siddiqi, F. H., Underwood, B. R., Winslow, A. R., & Rubinsztein, D. C. (2010). Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*, *90*(4), 1383–1435.

Rawlings, A. V., & Matts, P. J. (2005). Stratum Corneum Moisturization at the Molecular Level: An update in relation to the dry skin cycle. *Journal of Investigative Dermatology*, 124 (6), 1099–1110.

Reddel, R. R., Lechner, J. F., Gerwin, B. I., & Harris, C. C. (1989). Immortalized human bronchial epitherial mesothelial cell lines. US Patent 4, 885, 238.

Rhyu, D. Y., Yang, Y., Ha, H., Lee, G. T., Song, J. S., Uh, S. T., & Lee, H. B. (2005). Role of reactive oxygen species in TGF-β1-induced mitogen-activated protein kinase activation and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells. *Journal of the American Society of Nephrology*, 16 (3), 667–675.

Riegman, P. H. J., Vlietstra, R. J., van der Korput, J. A. G. M., Romijn, J. C., & Trapman, J. (1989). Characterization of the Prostate-specific Antigen gene: A novel human kallikrein-like gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *159*(1), 95–102.

Ritchie, A. I., & Wedzicha, J. A. (2020). Definition, causes, Pathogenesis and Concequences of Chronic Obstructive Pulmonary Disease, Exacerbations. *Clinics in Chest Medicine*, 41 (3), 421-438.

Rock, J. R., Randell, S. H., & Hogan, B. L. M. (2010). Airway basal stem cells: A perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling. *Disease Models and Mechanisms*, 3 (9–10), 545–556.

Rogers, D. F. (2003). The airway goblet cell. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 35 (1), 1–6.

Rogers, D. F. (2007). Physiology of airway mucus secretion and pathophysiology of hypersecretion. *Respiratory Care*, *52*(9), 1134–1146.

Rollin, J., Iochmann, S., Bléchet, C., Hubé, F., Régina, S., Guyétant, S., Lemarié, E., Reverdiau, P., & Gruel, Y. (2005). Expression and methylation status of tissue factor pathway inhibitor-2 gene in non-small-cell lung cancer. *British Journal of Cancer*, *92*(4), 775–783.

Rollin, J, Régina, S., Vourc'h, P., Iochmann, S., Bléchet, C., Reverdiau, P., & Gruel, Y. (2007). Influence of MMP-2 and MMP-9 promoter polymorphisms on gene expression and clinical outcome of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, *56*(2), 273–280.

Ruf, W., Seftor, E. A., Petrovan, R. J., Weiss, R. M., Gruman, L. M., Margaryan, N. V., Seftor, R. E. B., Miyagi, Y., & Hendrix, M. J. C. (2003). Differential role of tissue factor pathway inhibitors 1 and 2 in melanoma vasculogenic mimicry. *Cancer Research*, *63*(17), 5381–5389.

Russell, R. E. K., Culpitt, S. V., DeMatos, C., Donnelly, L., Smith, M., Wiggins, J., & Barnes, P. J. (2002). Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *26*(5), 602–609.

Samaan, S., Lichner, Z., Ding, Q., Saleh, C., Samuel, J., Streutker, C., & Yousef, G. M. (2014). Kallikreins are involved in an miRNA network that contributes to prostate cancer progression. *Biological Chemistry*, *395*(9), 991–1001.

Sandford, A. J., Weir, T. D., & Paré, P. D. (1997). Genetic risk factors for chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal*, *10*(6), 1380–1391.

Sato, N., Parker, A. R., Fukushima, N., Miyagi, Y., Iacobuzio-Donahue, C. A., Eshleman, J. R., & Goggins, M. (2005). Epigenetic inactivation of TFPI-2 as a common mechanism

associated with growth and invasion of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene*, *24*(5), 850–858.

Schaffner, F., & Ruf, W. (2009). Tissue factor and PAR2 signaling in the tumor microenvironment. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *29*(12), 1999–2004.

Schamberger, A. C., Staab-Weijnitz, C. A., Mise-Racek, N., & Eickelberg, O. (2015). Cigarette smoke alters primary human bronchial epithelial cell differentiation at the air-liquid interface. *Scientific Reports*, *5*, 8163.

Schechter, N. M., Choi, E. J., Wang, Z. M., Hanakawa, Y., Stanley, J. R., Kang, Y., Clayman, G. L., & Jayakumar, A. (2005). Inhibition of human kallikreins 5 and 7 by the serine protease inhibitor lympho-epithelial Kazal-type inhibitor (LEKTI). *Biological Chemistry*, *386*(11), 1173–1184.

Scotton, C. J., & Chambers, R. C. (2007). Molecular targets in pulmonary fibrosis: The myofibroblast in focus. *Chest*, *132*(4), 1311–1321.

Sells, E., Pandey, R., Chen, H., Skovan, B. A., Cui, H., & Ignatenko, N. A. (2017). Specific microRNA–mRNA Regulatory Network of Colon Cancer Invasion Mediated by Tissue Kallikrein–Related Peptidase 6. *Neoplasia (United States)*, *19*(5), 396–411.

