

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
INRS-Institut Armand-Frappier

DÉTERMINATION DU PROFIL D'EXPRESSION DES ISOFORMES DE LA GALECTINE-8 DANS DES LIGNÉES CELLULAIRES DE CANCER DU SEIN

Par
Cherylane Dubé Delarosbil, B. Sc.

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M. Sc.) en sciences expérimentales de la santé
Novembre 2018

Jury d'évaluation

Président du jury et
examinatrice interne

Dr. Isabelle Plante
INRS-Institut Armand Frappier

Examineur externe

Dr. Sachiko Sato
Département de microbiologie-infectiologie
et immunologie
Université de Laval

Directeur de recherche

Dr. Yves St-Pierre
INRS-Institut Armand Frappier

REMERCIEMENTS

Remerciement particulier à mon directeur de recherche, le Dr Yves St-Pierre, pour son temps et sa patience et surtout pour ces schémas rassurant concernant les creux de vagues associés à la recherche scientifique. Un bon directeur de recherche est essentiel, mais sans une assistante de recherche à la hauteur de Marlène Fortier, il en aurait été encore plus difficile, car beaucoup trop de questions seraient restées en suspens. Merci à tous mes collègues de laboratoire présents et passés; particulièrement Pascal Dupont et Lorenna Oliveira, mais aussi Clara Lafortune, Marilyne Labrie, Nathalie Bibens-Laulan, Philippine Granger et France Caza ainsi que Sylvain Pimparé pour sa grande efficacité concernant les détails non scientifiques d'une vie académique. Finalement, mille fois merci à Pier-Luc Dubé d'avoir été présent, de m'avoir écouté et encouragé lorsque la motivation était minime.

Il est important de mentionner que l'appui financier de la Fondation Armand Frappier, du CRSNG ainsi que du RQRM fut précieux.

Cherylane

RÉSUMÉ

En utilisant des biopsies provenant de femmes atteintes de cancer du sein de sous-type triple-négatif, une étude menée par notre laboratoire a permis de constater que la localisation nucléaire de la galectine-8 est associée à un taux de survie sur 5 ans de 100% alors que l'absence de cette galectine dans le noyau corrèle avec un taux de survie de 70%. Étant donné que la galectine-8 est exprimée sous deux isoformes, nous avons soulevé l'hypothèse que l'expression intranucléaire de la galectine-8 pourrait être spécifique à un isoforme. Afin de tester cette hypothèse, nous avons étudié le profil d'expression des deux isoformes de la galectine-8 dans des lignées cellulaires de cancer du sein présentant des sous-types moléculaires variables : MCF7, MDA-MB-468, MDA-MB-231, SKBR3, Hs578t et T47D. Nous avons porté une attention particulière à la distribution de ces isoformes dans le cytosol et le noyau. Les résultats d'expressions transcriptomiques (par RT-PCR) et protéiques (par immunobuvardage de type western et imagerie confocale) ont révélé que les cellules du cancer du sein présentent un profil d'expression hétérogène, tant au niveau de l'ARNm qu'au niveau de la protéine. Les profils d'expression au niveau des ARNm et de la protéine diffèrent également pour une même lignée cellulaire. Les deux isoformes se retrouvent autant dans le noyau que dans le cytosol. De plus, la densité cellulaire ainsi que la présence de galectine-7 dans le milieu de culture exercent une modulation de l'expression des isoformes de *Igals8* qui favorise une augmentation de l'isoforme moyen. Dans l'ensemble, ces résultats démontrent que la localisation intranucléaire de la galectine-8 ne semble pas être causée par des facteurs intrinsèques de la protéine. Des études sur les mécanismes de transport intranucléaire de la galectine-8 seront nécessaires pour mieux comprendre sa distribution intracellulaire et pour déterminer un lien de cause à effet avec le phénotype observé chez les patientes atteintes du cancer du sein.

Mots-clés : Galectine; galectine-8; isoformes; galectinome; cancer du sein; triple-négatif; expression; culture cellulaire; transcriptomique; immunobuvardage.

ABSTRACT

Using biopsies from women suffering from the triple-negative subtype of breast cancer, our team has recently found that nuclear localization of galectin-8 is associated with a 5-year survival rate of 100% while the absence of this galectin in the nucleus correlates with a survival rate of 70%. Since galectin-8 is expressed in two isoforms, it has been hypothesized that intranuclear expression of galectin-8 may be isoform-specific. In order to test this hypothesis, we studied the expression profile of galectin-8 isoforms in human breast cancer cell lines with variable molecular subtypes: MCF7, MDA-MB468, MDA-MB-231, SKBR3, Hs578t and T47D. A particular attention was paid to the distribution of these isoforms in the cytosol and the nucleus. Analysis of the transcriptomic (by RT-PCR) and protein expression (by western-type immunoblotting and confocal imaging) revealed that breast cancer cells exhibit a heterogeneous expression profile, both at the mRNA and protein levels. Moreover, the level of a given galectin-8 isoform did not always correlate with its mRNA level. We also found that both galectin-8 isoforms are found in the nucleus and the cytosol. In addition, the cell density as well as the presence of galectin-7 in the culture medium increased the expression of the smallest isoforms of *Igals8*. Overall, these results revealed that the nuclear/cytosolic ratio of galectin-8 in breast cancer cells is not dependent on the repertoire of isoforms. Further studies on the mechanisms regulating intranuclear transport of galectin-8 will be needed to better understand its preferential distribution in the nucleus in certain group of patients with breast cancer.

Key Words: Galectin; galectin-8; isoforms; galectinome; breast cancer; triple-negative; expression; cell culture; transcriptomics; western blot.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	II
RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	IV
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES ANNEXES	IX
LISTE DES ABRÉVIATIONS	X
CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	1
1.1 LES GALECTINES	1
1.1.1 <i>La découverte des lectines.....</i>	<i>1</i>
1.1.2 <i>La découverte des galectines.....</i>	<i>1</i>
1.1.3 <i>Les sous-classes de la famille des galectines</i>	<i>2</i>
1.1.4 <i>Mécanismes moléculaires régulant l'expression des galectines.....</i>	<i>4</i>
1.1.5 <i>Les galectines dans le cancer.....</i>	<i>7</i>
1.2 LA GALECTINE-8.....	8
1.2.1 <i>La découverte de la galectine-8.....</i>	<i>8</i>
1.2.2 <i>Structure et isoformes</i>	<i>9</i>
1.2.2.1 <i>Structure génomique de Igals8.....</i>	<i>9</i>
1.2.2.2 <i>Structure protéique de la galectine-8.....</i>	<i>11</i>
1.2.3 <i>Fonctions physiologiques et ligands</i>	<i>14</i>
1.2.3.1 <i>Effets sur le développement des leucocytes</i>	<i>15</i>
1.2.3.2 <i>Activation des cellules endothéliales.....</i>	<i>17</i>
1.2.3.3 <i>Adhésion cellulaire</i>	<i>18</i>
1.2.3.4 <i>Autophagie</i>	<i>21</i>
1.2.3.5 <i>Autres ligands et fonctions métaboliques</i>	<i>24</i>
1.2.4 <i>Fonctions pathologiques et ligands</i>	<i>26</i>
1.2.4.1 <i>Auto-immunité</i>	<i>26</i>
1.2.4.2 <i>Cancer.....</i>	<i>29</i>
1.3 LE CANCER DU SEIN ET SES SOUS-TYPES.....	33
1.3.1 <i>Les sous types moléculaires.....</i>	<i>33</i>
1.3.1.1 <i>Luminal A.....</i>	<i>33</i>
1.3.1.2 <i>Luminal B.....</i>	<i>33</i>
1.3.1.3 <i>HER-2+.....</i>	<i>34</i>
1.3.1.4 <i>Triple-négatif.....</i>	<i>34</i>
1.3.2 <i>La gal-8 et le cancer du sein</i>	<i>34</i>
CHAPITRE 2 : HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS	36
2.1 BUT DE L'ÉTUDE.....	36
2.2 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS	36
CHAPITRE 3 : MATÉRIELS ET MÉTHODES	37
3.1 LIGNÉES CELLULAIRES ET RÉACTIFS	37
3.2 ISOLATION DE L'ARN, TRANSCRIPTION INVERSE ET RÉACTION DE POLYMÉRASE EN CHAÎNE ET RÉACTIFS (RT-PCR).	37
3.3 SÉQUENÇAGE	38
3.4 IMAGERIE CONFOCALE ET RÉACTIFS	38

3.5	IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN ET RÉACTIFS	38
3.6	ANALYSES STATISTIQUES.....	40
CHAPITRE 4 : RÉSULTATS.....		41
4.1	EXPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE DE LGALS8 DANS DES LIGNÉES CELLULAIRES DE CANCER DU SEIN.	41
4.2	EXPRESSION PROTÉIQUE DE LA GAL-8 DANS DES LIGNÉES CELLULAIRES DE CANCER DU SEIN.....	43
4.3	MODULATION DE L'EXPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE DE LGALS8 DANS DES LIGNÉES CELLULAIRES DE CANCER DU SEIN EN FONCTION DE LA DENSITÉ CELLULAIRE.....	47
4.4	<i>Modulation de la densité cellulaire et de l'expression transcriptionnelle de lgals8 dans la lignée cellulaire de cancer du sein MDA-MB-231 en fonction de la concentration de gal-7RH.....</i>	<i>50</i>
4.5	MODULATION DE L'EXPRESSION PROTÉIQUE DE LA GAL-8 EN FONCTION DE LA DENSITÉ CELLULAIRE CHEZ LA LIGNÉE CELLULAIRE MDA-MB-231.....	52
CHAPITRE 5 : DISCUSSION ET CONCLUSION		53
5.1	SOMMAIRE DES RÉSULTATS	53
5.2	IDENTIFICATION DE DEUX ISOFORMES DE GAL-8 AU NIVEAU TRANSCRIPTIONNEL.....	53
5.3	IDENTIFICATION DE DEUX ISOFORMES DE LA GAL-8 AU NIVEAU PROTÉIQUE	55
5.4	VARIABILITÉ DU PROFIL D'EXPRESSION DES ISOFORMES EN FONCTION DE LA LIGNÉE CELLULAIRE	58
5.5	LA NATURE DE L'ISOFORME NE DICTE PAS SA LOCALISATION INTRACELLULAIRE	59
5.6	MODULATION DU PROFIL D'EXPRESSION DE LA GAL-8.....	60
5.7	CONCLUSION GÉNÉRALE	64
RÉFÉRENCES		65
ANNEXES.....		I