Seppälä, M., Wahlström, T., & Bohn, H. (1979). Circulating levels and tissue localization of placental protein five (PP5) in pregnancy and tropho-blastic disease: Absence of PP5 expression in the malignant trophoblast. *International Journal of Cancer*, 24(1), 6–10.

Shahinian, H., Loessner, D., Biniossek, M. L., Kizhakkedathu, J. N., Clements, J. A., Magdolen, V., & Schilling, O. (2014). Secretome and degradome profiling shows that Kallikrein-related peptidases 4, 5, 6, and 7 induce TGFβ-1 signaling in ovarian cancer cells. *Molecular Oncology*, *8*(1), 68–82.

Shang, Z., Niu, Y., Cai, Q., Chen, J., Tian, J., Yeh, S., Lai, K. P., & Chang, C. (2014). Human kallikrein 2 (KLK2) promotes prostate cancer cell growth via function as a modulator to promote the ARA70-enhanced androgen receptor transactivation. *Tumor Biology*, *35*(3), 1881–1890.

Shapiro, S. D., Goldstein, N. M., Houghton, A. M. G., Kobayashi, D. K., Kelley, D., & Belaaouaj, A. (2003). Neutrophil Elastase Contributes to Cigarette Smoke-Induced Emphysema in Mice. *American Journal of Pathology*, *163*(6), 2329–2335.

Shaw, J. L. V., Petraki, C., Watson, C., Bocking, A., & Diamandis, E. P. (2008). Role of tissue kallikrein-related peptidases in cervical mucus remodeling and host defense. *Biological Chemistry*, *389*(12), 1513–1522.

Shi, J., Li, F., Luo, M., Wei, J., & Liu, X. (2017). Distinct Roles of Wnt/ β-Catenin Signaling in the Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Mediators of Inflammation*, 2017, 3520581.

Shinoda, E., Yui, Y., Hattori, R., Tanaka, M., Inoue, R., Aoyama, T., Takimoto, Y., Mitsui, Y., Miyahara, K., Shizuta, Y., & Sasayama, S. (1999). Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel mitogen for vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(9), 5379–5384.

Shinoda, Y., Kozaki, K. I., Imoto, I., Obara, W., Tsuda, H., Mizutani, Y., Shuin, T., Fujioka, T., Miki, T., & Inazawa, J. (2007). Association of KLK5 overexpression with

invasiveness of urinary bladder carcinoma cells. *Cancer Science*, *98*(7), 1078-86.

Sidiropoulos, K. G., White, N. M. A., Bui, A., Ding, Q., Boulos, P., Pampalakis, G., Khella, H., Samuel, J. N., Sotiropoulou, G., & Yousef, G. M. (2014). Kallikrein-related peptidase 5 induces miRNA-mediated antioncogenic pathways in breast cancer. *Oncoscience*, *1*(11), 709–724.

Sidiropoulos, K. G., Ding, Q., Pampalakis, G., White, N. M. A., Boulos, P., Sotiropoulou, G., & Yousef, G. M. (2016). KLK6-regulated miRNA networks activate oncogenic pathways in breast cancer subtypes. *Molecular Oncology*, *10*(7), 993–1007.

Sierko, E., Wojtukiewicz, M. Z., & Kisiel, W. (2007). The role of tissue factor pathway inhibitor-2 in cancer biology. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 33(7), 653–659.

Simmer, J. P., Fukae, M., Tanabe, T., Yamakoshi, Y., Uchida, T., Xue, J., Margolis, H. C., Shimizu, M., DeHart, B. C., Hu, C. C., & Bartlett, J. D. (1998). Purification, characterization, and cloning of enamel matrix serine proteinase 1. *Journal of Dental Research*, *77*(2), 377–386.

Skala, W., Utzschneider, D. T., Magdolen, V., Debela, M., Guo, S., Craik, C. S., Brandstetter, H., & Goettig, P. (2014). Structure-function analyses of human kallikrein-related peptidase 2 establish the 99-loop as master regulator of activity. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(49), 34267–34283.

Skerrow, C. J., Clelland, D. G., & Skerrow, D. (1989). Changes to desmosomal antigens and lectin-binding sites during differentiation in normal human epidermis: a quantitative ultrastructural study. *Journal of Cell Science*, *92(Pt 4)*, 667-77.

Slim, R., Torremocha, F., Moreau, T., Pizard, A., Hunt, S. C., Vuagnat, A., Williams, G. H., Gauthier, F., Jeunemaitre, X., & Alhenc-Gelas, F. (2002). Loss-of-function polymorphism of the human kallikrein gene with reduced urinary kallikrein activity. *Journal of the American Society of Nephrology*, *13*(4), 968–976.

Soff, G. A. (2000). Angiostatin and angiostatin-related proteins. *Cancer and Metastasis Reviews*, 19(1–2), 97-107

Sohal, Sukhwinder S., Reid, D., Soltani, A., Ward, C., Weston, S., Muller, H. K., Wood-Baker, R., & Walters, E. H. (2010). Reticular basement membrane fragmentation and potential epithelial mesenchymal transition is exaggerated in the airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology*, *15*(6), 930–938.

Sohal, Sukhwinder S., Reid, D., Soltani, A., Ward, C., Weston, S., Muller, H. K., Wood-Baker, R., & Walters, E. H. (2011). Evaluation of epithelial mesenchymal transition in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory Research*, *12*(1), 130.

Sohal, Sukhwinder Singh, Soltani, A., Reid, D., Ward, C., Wills, K. E., Muller, H. K., & Walters, E. H. (2014). A randomized controlled trial of inhaled corticosteroids (ICS) on markers of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in large airway samples in COPD: An exploratory proof of concept study. *International Journal of COPD*, *9*, 533–542.

Soltani, A., Reid, D. W., Sohal, S. S., Wood-Baker, R., Weston, S., Muller, H. K., & Walters, E. H. (2010). Basement membrane and vascular remodelling in smokers and chronic obstructive pulmonary disease: A cross-sectional study. *Respiratory Research*, *11*(1), 105.

Sotiropoulou, G., Rogakos, V., Tsetsenis, T., Pampalakis, G., Zafiropoulos, N., Simillides, G., Yiotakis, A., & Diamandis, E. P. (2002). Emerging Interest in the Kallikrein Gene Family for Understanding and Diagnosing Cancer. *Oncology Research*, *13*(6–10), 381–391.

Sotiropoulou, G., & Pampalakis, G. (2010). Kallikrein-related peptidases: Bridges between immune functions and extracellular matrix degradation. *Biological Chemistry*, *391*(4), 321–331.

SPLF. Société de Pneumologie de Langue Française. (2003). [Guidelines for the clinical management of COPD. Other drugs]. *Revue Des Maladies Respiratoires*, *20*(3 Pt2), S40-5.

Sprecher, C. A., Kisiel, W., Mathewes, S., & Foster, D. C. (1994). Molecular cloning, expression, and partial characterization of a second human tissue-factor-pathway inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(8), 3353–3357.

Staudt, M. R., Buro-Auriemma, L. J., Walters, M. S., Salit, J., Vincent, T., Shaykhiev, R., Mezey, J. G., Tilley, A. E., Kaner, R. J., Ho, M. W. Y., & Crystal, R. G. (2014). Airway basal stem/progenitor cells have diminished capacity to regenerate airway epithelium in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 190 (8), 955–958.

Stefanini, A. C. B., Da Cunha, B. R., Henrique, T., & Tajara, E. H. (2015). Involvement of kallikrein-related peptidases in normal and pathologic processes. *Disease Markers*, 2015, 946572.

Stefansson, K., Brattsand, M., Ny, A., Glas, B., & Egelrud, T. (2006). Kallikrein-related peptidase 14 may be a major contributor to trypsin-like proteolytic activity in human stratum corneum. *Biological Chemistry*, *387*(6), 761-8.

Stevenson, C. S., Koch, L. G., & Britton, S. L. (2006). Aerobic capacity, oxidant stress, and chronic obstructive pulmonary disease - A new take on an old hypothesis. *Pharmacology and Therapeutics*, 110(1), 71–82.

Stewart, C. E., Torr, E. E., Mohd Jamili, N. H., Bosquillon, C., & Sayers, I. (2012). Evaluation of Differentiated Human Bronchial Epithelial Cell Culture Systems for Asthma Research. *Journal of Allergy*, *2012*, 1–11.

Stockley, R. A. (1999). Neutrophils and protease/antiprotease imbalance. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *160*(5-2), S49-52.

Straus, M.R. and Whittaker, G.R. (2017). A peptide-based approach to evaluate the adaptability of influenza A virus to humans based on its hemagglutinin proteolytic cleavage site. PLoS One, 12, e0174827.

Sun, J., Chu, S., Lu, M., Pan, Q., Li, D., Zheng, S., & Ma, L. (2020). The roles of dipeptidyl peptidase-4 and its inhibitors in the regulation of airway epithelial-mesenchymal transition. *Experimental Lung Research*, *46*(6), 163–173.

Tailor, P. D., Kodeboyina, S. K., Bai, S., Patel, N., Sharma, S., Ratnani, A., Copland, J. A., She, J. X., & Sharma, A. (2018). Diagnostic and prognostic biomarker potential of kallikrein family genes in different cancer types. *Oncotarget*, *9*(25), 17876-17888.

Talieri, M., Devetzi, M., Scorilas, A., Prezas, P., Ardavanis, A., Apostolaki, A., & Karameris,

A. (2011). Evaluation of kallikrein-related peptidase 5 expression and its significance for breast cancer patients: Association with kallikrein-related peptidase 7 expression. *Anticancer Research*, *31*(9), 3093-3100.