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 : Distribution des galectines chez les mammifères.....	2
Tableau 1.2 : Degré d'expression transcriptomique de <i>Igals8</i> en fonction du tissu.....	9
Tableau 4.1 : Descriptions des lignées cellulaires de cancer du sein analysées.....	41

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : La famille des galectines.....	3
Figure 1.2: Détails du CRD de la gal-3 à titre d'exemple des sous-sections A à E des galectines.....	4
Figure 1.3 : Structure de <i>Igals8</i>	10
Figure 1.4 : Représentation schématique des deux isoformes transcriptionnels confirmés résultant de l'épissage alternatif de <i>Igals8</i>	11
Figure 1.5 : Les deux isoformes protéique de la galectine-8 humaine.....	12
Figure 1.6 : Superposition des domaines N- et C-terminaux de la galectine-8.....	14
Figure 1.7 : Les différents modes d'action de la galectine-8.....	21
Figure 1.8 : Partenaires d'interaction autophagiques.....	23
Figure 4.1 : Expression transcriptionnelle des isoformes de <i>Igals8</i> dans six lignées cellulaires de cancer du sein.....	42
Figure 4.2.1 : Expression protéique des isoformes de la gal-8 dans six lignées cellulaires de cancer du sein.....	45
Figure 4.2.2 : Expression protéique de la gal-8 dans quatre lignées cellulaires de cancer du sein.....	46
Figure 4.3.1.1 : Modulation de l'expression transcriptionnelle des isoformes de <i>Igals8</i> en fonction de la densité cellulaire pour la lignée cellulaire MCF7.....	48
Figure 4.3.1.2 : Modulation de l'expression transcriptionnelle des isoformes de <i>Igals8</i> en fonction de la densité cellulaire pour la lignée cellulaire MDA-MB-468.....	48
Figure 4.3.1.3 : Modulation de l'expression transcriptionnelle des isoformes de <i>Igals8</i> en fonction de la densité cellulaire pour la lignée cellulaire MDA-MB-231.....	49
Figure 4.3.1.4 : Modulation de l'expression transcriptionnelle des isoformes de <i>Igals8</i> en fonction de la densité cellulaire pour la lignée cellulaire T47D.....	50
Figure 4.4.1 : Modulation de la densité cellulaire de la lignée cellulaire MDA-MB-231 en fonction de la concentration de gal-7RH.....	51
Figure 4.4.2 : Modulation de l'expression transcriptionnelle des isoformes de <i>Igals8</i> dans la lignée cellulaire MDA-MB-231 en fonction de la concentration de gal-7RH.....	51
Figure 4.5.1. : Modulation de l'expression protéique de la gal-8 en fonction de la densité cellulaire pour la lignée cellulaire MDA-MB-231.....	52

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Expression de *Igals8* telle que présentée sur la plateforme *Expression Atlas* (www.ebi.ac.uk/gxa/home) et basée sur les résultats de Barretina et al. (2012).....i

Annexe 2 : Expression de *Igals8* telle qu'indiquée sur la plateforme *cBioPortal* (cbioportal.org) et basé sur les résultats de Curtis et al. (2012) et Pereira et al. (2016).....ii

Annexe 3 : Expression transcriptionnelle et protéique de la gal-8 telle qu'indiquée sur la plateforme *The Human Protein atlas* (proteinatlas.org).....iii

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ARNm	Acide ribonucléique messager
BSA	Albumine de sérum bovin (<i>Bovine serum albumin</i>)
C-CRD	Domaine C-terminal du domaine de reconnaissance des glucides
Cdk-cyc	Complexes kinases dépendantes des cyclines-cyclines
CRD	Domaine de reconnaissance aux glucides (<i>Carbohydrate recognition domain</i>)
D2R	Récepteur de la dopamine D2 (<i>Dopamine D2 receptor</i>)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Éthylène diamine tétra-acétique
EGFR	Récepteur du facteur de croissance épidermique (<i>Epidermal growth factor receptor</i>)
ER	Récepteur de l'estrogène (<i>Estrogen receptor</i>)
ESR1	Récepteur 1 de l'estrogène (<i>Estrogen receptor 1</i>)
FAK	Kinase d'adhésion focale (<i>Focal adhesion kinase</i>)
FGF-2	Facteur 2 de croissance des fibroblastes (<i>Fibroblast growth factor 2</i>)
FWv	Facteur von Willebrand
Gal	Galectine
Gals	Galectines
Gal-7RH	Galectine-7 recombinante humaine
GALBI	Région de liaison de la galectine-8 (<i>Galectin-8 binding region</i>)
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase humaine
GAS	Streptococcus du groupe A
HER-2	Récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (<i>Human epidermal receptor-2</i>)
HSP	Protéine de choc thermique (<i>Heat shock protein</i>)
ICAM-1	Molécule 1 d'adhésion intercellulaire (<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>)
IE	Séquence séparant deux séquences insertionnelles
IGEPAL	Octylphenoxy poly(ethyleneoxy)ethanol
IFN- γ	Interferon gamma
IL-2	Interleukine-2
IS1	Séquence insertionnelle 1 (<i>Insertional sequence-1</i>)
IS2	Séquence insertionnelle 1 (<i>Insertional sequence-2</i>)
JNK	Kinases terminales c-jun-N

<i>Lgals8</i>	Gène de la galectine-8
MG-132	Carbobenzoxy-Leu-Leu-leucinal
miARN	Micro-ARN
MMP-9	Metalloprotéinase de la matrice-9
N-CRD	Domaine N-terminal du domaine de reconnaissance aux glucides
nt	Nucléotide
ORF	<i>Open reading frame</i>
PARP	<i>Poly-ADP-ribose-polymerase-1</i>
pb	Paire de bases
PCTA-1	<i>Prostate carcinoma tumor antigen-1</i>
PKB	Protéine kinase B (<i>Protein kinase B</i>)
PKC	Protéine kinase C (<i>Protein kinase C</i>)
Po66-CBP	<i>Po66 carbohydrate-binding protein</i>
PR	Récepteur de la progestérone (<i>Progesteron receptor</i>)
PS	Phosphatidylsérine
PVDF	<i>Polyvinyliden difluoride</i>
RANKL	Récepteur activateur du ligand NF- κ B (<i>Receptor Activator of NF-B ligand</i>)
RT-PCR	Transcription inverse suivie d'une réaction de polymérase en chaîne (<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TALDO-1	Transaldolase-1
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
TGF β	Facteur de croissance transformant β (<i>Transforming growth factor beta</i>)
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale α (<i>Tumor necrosis factor alpha</i>)
Treg	Cellules T régulatrices
Ub	Ubiquitine
UTR	Région non traduite (<i>Untranslated region</i>)

CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 Les galectines

1.1.1 La découverte des lectines

Les lectines sont un groupe de protéines ayant une forte affinité de liaison réversible avec les glycoconjugués : c'est-à-dire des molécules constituées d'un groupement glucidique associé de manière covalente à un groupement non glucidique (Mason et al., 2015; Santos et al., 2014). Les gènes menant à l'expression des lectines sont présents dans tout le règne vivant et les protéines encodées par ces gènes sont classées en 48 familles en fonction de leur structure tridimensionnelle (Fujimoto et al., 2014; Hébert, 2001; Leonidas et al., 1998). C'est en 1888 que la première lectine a été découverte par un doctorant estonien ayant observé que des extraits de graine de ricine pouvaient agglutiner des globules rouges, et ce, comme l'ont découvert d'autres chercheurs en 1954, de façon sélective pour un groupe sanguin en particulier (Boyd et al., 1954). Elles y parviennent en se liant aux chaînes glucidiques sur les membranes des érythrocytes (Wada et al., 2004). Cette sélectivité est à l'origine du mot « Lectine », dérivé du mot latin signifiant « sélectionner » (Boyd et al., 1954). La présence de site de liaison aux sucres sur les lectines est mise en évidence par l'inhibition du pouvoir agglutinant de celles-ci en présence de certains sucres, comme le lactose (Rudiger et al., 1993). Ces interactions avec les sucres, qui sont à la base d'innombrables processus cellulaires normaux ou pathologiques, sont possibles grâce à un domaine fonctionnel nommé Domaine de reconnaissance aux glucides (*carbohydrate recognition domain* ou CRD), lequel est formé par une structure moléculaire tridimensionnelle conservée à travers l'évolution (Drickamer et al., 1986). Parmi les 18 familles de lectines animales, les trois principalement étudiées sont celles des lectines de *type C* qui dépendent du calcium, des *Siglecs*, membres de la famille des immunoglobulines ainsi que des galectines (gals) sur lesquelles portera cette revue de littérature (Crocker et al., 2002; Drickamer, 1993; Hébert, 2001).