Tamir, A., Jag, U., Sarojini, S., Schindewolf, C., Tanaka, T., Gharbaran, R., Patel, H., Sood, A., Hu, W., Patwa, R., Blake, P., Chirina, P., Jeong, J. O., Lim, H., Goy, A., Pecora, A., & Suh, K. S. (2014). Kallikrein family proteases KLK6 and KLK7 are potential early detection and diagnostic biomarkers for serous and papillary serous ovarian cancer subtypes. *Journal of Ovarian Research*, *7*(1), 109.

Tamura, H., Kawata, M., Hamaguchi, S., Ishikawa, Y., & Shiosaka, S. (2012). Processing of neuregulin-1 by neuropsin regulates GABAergic neuron to control neural plasticity of the mouse hippocampus. *Journal of Neuroscience*, *32*(37), 12657–12672.

Tan, O. L., Whitbread, A. K., Clements, J. A., & Dong, Y. (2006). Kallikrein-related peptidase (KLK) family mRNA variants and protein isoforms in hormone-related cancers: do they have a function? *Biological Chemestry*, *387*, 697–705.

Tashkin, D. P., & Strange, C. (2018). Inhaled corticosteroids for chronic obstructive pulmonary disease: What is their role in therapy? *International Journal of COPD*, *13*, 2587–2601.

Tasiou, A., Konduri, S. D., Yanamandra, N., Dinh, D. H., Olivero, W. C., Gujrati, M., Obeyesekere, M., & Rao, J. S. (2001). A novel role of tissue factor pathway inhibitor-2 in apoptosis of malignant human gliomas. *International Journal of Oncology*, *19*(3), 591–597.

Thorpe, J. H., Edgar, E. V., Smith, K. J., Lewell, X. Q., Rella, M., White, G. V., Polyakova, O., Nassau, P., Walker, A. L., Holmes, D. S., Pearce, A. C., Wang, Y., Liddle, J., & Hovnanian, A. (2019). Evaluation of a crystallographic surrogate for kallikrein 5 in the discovery of novel inhibitors for Netherton syndrome. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, *75* (Pt5), 385-391.

Tian, X., Shigemasa, K., Hirata, E., Gu, L., Uebaba, Y., Nagai, N., O'Brien, T. J., & Ohama, K. (2004). Expression of human kallikrein 7 (hK7/SCCE) and its inhibitor antileukoprotease (ALP/SLPI) in uterine endocervical glands and in cervical adenocarcinomas. *Oncology Reports*, *12*(5), 1001–1006.

Tomasini-Johansson, B. R., Annis, D. S., & Mosher, D. F. (2006). The N-terminal 70-kDa fragment of fibronectin binds to cell surface fibronectin assembly sites in the absence of intact fibronectin. *Matrix Biology*, *25*(5), 282–293.

Trautmann, A., Krüger, K., Akdis, M., Müller-Wening, D., Akkaya, A., Bröcker, E. B., Blaser, K., & Akdis, C. A. (2005). Apoptosis and loss of adhesion of bronchial epithelial cells in asthma. *International Archives of Allergy and Immunology*, *138*(2), 142–150.

Uysal, P., & Uzun, H. (2019). Relationship between circulating serpina3g, matrix metalloproteinase-9, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and-2 with chronic obstructive pulmonary disease severity. *Biomolecules*, *9*(2), 62.

Vadivel, K., Ponnuraj, S. M., Kumar, Y., Zaiss, A. K., Bunce, M. W., Camire, R. M., Wu, L., Evseenko, D., Herschman, H. R., Bajaj, M. S., & Paul Bajaj, S. (2014). Platelets contain tissue factor pathway inhibitor-2 derived from megakaryocytes and inhibits fibrinolysis. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(45), 31647–31661.

Van Haarst, A., McGarvey, L., & Paglialunga, S. (2019). Review of Drug Development Guidance to Treat Chronic Obstructive Pulmonary Disease: US and EU Perspectives. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, *106*(6), 1222–1235.

Van Dijk, M., Gan, C. T., Koster, T. D., Wijkstra, P. J., Slebos, D.-J., Kerstjens, H. A. M., van der Vaart, H., & Duiverman, M. L. (2020). Treatment of severe stable COPD: the multidimensional approach of treatable traits. *ERJ Open Research*, *6*(3), 00322–2019.

Vasilopoulos, Y., Cork, M. J., Murphy, R., Williams, H. C., Robinson, D. A., Duff, G. W., Ward, S. J., & Tazi-Ahnini, R. (2004). Genetic association between an AACC insertion in the 3′UTR of the stratum corneum chymotryptic enzyme gene and atopic dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*, *123*(1), 62–66.

Veljkovic, E., Jiricny, J., Menigatti, M., Rehrauer, H., & Han, W. (2011). Chronic exposure to cigarette smoke condensate in vitro induces epithelial to mesenchymal transition-like changes in human bronchial epithelial cells, BEAS-2B. *Toxicology in Vitro*, *25*(2), 446–453.

Versteeg, H. H., Schaffner, F., Kerver, M., Petersen, H. H., Ahamed, J., Felding-Habermann, B., Takada, Y., Mueller, B. M., & Ruf, W. (2008). Inhibition of tissue factor signaling suppresses tumor growth. *Blood*, *111*(1), 190–199.