1.1.2 La découverte des galectines

Décrites pour la première fois en 1975 chez l'anguille, les gals forment une sous-famille de lectine reconnue pour leurs liaisons préférentielles avec les β -galactosides (Cummings et al., 2009). À ce jour, un total de 16 gals, nommées en fonction de l'ordre de leurs découvertes, ont été répertoriés chez les mammifères (Vladoiu et al., 2014). Ce sont les lectines les plus

abondamment exprimées chez tous les organismes (Cummins et al., 2009). L'humain exprime 12 gals de façon variable, soit les gals-1, -2, -3, -4, -7, -8, -9, -10, -12, -13, -14 et -16, dont la distribution est précisée dans le tableau 1.1. Les gals-5 et -6 sont exprimées seulement par les espèces murines et les gals-11 et -15 sont uniques aux espèces ruminantes (Sakthivel et al., 2015; Than et al., 2015; Wada et al., 2001). Leurs expressions par les cellules se fait de façon constitutive ou inductible et leurs profils varient en fonction du type de cellule, du stade de développement et de l'état physiopathologique (Advedissian et al., 2015; Liu et al., 2005; Rabinovich et al., 2009).

Galectine	Distribution
1 – 3 – 9	Épithélium et stroma cellulaire
2 – 4	Gastro-intestinale
7	Épithélium stratifié
8	Endothélium
10	Granulocyte
12	Adipocyte
13 – 14 – 16	Placenta

Tableau 1.1 : Distribution des galectines chez les mammifères. Adapté de Wada et coll., 2001 et de Than et coll., 2015.

1.1.3 Les sous-classes de la famille des galectines

Les gals sont généralement classées en fonction de l'organisation structurale du CRD. Il existe ainsi trois sous-familles : les « prototypes », les types « répétitions en tandem » et les « chimériques » (figure 1.1). Le CRD est une structure tertiaire conservée et constituée d'environ 130 acides aminés dont l'homologie inter-gal se situe entre 20 et 50% (Hirabayashi et al., 2002). Ces 130 acides aminés se replient en deux feuillets antiparallèles constitués de six brins énumérés S1 à S6 pour l'un des feuillets ainsi que de cinq brins énumérés F1 à F5 pour le second, formant conjointement une structure de type β -sandwich (Chan et al., 2018). Les brins S forment une surface concave sur laquelle les interactions avec les ligands s'effectuent. Cette surface est subdivisée en cinq sections, de A à E (figure 1.2). Les sections A, B et E sont les plus variables et qui offrent la spécificité de liaison aux gals, car elles accueillent des sucres ou des groupements fonctionnels. La section C contient les résidus conservés liant le β -galactose et la section D recueille les résidus de sucre formant le lactose, situé à côté du β -galactose (Chan et al., 2018). Chaque CRD possède une spécificité de liaison variable, le répertoire de processus physiologique normal associé à l'une ou l'autre des gals est donc très large : développement embryonnaire, réponse immunitaire et inflammatoire, migration cellulaire,

transduction de signal, etc. (Rabinovich et al., 2009; Yang et al., 2008). Les membres de la sous-famille des « prototypes » (gal-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14, -15 et -16) ont un seul CRD et peuvent former des homodimères liés de façon non covalente alors que les gals du type « répétitions en tandem » (gal-4, -6, -8, -9 et -12) ont deux CRD distinct et liés de façon covalente par un polypeptide de taille variable (Hirabayashi et al., 2002). Ces dernières peuvent adopter des arrangements plus complexes, principalement parce que la présence de deux CRD différents permet une liaison simultanée de deux ligands de nature distinctes. La sous-famille « chimériques » ne comprend qu'un seul membre, la gal-3, laquelle possède un seul domaine CRD associé à un polypeptide linéaire riche en prolines et en glycines qui lui permet de former des structures pentamériques (Advedissian et al., 2015; Ahmad et al., 2004). Ainsi, les structures tertiaires des gals sont similaires, mais leurs arrangements quaternaires diffèrent (Nagae et al., 2006). Les gals peuvent interagir avec leurs environnements de deux façons, via leurs CRD ou indépendamment de celui-ci (Yang et al., 2008).

Prototypes (galectines-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14, -15)



Chimérique (galectines-3)



Type « répétition en tandem » (galectines-4, -6, -8, -9, -12)



Figure 1.1 : La famille des galectines. Les galectines sont classées en trois sous-familles en fonction de leurs structures tridimensionnelles. Modifié de Yang et coll., 2008.

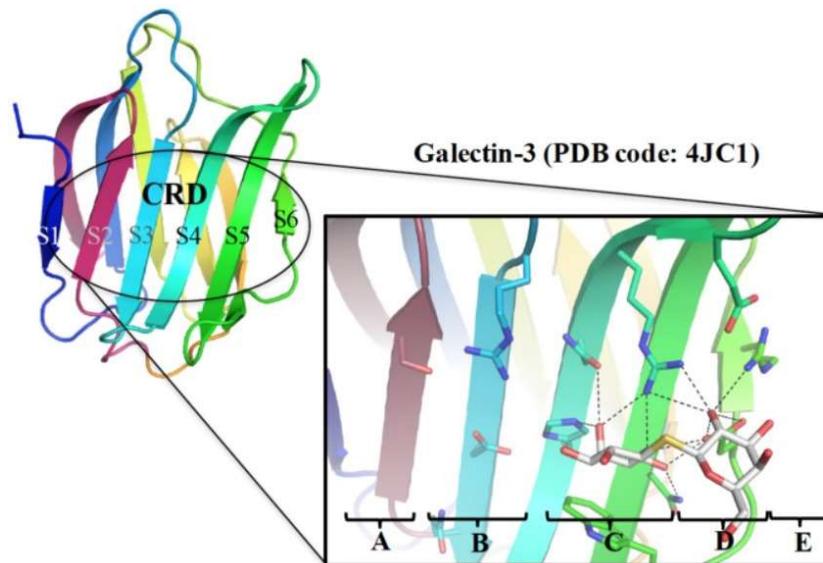


Figure 1.2 : Détails du CRD de la gal-3 à titre d'exemple des sous-sections A à E des galectines. Représentation schématique de la gal-3 en raison de l'absence de figure détaillée relative aux sous-sections de la gal-8. Le CRD contient six brins formés cinq sous-sections (A à E). Chan et coll., 2018.

1.1.4 Mécanismes moléculaires régulant l'expression des galectines

Au niveau cellulaire, les gals sont solubles et se retrouvent dans le cytoplasme, le noyau, différents organelles, dont la mitochondrie, et le milieu extracellulaire (Vasta, 2009; Vladiou et al., 2014). La façon dont elles sont relâchées dans le milieu extracellulaire reste encore peu connue puisqu'elles ne contiennent pas de séquence signal classique (Vasta, 2009). En effet, les gals ne suivent pas le parcours conventionnel des protéines partant du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi et ensuite vers la surface de la cellule dans des vésicules membranaires. Au contraire, la voie de sécrétion non conventionnelle empruntée par les gals serait une prévention contre des interactions intracellulaires inadéquates, par exemple, entre les gals et leurs ligands (Popa et al., 2018). Les études faites dans le but de démystifier cet export vers le milieu extracellulaire portent principalement sur les gals-1 et 3. À ce jour, il y a trois hypothèses à ce sujet. La première propose que l'oligomérisation des gals est nécessaire à la sécrétion. Cette hypothèse fait référence au fait que la gal-3 est sécrétée seulement si son domaine peptidique N-terminal est intact, domaine lui permettant de s'oligomériser (Gong et al., 1999; Popa et al., 2018). La seconde hypothèse stipule que cet export se fait via une translocation directe. Cette proposition est reliée au fait que la gal-1 semble suivre la même voie de sécrétion que le facteur-2 de croissance des fibroblastes (*fibroblast growth factor 2* ou FGF-2), une protéine très étudiée pour sa sécrétion non conventionnelle. Ces deux dernières protéines sont intériorisées dans des vésicules formées à partir de la membrane plasmique et

dont la topologie interne est équivalente à celle retrouvée dans le milieu extracellulaire. Cette intériorisation permet une translocation directe au travers de la membrane plasmique (Popa et al., 2018). Certaines recherches ont démontré que la gal-1, et moindrement la gal-3, s'accumulent sur la membrane intracellulaire avant d'être sécrétées et aussi que la gal-3 interagit avec les lipides de la membrane avant d'être transloquée spontanément (Lukyanov et al., 2005; Popa et al., 2018; Schafer et al., 2004). Finalement, la dernière hypothèse implique un export par sécrétion dans des vésicules extracellulaires, hypothèse impliquant les microvésicules souvent reliées à l'excrétion des gals. Toutefois, les endosomes et les lysosomes sont aussi inclus dans cette voie hypothétique. Des observations montrent qu'il y a formation de microvésicules intégrant les accumulations sous-membranaires de gal-1 avant l'exocytose (Hanke et al., 2013; Popa et al., 2018). De plus, l'export des gals ne serait pas dépendant de la présence de glucide (Popa et al., 2018). Ainsi, plusieurs détails manquent pour confirmer une hypothèse par rapport à une autre, mais il n'est pas exclu par la littérature que les gals utilisent plus d'une voie de sécrétion. Par exemple, selon certains auteurs la troisième hypothèse semble plus adaptée en situation de stress cellulaire que les autres (Popa et al., 2018).