Vleugel, M. M., Greijer, A. E., Bos, R., van der Wall, E., & van Diest, P. J. (2006). c-Jun activation is associated with proliferation and angiogenesis in invasive breast cancer. *Human Pathology*, *37*(6), 668–674.

Walley, A. J., Chavanas, S., Moffatt, M. F., Esnouf, R. M., Ubhi, B., Lawrence, R., Wong, K., Abecasis, G. R., Jones, E. Y., Harper, J. I., Hovnanian, A., & Cookson, W. O. C. M. (2001). Gene polymorphism in Netherton and common atopic disease. *Nature Genetics*, 29(1), 175-178.

Wang, Y., Luo, W., & Reiser, G. (2008). Trypsin and trypsin-like proteases in the brain: Proteolysis and cellular functions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(2), 237–252.

Wang, R., Ahmed, J., Wang, G., Hassan, I., Strulovici-Barel, Y., Hackett, N. R., & Crystal, R. G. (2011). Down-regulation of the canonical wnt β-catenin pathway in the airway epithelium of healthy smokers and smokers with CO*PD. PLoS One, 6*(4), e14793.

Wang, Q., Wang, Y., Zhang, Y., Zhang, Y., & Xiao, W. (2013a). The role of uPAR in epithelial-mesenchymal transition in small airway epithelium of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory Research*, *14*(1), 67.

Wang, S. K., Hu, Y., Simmer, J. P., Seymen, F., Estrella, N. M. R. P., Pal, S., Reid, B. M., Yildirim, M., Bayram, M., Bartlett, J. D., & Hu, J. C. C. (2013b). Novel KLK4 and MMP20 mutations discovered by whole-exome sequencing. *Journal of Dental Research*, *92*(3), 266–271.

Wang, G. J., Wang, Y. Bin, Li, D. N., Li, C., & Deng, B. B. (2014). Expression of tissue factor pathway inhibitor-2 in gastric stromal tumor and its clinical significance. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *7*(2), 513–517.

Wang, Q., Wang, Y., Zhang, Y., Zhang, Y., & Xiao, W. (2015a). Involvement of urokinase in cigarette smoke extract-induced epithelial-mesenchymal transition in human small airway epithelial cells. *Laboratory Investigation*, *95*(5), 469–479.

Wang, Xue, Ren, Y., Zhuang, H., Meng, X., Huang, S., Li, Y., Hehir, M., & Wang, P. (2015b). Decrease of phosphorylated proto-oncogene CREB at ser 133 site inhibits growth and metastatic activity of renal cell cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, *19*(7), 985–995.

Wang, G., Zeng, Y., Chen, S., Li, D., Li, W., Zhou, Y., Singer, R. H., & Gu, W. (2017). Localization of TFPI-2 in the nucleus modulates MMP-2 gene expression in breast cancer cells. *Scientific Reports*, *7*(1), 13575.

Wang, P., Magdolen, V., Seidl, C., Dorn, J., Drecoll, E., Kotzsch, M., Yang, F., Schmitt, M., Schilling, O., Rockstroh, A., Clements, J. A., & Loessner, D. (2018a). Kallikrein-related peptidases 4, 5, 6 and 7 regulate tumour-associated factors in serous ovarian cancer. *British Journal of Cancer*, *119*(7), 1-9.

Wang, Xiaoyun, Polverino, F., Rojas-Quintero, J., Zhang, D., Sánchez, J., Yambayev, I., Lindqvist, E., Virtala, R., Djukanovic, R., Davies, D. E., Wilson, S., O'Donnell, R., Cunoosamy, D., Hazon, P., Higham, A., Singh, D., Olsson, H., & Owen, C. A. (2018b). A disintegrin and metalloproteinase Domain-9: A novel proteinase culprit with multifarious contributions to chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *198*(12), 1500–1518.

Wang, G., Huang, W., Li, W., Chen, S., Chen, W., Zhou, Y., Peng, P., & Gu, W. (2018c). TFPI-2 suppresses breast cancer cell proliferation and invasion through regulation of ERK signaling and interaction with actinin-4 and myosin-9. *Scientific Reports*, *8*(1), 14402.

Wang, C., Zhou, J., Wang, J., Li, S., Fukunaga, A., Yodoi, J., & Tian, H. (2020). Progress in the mechanism and targeted drug therapy for COPD. *Signal Transduction and Targeted,* 5(1), 248.

Watrowski, R., Castillo-Tong, D. C., Obermayr, E., & Zeillinger, R. (2020). Gene expression of kallikreins in breast cancer cell lines. *Anticancer Research*, *40*(5), 2487-2495.

Welsh, J. B., Sapinoso, L. M., Kern, S. G., Brown, D. A., Liu, T., Bauskin, A. R., Ward, R. L., Hawkins, N. J., Quinn, D. I., Russell, P. J., Sutherland, R. L., Breit, S. N., Moskaluk, C. A., Frierson, H. F., & Hampton, G. M. (2003). Large-scale delineation of secreted protein biomarkers overexpressed in cancer tissue and serum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(6), 3410–3415.