Les connaissances concernant les mouvements intracellulaires des gals ont été obtenues principalement par des études portant sur la gal-3. Par exemple, cette gal chimérique réussit à se déplacer du cytoplasme vers le noyau via un signal reconnu par des importines pour l'import vers le noyau et l'exportine-1 pour l'export vers le cytoplasme (Haudek et al., 2010). Comme l'ont démontré Davidson et coll. (2006), qui ont aussi travaillé sur les déplacements intracellulaires de la gal-3, la distribution intracellulaire de la gal dépendrait minimalement de quatre facteurs, soit l'import nucléaire, l'export nucléaire, l'ancrage cytoplasmique ainsi que l'ancrage nucléaire (Davidson et al., 2006). De plus, une hypothèse soulevée par Carlsson et coll. (2007) suggère que le triage cellulaire, lors de l'internalisation de la gal-8 dans des vésicules de transport, est basé sur les correspondances entre les spécificités de liaison du CRD et les structures glucidiques disponibles. Cette forme de triage pourrait aussi être en jeu lors de l'endocytose ou de l'exocytose des gals vers différents types de cellules (Carlsson et al., 2007).

En ce qui concerne la régulation de la sécrétion des gals, les études faites avec les gal-3 et -9 montrent que plusieurs facteurs peuvent en influencer le processus : 1) les influx d'ions calciques (Lindstedt et al., 1993; Sato et al., 1993), 2) la présence d'un stress cellulaire (Dapat

et al., 2017; Merani et al., 2015), 3) la caspase-1 dont la présence pourrait être reliée aux facteurs de stress (Keller et al., 2008), 4) la présence de sérum en culture cellulaire (Sato et al., 1993; Zhu et al., 2001) et 5) la présence de phorbol 12-myristate 13-acétate, un activateur de la protéine kinase C (PKC) agissant comme stimulant cellulaire (Chabot et al., 2002; Madrigal-Matute et al., 2014). D'autres études indiquent que la présence des hormones 17- β -œstradiol, la progestérone et l'hormone chorionique humaine, pour la gal-3, ainsi que la présence de métalloprotéines pour la gal-9, augmentent la présence de ces deux lectines dans le compartiment extracellulaire (Ochieng et al., 1994; Yang et al., 2011; Yu et al., 2016).

Bien que les mécanismes utilisés par les gals pour se déplacer vers l'extérieur de la cellule restent inconnus, les fonctions qu'elles y exercent sont mieux comprises. De façon générale, les gals extracellulaires exercent leurs fonctions via leurs CRD alors qu'à l'intérieur de la cellule, les fonctions sont souvent CRD-indépendantes (Cummings et al., 2009). Au niveau extracellulaire, elles sont plutôt reconnues pour leurs capacités à former des treillis moléculaires via la réticulation des glycorécepteurs membranaires, formation qui nécessite l'oligomérisation des gals (Rabinovich et al., 2007). Ces treillis induisent le regroupement des récepteurs de surfaces cellulaires, augmentent leurs stabilités et diminuent leurs endocytoses, ce qui accentue la reconnaissance et la transduction des signaux cellulaires à la base de la différenciation ou de la survie cellulaire, entre autres (Brewer, 2001; Lajoie et al., 2009; Rabinovich et al., 2007). Par exemple, la gal-1 extracellulaire est fortement associée à l'apoptose des cellules T réactives lors de leurs maturations dans le thymus via la réticulation et une redistribution spatiale des glycoprotéines CD45 et CD3 et des glycoprotéines CD43 et CD7 (Pace et al., 1999). En ce qui concerne les mécanismes CRD-indépendants des gals extracellulaires, il a aussi été démontré que la gal-3 est endocytée par les macrophages à la suite d'une interaction n'impliquant pas son CRD, mais plutôt son extrémité peptidique N-terminal (Lepur et al., 2012). De plus, la gal-1 est aussi impliqué dans une voie de signalisation extracellulaire CRD-indépendant, celle de l'activation du pré-récepteur des cellules B lors de leurs maturations dans la moelle osseuse. Cette interaction se fait alors via une interaction hydrophobique et électrostatique (Elantak et al., 2012). Dans d'autres cas, le CRD est effectif dans le milieu intracellulaire pour y détecter et marquer la présence anormale de glucide extracellulaire et ainsi marquer une lésion membranaire (Montespan et al., 2017). De cette façon, les gal-3, -8 et -9 sont impliquées dans le marquage d'invasion bactérienne précédant l'autophagie (Montespan et al., 2017). De plus, les gals extracellulaires modulent aussi les interactions d'une cellule avec d'autres cellules, la

matrice extracellulaire ou bien un pathogène, toujours par la liaison des sucres situés sur les récepteurs glycoprotéiques membranaires (Rabinovich et al., 2007).

1.1.5 Les galectines dans le cancer

Les cellules cancéreuses expriment différentes gals qui peuvent avoir des fonctions analogues ou différentes (Liu et al., 2005). De façon générale, les gals sont surtout reconnues pour leurs capacités à induire une immunosuppression locale et/ou systémique, le développement de la résistance aux chimiothérapies ainsi que par rapport au développement des comportements invasifs par les cellules cancéreuses (Liu et al., 2005). Ce sont trois propriétés qui distinguent les cancers à plus haute fatalité des autres. Les gals ont ainsi un impact réel sur les pronostics associés aux cancers (Labrie et al., 2017). Par exemple, le cancer du pancréas est celui dont les valeurs de survie sur 5 ans sont les plus faibles, soit de moins de 10% (<http://www.cancer.org>). Les études révèlent des propriétés immunomodulatoires pour la gal-1 et sa présence corrèle avec une augmentation de la croissance cellulaire et du potentiel métastatique. La gal-3 mène vers une résistance à la chimiothérapie via, entre autres, son influence sur la voie de signalisation de la protéine kinase B (PKB) (Kobayashi et al., 2011). La gal-4 aurait un effet inverse en inhibant le potentiel métastatique par interférence dans la voie de signalisation Wnt/ β -caténine. Le cancer du poumon est le plus meurtrier en raison du plus grand nombre de victimes faites chaque année. Dans ce cancer, les gal-1 et 3 exercent des fonctions similaires à celles répertoriées dans le cancer du pancréas. Quant à la gal-4 et la gal-9, elles favorisent le développement de la maladie. Pour les formes de cancers du cerveau les plus agressives, soit le glioblastome multiforme et l'astrocytome anaplasique, les quelques études faites sur la question révèlent que les gal-1, -3 et -8 ont aussi un pouvoir pro-tumoral (Camby et al., 2001; Camby et al., 2005). L'augmentation de la progression tumorale par les gal-1, -3 est aussi vraie pour les cancers du sein triple négatif, de l'œsophage et de l'estomac. La gal-7 est également impliquée dans la progression tumorale, la favorisant pour le cancer du sein et de l'œsophage et en la diminuant dans le cas de l'estomac. Pour le cancer de l'ovaire séreux de haut grade, la gal-3 diminue la prolifération cellulaire et augmente la chimiorésistance cellulaire (Oishi et al., 2007).

1.2 La galectine-8

1.2.1 La découverte de la galectine-8

Les premières références à la gal-8 dans la littérature remontent au milieu des années 1990, lorsque Hadari et son équipe ont repéré un transcrite de 1,25 kb encore inconnu. Cette découverte est le résultat d'une liaison erronée entre un anticorps dirigé contre la protéine IRS-1 et le transcrite de la gal-8 se trouvant dans un répertoire d'ADN complémentaire de foie de rat (Hadari et al., 1995). La présence des deux CRD reliés via une région charnière peptidique a valu à cette nouvelle gal de 34 kDa, nommée galectine-8, d'être attribuée à la sous-classe des types « répétition en tandem », allant ainsi rejoindre les gals-4 et -6 déjà découvertes (Bidon-Wagner et al., 2002). L'année suivante, un transcrite partageant 83% de la séquence nucléotidique et 81% de la séquence d'acide aminé avec cette première forme de gal-8 a été découvert (Su et al., 1996). Cet homologue humain, nommé *Prostate Carcinoma Tumour Antigen-1* (PCTA-1), a été identifié via la technique de masquage d'épitopes de surface lors d'une recherche de biomarqueurs associés au cancer de la prostate (Su et al., 1996). Simultanément, lors d'une étude similaire ciblant le cancer du poumon, la protéine *Po66 Carbohydrate-Binding Protein* (Po66-CBP) a été reliée aux deux précédentes observations de gal-8 (Bidon et al., 2001). Ainsi, PCTA-1 et Po66-CBP sont maintenant des synonymes de gal-8. La gal-8, bien que présente dans l'ensemble du corps, est détectée dans les tissus prostatiques et pulmonaires seulement lorsqu'il y a développement d'un cancer (Bidon et al., 2001; Su et al., 1996). L'analyse plus approfondie de la gal-8 *in vitro* a mis à jour la complexité présente dans la régulation du gène de la gal-8 (*Igals8*). En effet, Bidon et son équipe ont repéré six isoformes d'acide ribonucléique messager (ARNm) dérivant tous d'un même gène par épissage alternatif (Bidon et al., 2001). Les connaissances concernant le degré d'expression transcriptionnelle de *Igals8* en fonction du type de tissu humain sont détaillées dans le tableau 1.2.

Forte	Moyenne	Faible
Cœur	Estomac	Cerveau
Moelle épinière	Lymphocytes sanguins périphériques	Colon
Ovaires	Glande thyroïde	Moelle osseuse
Foie	Poumons	Muscles squelettiques
Glandes surrénales	Prostate	Petit intestin
Ganglions lymphatiques	Reins	Thymus
Pancréas		
Placenta		
Rate		
Testicules		
Trachée		

Tableau 1.2 : Degré d'expression transcriptionnelle de *Igals8* en fonction du tissu. Adapté de Gopalkrishnan et coll., 2001.

1.2.2 Structure et isoformes

1.2.2.1 Structure génomique de *Igals8*.

Contrairement à l'épissage constitutif qui retire les introns et lie les exons dans l'ordre dicté sur le gène, l'épissage alternatif ne suit pas nécessairement cet ordre et certains exons sont ignorés afin de former des ARNm différents (Wang et al., 2015). Les signaux plus faibles à l'endroit des sites d'épissage, la longueur des exons et la présence de séquences fortement conservées proche des exons alternatifs orthologues influencent les exons qui seront présents après la maturation (Wang et al., 2015). Les ARNm de la gal-8 sont nommés Po66-CBP, Po66-CBP-*insertional sequence-1* (IS1), Po66-CBP-*insertional sequence-2* (IS2), Po66-CBP-IS1-IS2, Po66-CBP-IS1-IE-IS2 et PTCA-1 (Bidon-Wagner et al., 2002). Le « IE » de Po66-CBP-IS1-IE-IS2 étant une séquence séparant les deux séquences d'insertions (figure 1.3). Le gène de la gal-8 se situe sur la région chromosomique 1q42-43, une région du génome associée à une prédisposition familiale pour le cancer de la prostate (Gopalkrishnan et al., 2000). IS1 allonge la région charnière sans modifier le cadre de lecture (*open reading frame* ou ORF) alors que les insertions IS2 et IE contiennent un codon-stop dans leurs ORF ce qui réduit la taille des séquences traduites. Ainsi, les isoformes Po66-CBP-IS2, Po66-CBP-IS1-IS2 et Po66-CBP-IS1-IE-IS2 n'ont qu'un CRD. Il s'agit de la seule gal ayant des représentantes dans les familles des « prototypes » et des types « répétitions en tandem ». Toutefois, les transcrits de ces « prototypes » n'ont pas été isolés, mais déduits (Bidon-Wagner et al., 2002).

Lgals8 contient un total de 15 exons (figure 1.3) : les exons 1, 3, 4 à 9 et 13 à 15 sont présents dans tous les ARNm alors que les exons 2, 10, 11 et 12 ont une présence variable qui expliquent l'existence de plusieurs isoformes (Bidon-Wagner et al., 2002). Le 1^{er} CRD est codé par les exons 5, 6 et une partie du 7^e. La liaison peptidique est traduite en fonction de l'autre partie de l'exon 7 et des exons 8, 9, 10, 11, 12 alors que le 2^e CRD est codé par les exons 13, 14 et le début du 15^e. Un codon départ ATG est présent dans le 4^e exon et il y a trois codons arrêt dans le 11^e, le 12^e et le 15^e (figure 1.3). L'arrêt de la traduction à l'un ou l'autre de ces codons arrêt donne trois isoformes différents, par l'intégration des séquences IE (11^e), IS2 (12^e) ou l'absence de ces séquences (15^e) (Bidon-Wagner et al., 2002).

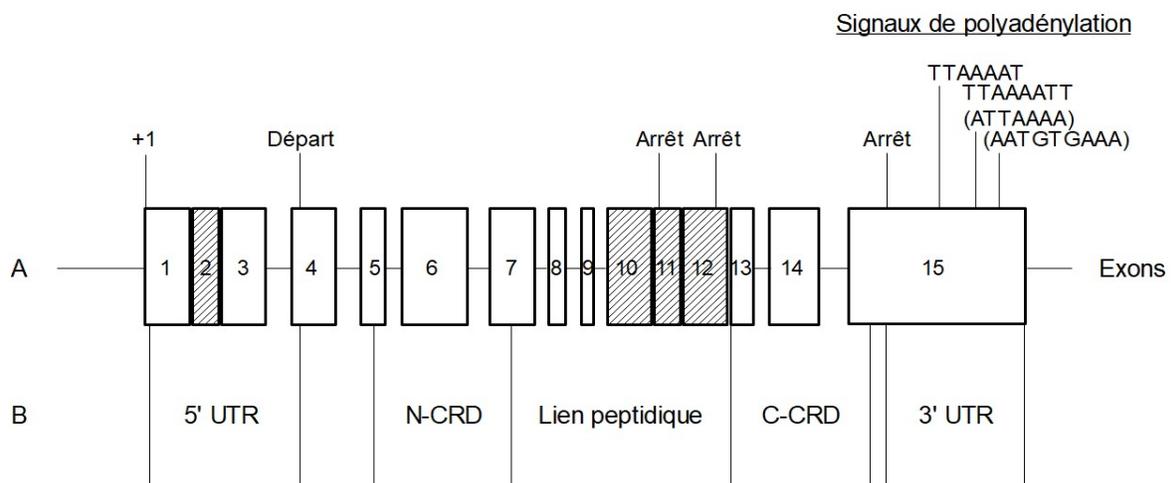


Figure 1.3 : Structure de *lgals8*. Modifié de Bidon-Wagner et coll., 2002. A) Les exons constitutifs sont en blanc. Les exons alternatifs sont rayés. Les signaux de polyadénylation entre parenthèses proviennent de sources différentes. B) Les domaines de la structure de la galectine-8 protéique et leurs relations avec les exons. (N-CRD : Domaine N-terminal du CRD, C-CRD : Domaine C-terminal du CRD).

L'exon présent à l'extrémité 5' dans la région non traduite (*untranslated region* ou UTR) mesure soit 828 ou 488 nucléotides (nt) (Gopalkrishnan et al., 2000). Cette zone 5' UTR est importante pour le contrôle de la traduction des ARNm (Genuth et al., 2018). Relativement à la zone 3' UTR, qui contient les éléments déterminants la stabilité et la localisation intracellulaire du transcrit, celle-ci est incluse dans le dernier exon mesurant 4352 paires de bases (pb) (Bidon-Wagner et al., 2002; Gopalkrishnan et al., 2000; Mignone et al., 2002). De ces 4352 pb, 147 pb sont codantes et précèdent un codon arrêt. La région restante non codante engendre trois longueurs différentes de queue polyA : 126, 1103 et 4217 pb. Autre précision, le transcrit ne dispose pas de la séquence consensus putative normale de polyadénylation (AAUAAA). Au lieu

de celle-ci se trouvent les séquences TTAAAAT, ATAAAA et AATGTAAA (figure 1.3) (Gopalkrishnan et al., 2000). Notons que la longueur des UTRs varie en fonction des sites de départ de transcription ou d'épissage et aussi en fonction de la polyadénylation (Mignone et al., 2002). De plus, *Igals8* dispose d'un seul site de début de transcription avec une boîte consensus TATA 43 pb en amont de ce site. Bien que plusieurs isoformes soient théoriquement possibles, seuls deux isoformes ont une séquence confirmée chez l'humain au niveau de l'ARNm et de la protéine. Ces isoformes confirmés sont nommés en fonction de la longueur de leurs régions charnières : isoforme moyen et isoforme long (figures 1.4 à 1.6). Selon Gopalkrishnan et coll. (2000) , la régulation du ratio des isoformes est difficilement explicable et semble de nature stochastique.

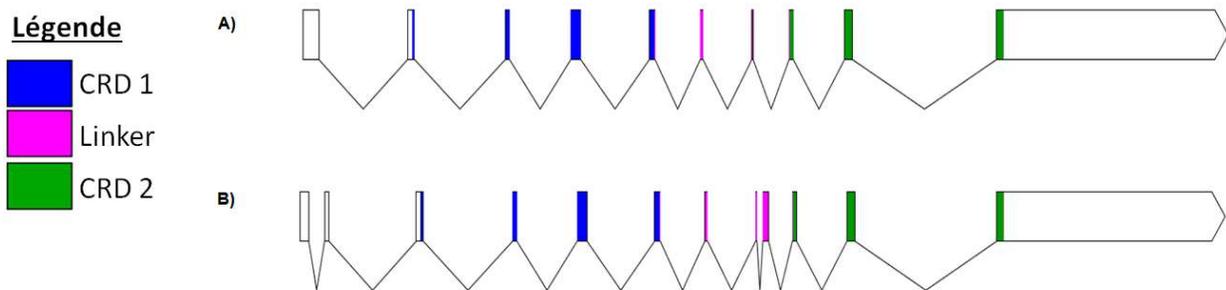


Figure 1.4 : Représentation schématique des deux isoformes transcriptionnels confirmés résultant de l'épissage alternatif de *Igals8*. Les boîtes constituent les exons et les traits représentent les introns. Les domaines retrouvés au niveau de la protéine sont différenciés selon la légende. ARNm de l'isoforme moyen (A) et long (B). Mise en forme sur WormWeb.org en fonction des séquences de *Igals8* NM_201543.2 (isoforme moyen) et NM_006499.4 (isoforme long) disponible sur NCBI nucléotide.