White, N. M.A., Chow, T. F. F., Mejia-Guerrero, S., Diamandis, M., Rofael, Y., Faragalla, H., Mankaruous, M., Gabril, M., Girgis, A., & Yousef, G. M. (2010a). Three dysregulated miRNAs control kallikrein 10 expression and cell proliferation in ovarian cancer. *British Journal of Cancer*, *102*(8), 1244–1253.

White, N. M., Bui, A., Mejia-Guerrero, S., Chao, J., Soosaipillai, A., Youssef, Y., Mankaruos, M., Honey, R. J., Stewart, R., Pace, K. T., Sugar, L., Diamandis, E. P., Doré, J., & Yousef, G. M. (2010b). Dysregulation of kallikrein-related peptidases in renal cell carcinoma: Potential targets of miRNAs. *Biological Chemistry*, *391*(4), 411–423.

White, Nicole M.A., Youssef, Y. M., Fendler, A., Stephan, C., Jung, K., & Yousef, G. M. (2012). The miRNA-kallikrein axis of interaction: A new dimension in the pathogenesis of prostate cancer. *Biological Chemistry*, *393*(5), 379–389.

White, G. V., Edgar, E. V., Holmes, D. S., Lewell, X. Q., Liddle, J., Polyakova, O., Smith, K. J., Thorpe, J. H., Walker, A. L., Wang, Y., Young, R. J., & Hovnanian, A. (2019).

Kallikrein 5 inhibitors identified through structure based drug design in search for a treatment for Netherton Syndrome. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, *29*(6), 821-825.

Willis, B. C., & Borok, Z. (2007). TGF-β-induced EMT: Mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 293 (3), L525-35.

Wong, C. M., Ng, Y. L., Lee, J. M. F., Wong, C. C. L., Cheung, O. F., Chan, C. Y., Tung, E. K. K., Ching, Y. P., & Ng, I. O. L. (2007). Tissue factor pathway inhibitor-2 as a frequently silenced tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, *45*(5), 1129–1138.

Wu, H. L., Shi, G. Y., Wohl, R. C., & Bender, M. L. (1987). Structure and formation of microplasmin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *84*(24), 8793-8795.

Wu, Y., Chen, Y., Li, Q., Gong, Y., Liu, X., Bi, L., & Hu, C. (2016). Upregulation of kallikrein-related peptidase 5 is associated with the malignant behavior of colorectal cancer. *Molecular Medicine Reports*, *14*(3), 2164–2170.

Wu, S. R., Lin, C. H., Shih, H. P., Ko, C. J., Lin, H. Y., Lan, S. W., Lin, H. H., Tu, H. F., Ho, C. C., Huang, H. P., & Lee, M. S. (2019). HAI-2 as a novel inhibitor of plasmin represses lung cancer cell invasion and metastasis. *British Journal of Cancer*, *120*(5), 499–511.

Wu, F., Zhou, Y., Wang, Z., Xie, M., Shi, Z., Tang, Z., Li, X., Li, X., Lei, C., Li, Y., Ni, Z., Hu, Y., Liu, X., Yin, W., Cheng, L., Ye, F., Peng, J., Huang, L., Tian, J., … Ran, P. (2020a). Clinical characteristics of COVID-19 infection in chronic obstructive pulmonary disease: A multicenter, retrospective, observational study. *Journal of Thoracic Disease*, *12*(5), 1811–1823.

Wu, N., Wu, Z., Sun, J., Yan, M., Wang, B., Du, X., & Liu, Y. (2020b). Small airway remodeling in diabetic and smoking chronic obstructive pulmonary disease patients. *Aging*, *12*(9), 7927–7944.

Xi, S., Inchauste, S., Guo, H., Shan, J., Xiao, Z., Xu, H., Miettenen, M., Zhang, M. R., Hong, J. A., Raiji, M. T., Altorki, N. K., Casson, A. G., Beer, D. G., Robles, A. I., Bowman, E. D., Harris, C. C., Steinberg, S. M., & Schrump, D. S. (2015). Cigarette smoke mediates epigenetic repression of MIR-217 during esophageal adenocarcinogenesis. *Oncogene*, *34*(44), 5548–5559.

Xu, Z., Maiti, D., Kisiel, W., & Duh, E. J. (2006). Tissue factor pathway inhibitor-2 is upregulated by vascular endothelial growth factor and suppresses growth factor-induced proliferation of endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *26*(12), 2819–2825.

Xu, Y., Wu, D., Jiang, Z., Zhang, Y., Wang, S., Ma, Z., Hui, B., Wang, J., Qian, W., Ge, Z., & Sun, L. (2018). MiR-616-3p modulates cell proliferation and migration through targeting tissue factor pathway inhibitor 2 in preeclampsia. *Cell Proliferation*, *51*(5), e12490.

Yamasaki, K., Schauber, J., Coda, A., Lin, H., Dorschner, R. A., Schechter, N. M., Bonnart, C., Descargues, P., Hovnanian, A., & Gallo, R. L. (2006). Kallikrein-mediated proteolysis regulates the antimicrobial effects of cathelicidins in skin. *The FASEB*

Journal, *20*(12), 2068–2080.

Yamasaki, K., Di Nardo, A., Bardan, A., Murakami, M., Ohtake, T., Coda, A., Dorschner, R. A., Bonnart, C., Descargues, P., Hovnanian, A., Morhenn, V. B., & Gallo, R. L. (2007). Increased serine protease activity and cathelicidin promotes skin inflammation in rosacea. *Nature Medicine*, *13*(8), 975-980.

Yanamandra, N., Kondraganti, S., Gondi, C. S., Gujrati, M., Olivero, W. C., Dinh, D. H., & Rao, J. S. (2005). Recombinant adeno-associated virus (rAAV) expressing TFPI-2 inhibits invasion, angiogenesis and tumor growth in a human glioblastoma cell line. *International Journal of Cancer*, *115*(6), 998–1005.

Yang, L., Cui, M., Zhang, L., & Song, L. (2017). FOXM1 facilitates gastric cancer cell migration and invasion by inducing Cathepsin D. *Oncotarget*, 8(40), 68180–68190

Yiu, W. H., Wong, D. W. L., Chan, L. Y. Y., Leung, J. C. K., Chan, K. W., Lan, H. Y., Lai, K. N., & Tang, S. C. W. (2014). Tissue kallikrein mediates pro-inflammatory pathways and activation of protease-activated receptor-4 in proximal tubular epithelial cells. *PLoS One*, *9*(2), e88894.

Yoon, H., Blaber, S. I., Evans, D. M., Trim, J., Juliano, M. A., Scarisbrick, I. A., & Blaber, M. (2008). Activation profiles of human kallikrein-related peptidases by proteases of the thrombostasis axis. *Protein Science*, *17*(11), 1998–2007.

Yoon, H., Blaber, S. I., Debela, M., Goettig, P., Scarisbrick, I. A., & Blaber, M. (2009). A completed KLK activome profile: Investigation of activation profiles of KLK9, 10, and 15. *Biological Chemistry*, *390*(4), 373–377.

Yousef, G., & Diamandis, E. P. (1999). The new kallikrein-like gene, KLK-L2. Molecular characterization, mapping, tissue expression, and hormonal regulation. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(53), 37511–37516.

Yousef, G., & Diamandis, E. P. (2001). The New Human Tissue Kallikrein Gene Family: Structure, Function, and Association to Disease. *Endocrine Reviews*, *22*(2), 184–204.

Yousef, G., Scorilas, A., Kyriakopoulou, L. G., Rendl, L., Diamandis, M., Ponzone, R., Biglia, N., Giai, M., Roagna, R., Sismondi, P., & Diamandis, E. P. (2002a). Human kallikrein gene 5 (KLK5) expression by quantitative PCR: An independent indicator of poor prognosis in breast cancer. *Clinical Chemistry*, *48*(8), 1241-1250.

Yousef, G., Scorilas, A., Chang, A., Rendl, L., Diamandis, M., Jung, K., & Diamandis, E. P. (2002b). Down-regulation of the human kallikrein gene 5 (KLK5) in prostate cancer tissues. *Prostate*, *51*(2), 126-132.

Yousef, G., Obiezu, C. V., Jung, K., Stephan, C., Scorilas, A., & Diamandis, E. P. (2002c). Differential expression of kallikrein gene 5 in cancerous and normal testicular tissues. *Urology*, *60*(4), 714-718.

Yousef, G., Polymeris, M. E., Grass, L., Soosaipillai, A., Chan, P. C., Scorilas, A., Borgoño, C., Harbeck, N., Schmalfeldt, B., Dorn, J., Schmitt, M., & Diamandis, E. P. (2003). Human kallikrein 5: A potential novel serum biomarker for breast and ovarian cancer. *Cancer Research*, *63*(14), 3958-3965.

Yousef, G., White, N. M. A., Kurlender, L., Michael, I., Memari, N., Robb, J. D., Katsaros, D., Stephan, C., Jung, K., & Diamandis, E. P. (2004a). The kallikrein gene 5 splice variant 2 is a new biomarker for breast and ovarian cancer. *Tumor Biology*, *25*(5–6),

221–227.

Yousef, G., Yacoub, G. M., Polymeris, M. E., Popalis, C., Soosaipillai, A., & Diamandis, E. P. (2004b). Kallikrein gene downregulation in breast cancer. *British Journal of Cancer*, *90*(1), 167-172.

Yu, Y., Prassas, I., & Diamandis, E. P. (2014). Putative kallikrein substrates and their (patho) biological functions. *Biological Chemistry*, *395*(9), 931–943.

Yu, Q., Yang, D., Chen, X., & Chen, Q. (2019). CD147 increases mucus secretion induced by cigarette smoke in COPD. *BMC Pulmonary Medicine*, *19*(1), 29.

Zarghooni, M., Soosaipillai, A., Grass, L., Scorilas, A., Mirazimi, N., & Diamandis, E. P. (2002). Decreased concentration of human kallikrein 6 in brain extracts of Alzheimer's disease patients. *Clinical Biochemistry*, *35*(3), 225–231.