1.2.2.2 Structure protéique de la galectine-8.

Les interactions dépendantes du CRD sont modulées par les affinités de ces domaines N-terminal du CRD (N-CRD) et des domaines C-terminal du CRD (C-CRD) pour leurs ligands : les deux CRD ont une spécificité différente et la liaison de ceux-ci par le lien peptidique de la taille adéquate est nécessaire à l'activité de la protéine (Ideo et al., 2011; Troncoso et al., 2014). Les deux CRD partagent 38% de leurs séquences et ils ont un repliement tridimensionnel hautement similaire (figure 1.5 et 1.6) (Ideo et al., 2003; Kumar et al., 2013). Les CRD des gals sont formés de trois sites, le A, le B et le C. Le site A est le plus conservé des sites chez les gals et est formé de six acides aminés (histidine⁶⁵, asparagine⁶⁷, arginine⁶⁹, asparagine⁷⁹, tryptophane⁸⁶ et acide glutamique⁸⁹) qui sont associés à la reconnaissance du lactose (figure 1.6). Les trois prochains

paragraphes résumant respectivement les connaissances relatives au N-CRD, au lien peptidique et au C-CRD.

Concernant le site B du N-CRD de la gal-8 qui est présent dans la boucle S3-S4, il comporte trois acides aminés très importants pour la spécificité de la gal-8 : arginine⁴⁵, glutamine⁴⁷ et arginine⁵⁹ (figure 1.6). C'est la composition de ce site B, par rapport au site B du C-CRD, qui est à l'origine des différences tridimensionnelles des deux domaines de la gal-8 (Ideo et al., 2011). L'arginine⁵⁹ est responsable de la spécificité du N-CRD pour les groupements sulfates et d'acide sialique alors que glutamine⁴⁷ l'est seulement pour l'affinité avec les résidus sulfatés (Ideo et al., 2011). C'est donc principalement ce site du N-CRD qui dicte les fonctions de la gal-8 (Ideo et al., 2003). Par cette affinité unique à la gal-8, celle-ci lie préférentiellement l'immunoglobuline de type A sérique au niveau des glucides liés par O-glycosylation (Cederfur et al., 2008). Le site C du N-CRD est aussi composé de trois acides aminés : asparagine⁴⁹, glutamine⁵¹ et tyrosine¹⁴¹. Ce dernier résidu étant le plus important pour former des liaisons Van der Waals avec les fractions glucidiques plus longues, lorsque c'est le cas (Ideo et al., 2011).

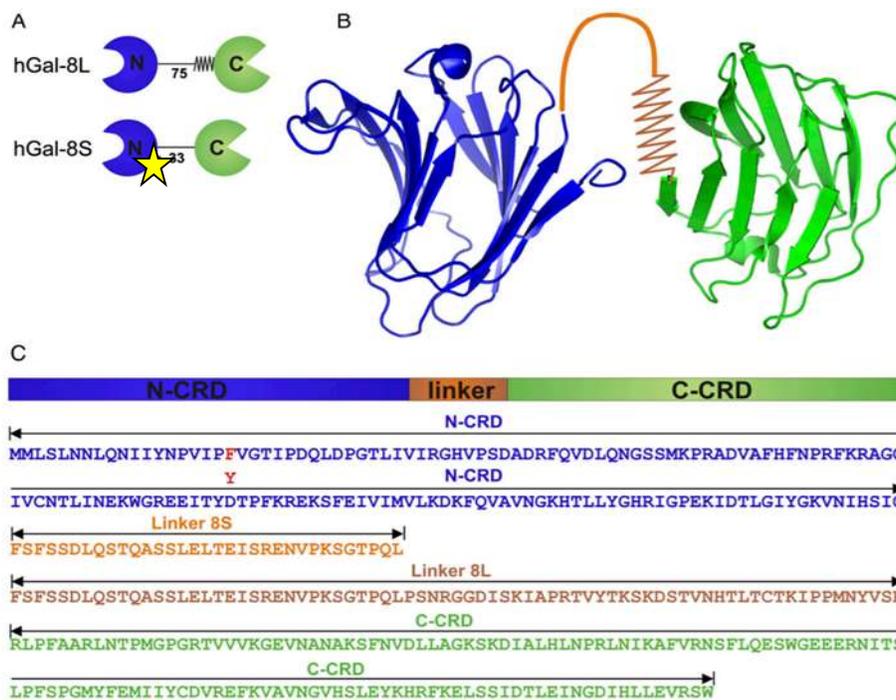


Figure 1.5 : Les deux isoformes protéiques de la galectine-8 humaine. La séquence supplémentaire de l'isoforme long situé dans la région charnière et contenant le site de clivage de la thrombine est représentée par les traits en zigzag. L'étoile représente le site de mutation F19Y (Section 1.2.4.1). Représentation schématique des deux CRD (A), de leurs repliements (B) et leurs séquences en acides aminés (C). Adapté de Zhang et coll., 2015.

L'orientation des CRD qu'offre le lien peptidique variant en longueur, affecte les propriétés d'adhésion et de signalisation de la gal-8 (Levy et al., 2006). Il semble que cette région charnière soit importante pour cinq principales fonctions : 1) pour son interaction avec d'autres protéines, 2) son insertion membranaire, 3) la présentation structurale de ces CRD, 4) l'intensité du potentiel de signalisation et finalement 5) la formation de treillis moléculaire (Si et al., 2016). Concrètement, voici des exemples de l'influence du lien peptidique sur les fonctions de la gal-8 : l'absence du lien peptidique ne modifie pas significativement l'influence de la gal-8 sur les neutrophiles, mais la stabilité de cette interaction est grandement augmentée en présence de ce lien (Nishi et al., 2005). Ensuite, des études ont été faites en utilisant la gal-1 afin d'en apprendre plus sur le rôle du lien peptidique et de sa taille en ce qui concerne les capacités extracellulaires des gals. Les conclusions de ces tests confirment qu'une plus longue région charnière augmente le potentiel de signalisation de la gal, sans toutefois modifier sa spécificité. De plus, la présence d'un plus long lien permet la formation de treillis moléculaire en présence de moins de gal (Earl et al., 2011). Une autre particularité liée à la longueur du lien peptidique concerne la thrombine. C'est une protéase qui semble jouer un rôle dans les activités de l'isoforme long, car elle en clive le lien peptidique au site arginine-glycine et arginine-thréonine (figure 1.5) (Nishi et al., 2006; Si et al., 2016). Le lien peptidique de l'isoforme moyen ne possède pas ces deux sites de digestion (figure 1.5). Selon Nishi et al. (2006), ce clivage aurait un rôle de régulation du répertoire des isoformes de la gal-8. Toutefois, la thrombine n'est pas une protéase ayant une haute spécificité au niveau de ses sites de clivage : il est donc possible qu'il y ait quand même une digestion sur ce dernier isoforme (Si et al., 2016).

Le C-CRD est particulier puisque plusieurs de ces résidus sont uniques à cette gal. En effet, il semble que ce soit les résidus tyrosine²⁶⁶ et tyrosine²⁷² aidés des résidus terminaux méthionine¹ et tryptophane³¹⁷ qui seraient responsables de l'activité autophagique de la gal-8 (Kim et al., 2013). Certains résultats mettent toutefois le résidu alanine³²³ localisé dans la poche de liaison hydrophobique en priorité pour ce processus (Li et al., 2013). Ce C-CRD possède une affinité prononcée pour les groupes sanguins de type A et B et cette particularité est due aux résidus serine³⁷ et asparagine³⁹ (Kumar et al., 2013; Si et al., 2016). Une autre différence par rapport au N-CRD est l'absence de l'arginine⁵⁹ et donc une plus courte boucle S3-S4 chez le C-CRD (Kumar et al., 2013). Le tryptophane⁷³ est impliqué dans les interactions CH- π , soit une liaison hydrogène liant un acide faible et une base faible, avec les β -galactoses, interaction que l'on retrouve toutefois aussi chez les autres gals (Kumar et al., 2013; Nishio, 2011). La

reconnaissance des résidus O3 des glucides par ce domaine implique l'arginine⁵⁷, lorsque celle-ci prend une conformation particulière (Kumar et al., 2013).

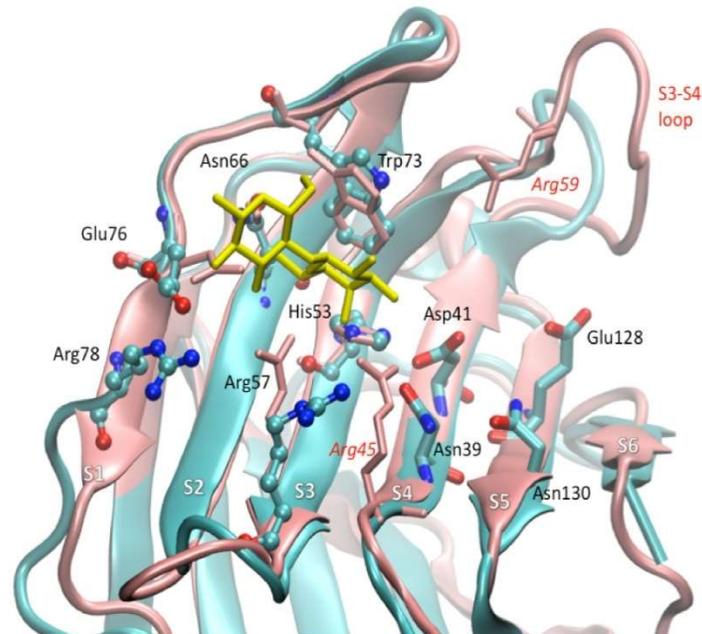


Figure 1.6 : Superposition des domaines N- et C-terminaux de la galectine-8. Le N-CRD est représenté en rose et le C-CRD en bleu. La structure en jaune représente le lactose à son site de liaison. La boucle S3-S4 variable entre les deux domaines est située dans la partie supérieure droite de la figure Kumar et coll., 2013.

1.2.3 Fonctions physiologiques et ligands

La spécificité des CRD de la gal-8 dicte ses fonctions tant physiologiques que pathologiques. Toutefois, d'autres critères tels que les compartiments cellulaires ou extracellulaires dans lesquels se retrouve la gal ainsi que sa concentration et la disponibilité de ces ligands principaux sont aussi importants lors de l'analyse de ces fonctions cellulaires (Grosset et al., 2016). Lorsque les concentrations sont faibles, la gal-8 interagit avec les intégrines qui sont parmi ses ligands de haute affinité pour ses fonctions dans les processus d'adhésion et de croissance cellulaires. À plus forte concentration de gal-8, celle-ci interagira avec des ligands de plus faibles affinités menant à une seconde catégorie d'effets cyostatiques (Arbel-Goren et al., 2005). Puisque seulement 10% des articles concernant la gal-8 mentionnent l'existence de plusieurs isoformes, les fonctions connues sont générales à la gal-8 totale. De plus, les études

prenant en compte l'épissage alternatif de *Igals8* sont parfois divergentes quant à l'isoforme en question.

1.2.3.1 Effets sur le développement des leucocytes

Les fonctions de la gal-8 sur le développement des leucocytes sont nombreuses. Elles influencent la prolifération, l'activation ainsi que la survie de ces cellules immunitaires. La gal-8 totale est impliquée dans la différenciation des cellules immunitaires via son association aux récepteurs du facteur TGF β RII et d'IL-2R β , activant la voie de signalisation du facteur de croissance transformant β (*transforming growth factor- β* ou TGF β) et pour maintenir active celle de l'interleukine-2 (IL-2) (Sampson et al., 2016). Ces deux voies engendrent respectivement l'augmentation de la phosphorylation de la protéine Smad3 et la prolongation de celle de la protéine STAT5. Cela mène ensuite à la modulation de l'expression de la protéine Foxp3, le principal facteur de transcription des cellules T régulatrices (cellules Treg) (Sampson et al., 2016). En plus de favoriser la formation de cellules Treg, la gal-8 amplifie l'expression des cellules TH2 et inhibe celle des cellules TH17 de façon CRD-dépendante (Sampson et al., 2016).

Pour la suite de cette section concernant l'impact de la gal-8 sur les leucocytes, la plupart des informations ajoutées n'incluant pas plusieurs isoformes, proviennent d'ouvrages ciblant l'isoforme long de la gal-8. De plus, selon une étude de Tribulatti et coll. (2007), les deux isoformes répertoriés dans les organes lymphoïdes de la souris, soit les isoformes long (36 kDa) et petit (35 kDa), engendrent les mêmes effets biologiques.

Dans la rate, la gal-8 est associée à la prolifération des leucocytes (Parham, 2003). Chez les murins, les deux isoformes induisent la prolifération des splénocytes en liant les glycoconjugués présents sur la membrane extracellulaire de ces cellules (Tribulatti et al., 2009). Cet effet prolifératif est observable principalement pour la population des lymphocytes T CD4⁺ par rapport au sous-type CD8⁺ (Tribulatti et al., 2009). De plus, la même étude indique que la gal-8 induit l'expression des cytokines IL-4, l'interféron gamma (IFN- γ) et IL-2. Par rapport à ce résultat, les auteurs concluent que la gal-8 n'agit pas en faveur d'une réponse immunitaire particulière, puisqu'IL-4 est particulière à la réponse T_H2 et l'IFN- γ caractérise plutôt la réponse T_H1 (Tribulatti et al., 2009). Dans une étude *in vitro*, Tribulatti et coll. (2012) révèlent que la gal-8 et la gal-1 agissent de concert afin de stimuler l'activation des cellules T après avoir simultanément connectée avec une cellule présentatrice d'antigène et une cellule T auxiliaire au moment de la

présentation de l'antigène. Cette stimulation passe par CD45, une tyrosine phosphatase transmembranaire très glycosylée, ainsi que par la voie des kinases ERK1/2 comprises dans la famille des MAPK (Tribulatti et al., 2009; Tribulatti et al., 2012). Son activité de phosphatase abaisserait le seuil de déphosphorylation d'un site inhibiteur de l'activation du récepteur des cellules T (Tribulatti et al., 2012). Après cette stimulation, la tyrosine kinase ZAP70 est rapidement phosphorylée et une activation cellulaire en découle (Tribulatti et al., 2009). Les auteurs spécifient que pour avoir cette co-stimulation, il faut 100 fois plus de gal-1 que de gal-8 et que la présence simultanée de gal-3 inhibe ce phénomène en déplaçant l'une ou l'autre des gal de son site de liaison. Ils ont aussi observé que ces gals ont un effet double, car bien qu'elles stimulent les cellules T naïves, elles inhibent la prolifération de celles-ci lorsqu'elles sont déjà activées (Tribulatti et al., 2012). La gal-8 peut aussi enclencher une activation du récepteur des cellules T sans l'aide d'une autre gal (Tribulatti et al., 2009). De plus, la structure de type « répétition en tandem » est essentielle pour que la gal-8 favorise la prolifération des cellules T CD4 naïves, mais ne l'est pas pour ces fonctions de co-stimulation lors de la réponse aux antigènes (Cattaneo et al., 2011).

Outre son action sur les lymphocytes, la gal-8 semble aussi contribuer à l'activation des cellules dendritiques, permettant une meilleure présentation des antigènes nécessaire à l'induction de la réponse immunitaire adaptative par une stimulation de la prolifération des cellules T (Carabelli et al., 2017). En effet, les cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse traitées avec de la gal-8 recombinante expriment plus de complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) de type II et de glycoprotéines membranaires CD80 et CD86 à leur surface, caractéristiques des cellules dendritiques matures. Ces mêmes cellules alors sécrètent plus de molécules costimulatrices pro-inflammatoires telles qu'IL-2,-3,-6 et du facteur de nécrose tumorale α (*tumor necrosis factor α* ou TNF- α) dans leurs milieux (Carabelli et al., 2017).

En ce qui concerne l'impact de la gal-8 sur la survie cellulaire, les deux isoformes murins de la gal-8 présents dans le thymocyte sont reliés à la modulation du répertoire des lymphocytes T (Tribulatti et al., 2007). La gal-8 ajoutée en culture se lie à tous les thymocytes, mais provoque seulement la diminution du nombre de cellules doubles positives CD4^{high}CD8^{high}, et ce, pour les deux isoformes testés (Tribulatti et al., 2007). Ces mêmes isoformes induisent aussi l'activation des caspases initiatrices -8 et -9 et de la caspase effectrice -3 menant à l'apoptose de cette sous-population de cellules doubles positives (Tribulatti et al., 2007). Normalement, les cellules doubles positives sont présentes seulement dans le thymus et ne survivent pas la sélection

négative qui mène à des lignées simples positives (Overgaard et al., 2015). La présence de cette sous-population dans la circulation périphérique est fortement associée avec des conditions d'auto-immunités (Parel et al., 2004; Tribulatti et al., 2007). Toujours en lien avec la réponse immunitaire, la gal-8 totale est aussi liée à l'activation et le dénouement de la réponse immunitaire. À la suite d'une intervention immunitaire, il y a un processus normal de résorption inflammatoire et des leucocytes impliqués. Les gals y jouent un rôle en induisant l'exposition du phosphatidylsérine (PS). C'est un phospholipide de la membrane cellulaire avec une sérine d'associée aux groupements phosphates et agissant comme marqueur de phagocytose pour les cellules en voie d'apoptose (Arthur et al., 2015; Stowell et al., 2008). Le PS est aussi impliqué dans les étapes menant à la coagulation sanguine. Sous sa forme de dimère, la gal-8 provoque l'exposition du PS à la surface des leucocytes lorsque son C-CRD reconnaît la présence de glucides contenant des motifs polyLacNAc (Stowell et al., 2008). Les gals impliquées dans cette exposition (gal-1, -3, -4 et -8) ont ainsi la capacité unique de préparer et de sensibiliser la cellule à la phagocytose sans induire l'apoptose, réduisant les risques d'inflammation (Arthur et al., 2015; Stowell et al., 2008).