Zhai, L.-L., Wu, Y., Huang, D.-W., & Tang, Z.-G. (2015). Increased matrix metalloproteinase-2 expression and reduced tissue factor pathway inhibitor-2 expression correlate with angiogenesis and early postoperative recurrence of pancreatic carcinoma. *American Journal of Translational Research*, *7*(11), 2412–2422.

Zhang, X., Chen, C. T., Bhargava, M., & Torzilli, P. A. (2012). A Comparative Study of Fibronectin Cleavage by MMP-1, -3, -13, and -14. *Cartilage*, *3*(3), 267–277.

Zheng, L., Huang, J., Su, Y., Wang, F., Kong, H., & Xin, H. (2020). Overexpression of tissue factor pathway inhibitor 2 attenuates trophoblast proliferation and invasion in preeclampsia. *Human Cell*, *33*(3), 512–520.

Zhu, Y., Underwood, J., Macmillan, D., Shariff, L., O'Shaughnessy, R., Harper, J. I., Pickard, C., Friedmann, P. S., Healy, E., & Di, W. L. (2017). Persistent kallikrein 5 activation induces atopic dermatitis-like skin architecture independent of PAR2 activity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *140*(5), 1310-1322.

Zigrino, P., Steiger, J., Fox, J. W., Löffek, S., Schild, A., Nischt, R., & Mauch, C. (2007). Role of ADAM-9 disintegrin-cysteine-rich domains in human keratinocyte migration. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(42), 30785–30793.

Zou, Y., Li, S., Zou, W., Hu, G., Zhou, Y., Peng, G., He, F., Li, B., & Ran, P. (2014). Upregulation of gelatinases and epithelial-mesenchymal transition in small airway remodeling associated with chronic exposure to wood smoke. *PLoS One*, *9*(5), 1–11.

Zou, X., Zhang, X. X., Liu, X. Y., Li, R., Wang, M., Wu, W. J., Sui, Y., & Zhao, H. L. (2015). Renal kallikrein activation and renoprotection after dual blockade of renin-angiotensin system in diet-induced diabetic nephropathy. *Journal of Diabetes Research*, *2015*, 310645.

Zou, H., Zhu, N., & Li, S. (2020). The emerging role of dipeptidyl-peptidase-4 as a therapeutic target in lung disease. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 24(2), 147–153.

Zubor, P., Hatok, J., Moricova, P., Kapustova, I., Kajo, K., Mendelova, A., Sivonova, M. K., & Danko, J. (2015). Gene expression profiling of histologically normal breast tissue in females with human epidermal growth factor receptor 2positive breast cancer. *Molecular Medicine Reports*, *11*(2), 1421-1427.

Woodys LENGA MA BONDA

Rôle de la Kallicréine 5 dans le remodelage de l'épithélium bronchique associé à la Bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO)

Résumé

La BronchoPneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) est souvent causée par le tabagisme. L'inflammation, le stress oxydant et la balance protéases/inhibiteurs de protéases sont des facteurs associés au remodelage et à la réparation de l'épithélium bronchique. Nous avons montré que la kallicréine 5 (KLK5) agissait différemment sur des cellules déjà engagées dans la Transition Epithélio Mésenchymateuse ou sur celles ayant des caractéristiques épithéliales. La KLK5 réduit alors l'adhérence des cellules à la matrice, effet dû au clivage des E-cadhérine, β-caténine, fibronectine, et intégrines α5β1 et favorisant la migration cellulaire. Cet effet est neutralisé par l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire, le TFPI-2. En revanche, l'invalidation de la KLK5 endogène favorise la réparation de la brèche épithéliale alors que la KLK5 exogène la retarde. Ces données suggèrent que la KLK5 joue un rôle important dans les processus de remodelage et de réparation associés à la BPCO

Mots-clés : kallicréine 5, Epithélium pulmonaire, BPCO, Remodelage tissulaire, Protéase, TFPI-2

Abstract

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is mainly caused by cigarette smoking. Inflammation, oxidative stress, and protease/protease inhibitor imbalance are factors associated with extracellular matrix remodeling and bronchial epithelial repair observed in COPD. We demonstrated that exogenous kallikrein-related peptidase 5 (KLK5) acts differently on cells already engaged in epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) or on cells harboring epithelial characteristics. By inducing EMT, KLK5 reduced cell adherence to matrix. This effect, neutralized by the tissue factor pathway inhibitor 2, was due to a direct proteolytic activity of KLK5 on E-cadherin, β-catenin, fibronectin, and α5β1 integrins. KLK5 thus promotes the migration of cells. In contrast, knockdown of endogenous KLK5, accelerated wound healing repair after injury, and exogenous KLK5 delayed the closure repair. These data suggest KLK5 could play a critical role in airway remodeling and repairing events associated with COPD.

Keywords : kallikrein-related peptidase 5, Lung epithelium, COPD, Tissue remodeling, Protease, TFPI-2