1.2.3.2 Activation des cellules endothéliales

L'activation des cellules endothéliales fait référence à plusieurs changements de l'endothélium en vue de sa participation au processus inflammatoire. Les cinq principales caractéristiques de cette activation sont la perte de l'intégrité vasculaire, l'expression des molécules spécifiques pour l'adhésion des leucocytes, la transition vers un phénotype pro-thrombique, la production de cytokines et l'augmentation de l'expression des molécules du CMH de classe I (Hunt et al., 1998). L'activation de ces cellules par la gal-8 moyenne a été démontrée suite à l'induction de l'expression du facteur von Willebrand (FWv). L'expression de ce facteur par les cellules endothéliales permet l'adhésion des plaquettes sanguines (Cattaneo et al., 2014). La gal-8 serait d'ailleurs impliquée dans la formation des plaquettes sanguines, puisqu'elle favorise l'endocytose du facteur de coagulation V dans les mégacaryocytes exprimant le FWv, en s'y liant de façon CRD-dépendante (Zappelli et al., 2012). Concernant les plaquettes sanguines, elles seraient une source de gal-8 lors du processus inflammatoire, puisqu'elles expriment les deux isoformes à leurs surfaces suite à leurs activations par la thrombine (Cattaneo et al., 2014). Il a également été démontré que les isoformes moyens (38 kDa) et longs (≈ 39 kDa) de la gal-8 humaine permettent la liaison du fibrinogène en vue de l'agrégation des plaquettes. En effet, la gal-8 induiraient l'activation de l'intégrine transmembranaire α IIb β 3 vers un état de haute affinité de façon CRD dépendante. Cette intégrine est un récepteur d'adhésion exprimés par les

plaquettes qui est nécessaire à leurs agrégations (Romaniuk et al., 2010). Les deux isoformes moduleraient également les voies de signalisation calcique chez les cellules endothéliales, ce qui entraînerait la libération des granules cytoplasmiques denses et α , l'expression du FWv et de la P-sélectine (ou CD62P) qui, une fois exposée à la surface, permet le roulement des plaquettes sur les cellules endothéliales (Merten et al., 2000; Romaniuk et al., 2010). Parmi les autres molécules de signalisation en lien avec l'activation de l'endothélium par la gal-8 moyenne se trouve la protéine oncogène Src, les kinases PI3K et PKB et la phospholipase PLC γ 2 (Romaniuk et al., 2010). Cette boucle pro-inflammatoire entre la gal-8 et les cellules endothéliales est d'ailleurs mise en évidence par le fait que les isoformes moyens et longs de la gal-8 sont sécrétés par les cellules endothéliales (Cattaneo et al., 2014). La gal-8 moyenne serait responsable de l'expression et de la sécrétion de nombreuses cytokines pro-inflammatoires, telles que les cytokines CXCL1, CXCL3, CCL2, CCL5, l'IL-8 et le facteur GM-CSF (Cattaneo et al., 2014).

Concernant la différence entre les niveaux d'un isoforme par rapport à l'autre dans les cellules endothéliales, Cattaneo et coll. (2014) suggèrent que l'isoforme long ne s'accumulerait pas dans le cytoplasme en raison d'un transport continu vers le milieu extracellulaire, possiblement en lien avec l'état d'activation de la cellule. Selon Thijssen et coll. (2008), l'activation cellulaire pourrait induire une translocation de la gal-8 vers la membrane externe. Leurs travaux suggèrent que cette relocalisation serait liée au fait qu'une fois ces cellules activées, elles ont besoin de gal-8 pour certaines de leurs fonctions. Cette translocation pourrait peut-être expliquer pourquoi certaines cellules ont un répertoire différent de gal-8. Par exemple, l'étude de Cattaneo et coll. (2014) semble indiquer l'existence de deux des isoformes de gal-8 dans les cellules endothéliales alors que Thijssen et coll. (2008) observent trois isoformes (34, 36 et 38 kDa) de gal-8, bien que les niveaux d'expressions dans ce dernier cas soient très bas. De plus, lorsque soumises aux lipopolysaccharides, une molécule très inflammatoire, l'expression et la sécrétion de l'isoforme moyen sont augmentées de façon continue tout au long de l'exposition. Ceci indique que le contexte cellulaire modifie le ratio des isoformes de la gal-8 (Cattaneo et al., 2014).

1.2.3.3 Adhésion cellulaire

L'adhésion cellulaire est impliquée dans une multitude de voies de signalisation essentielles pour la communication et la régulation cellulaire sur lesquelles se basent le développement et la maintenance des tissus (Khalili et al., 2015). Les intégrines sont des récepteurs d'adhésion

transmembranaires reliant le milieu extracellulaire avec le cytosquelette d'actine et qui assurent une transmission bidirectionnelle des signaux (Iwamoto et al., 2015). Les études actuellement disponibles reliant la gal-8 à l'adhésion cellulaire ne prennent pas en compte l'existence de plusieurs isoformes lors de leurs analyses. La gal-8 induit l'adhésion des leucocytes d'une façon variable qui dépend de l'expression des molécules de surfaces cibles, telles que les intégrines (figure 1.7) (Yamamoto et al., 2008). À dose maximale, la gal-8 immobile est équipotente à la fibronectine en ce qui concerne la promotion de l'adhésion cellulaire (Boura-Halfon et al., 2003; Levy et al., 2001). La fibronectine est une glycoprotéine de la matrice extracellulaire essentielle pour la régulation des processus de réparation tissulaire (Reticker-Flynn et al., 2012; To et al., 2011). Toutefois, la quantité de gal-8 nécessaire pour obtenir un même effet est supérieure. Comme c'est le cas avec la fibronectine, lorsqu'une cellule adhère à la gal-8, il y a induction de signaux transmembranaires menant à la phosphorylation d'un résidu tyrosine contenu sur certaines protéines du cytosquelette (Levy et al., 2001). C'est notamment le cas pour la paxilline, qui contient une tyrosine phosphorylée lorsqu'elle est recrutée au site d'adhésion focale lors de l'engagement de l'intégrine (Gladkikh et al., 2018). Cette phosphorylation de la paxilline permet le recrutement de la vinculine qui assure la stabilité du point d'adhésion focal avec l'actine (Gladkikh et al., 2018). L'organisation du cytosquelette d'actine de la cellule adhérente est plus élaborée et les contacts focaux, points de ralliement entre les filaments d'actine et la matrice extracellulaire, sont plus importants lorsqu'il y a liaison à la fibronectine plutôt qu'à la gal-8 (Levy et al., 2001). De plus, après liaison de la gal-8, ces points de liaison contiennent moins de vinculine et de paxilline, ce qui concorde avec le fait qu'il faille plus de gal-8 pour obtenir les effets de la fibronectine. Cette promotion est réduite en présence de gal-8 soluble et d'autres éléments comme l'éthylènediaminetétra-acétique (EDTA), les peptides contenant le motif d'acide arginylglyasparatique et d'autres protéines sériques (Boura-Halfon et al., 2003; Levy et al., 2001). Les effets de la gal-8 sur l'adhésion cellulaire sont doubles et dépendent du contexte extracellulaire, puisque la gal-8 soluble s'associe sur les récepteurs de surface cellulaire et inhibe les associations subséquentes (Levy et al., 2001).

L'adhésion des lymphocytes aux protéines de la matrice extracellulaire est également dépendante des intégrines, notamment les intégrines $\alpha1\beta1$ et $\alpha3\beta1$ (Carcamo et al., 2006). Cette liaison engendre ou maintient l'activation de plusieurs voies de réarrangement du cytosquelette d'actine provoquant la projection de lamellipode (Carcamo et al., 2006). Les lamellipodes sont des formes de pseudopodes utilisées par la cellule pour son déplacement par des contractions qui propulsent le contenu cytoplasmique vers l'avant (Russo-Marie et al.,

1998). Les voies de signalisation à la base de cette projection impliquent plusieurs médiateurs connus, comme la kinase PI3K, la protéine Rac-1 et les kinases ERK1/2. Une autre étude réalisée avec la lignée cellulaire Jurkat indique que la gal-8 se lie à la surface des cellules T adhérentes et y induit un réarrangement du cytosquelette (Yamamoto et al., 2008). Dans ce cas, ce sont surtout les intégrines $\alpha 4$ et αL qui sont impliquées alors qu'il s'agit plutôt de l'intégrine $\alpha 5$ dans le cas des cellules K562, une lignée cellulaire d'origine myéloïde (Yamamoto et al., 2008). Cette liaison augmente la phosphorylation de la tyrosine kinase Pyk2 et ERK1/2 et cette phosphorylation correspond avec l'augmentation de l'adhésion cellulaire. La reconnaissance des intégrines par la gal-8 implique une liaison entre des glucides N-glycosylés sur le récepteur et le domaine CRD en C-terminal de la gal-8 (Yamamoto et al., 2008).

La gal-8 est également connue pour être impliquée dans l'adhésion des neutrophiles en circulation. Cette adhésion débute par le culbutage et le roulement des neutrophiles sur l'endothélium vasculaire via les sélectines, ce qui mène à l'activation des intégrines $\beta 2$. Ces intégrines adoptent alors une configuration structurale optimale pour l'adhésion ferme sur l'endothélium et pour leurs transmigrations dans l'espace extravasculaire (Nishi et al., 2003). La gal-8 semble impliquée dans l'adhésion des neutrophiles par l'activation de l'intégrine Mac-1 et par celle de la métalloprotéinase de la matrice-9 (MMP-9) (Nishi et al., 2003). Bien que Mac-1 soit exprimée par les éosinophiles, la gal-8 ne parvient pas, pour des raisons encore peu connues, au même résultat d'adhésion qu'avec les neutrophiles (Nishi et al., 2003). Il est possible que ce soit dû à une plus faible présence de ce récepteur sur les éosinophiles par rapport aux neutrophiles (Nishi et al., 2003). Quant à la MMP-9, il s'agit d'une enzyme au rôle clé dans le remodelage des tissus et dans la dégradation de la matrice extracellulaire (Nishi et al., 2003). Avant d'être active, la forme latente de cette enzyme, soit la (pro)MMP-9, doit subir un clivage protéolytique sur son pro-domaine. La gal-8 est impliquée dans cette étape d'activation puisqu'elle interagit avec cette (pro)MMP-9 et MAC-1. Parmi de nombreuses protéases, la MMP-3 semble être la plus efficace pour l'activation de la forme latente de MMP-9. Or, dans ce cas-ci, le N-CRD de la gal-8 interagit avec l'un des deux sites glycosylés de la (pro)-MMP9 alors que son C-CRD se lie à MAC-1 afin de produire une « adhésion activatrice » (Kumar et al., 2018; Stefanidakis et al., 2006). Les auteurs de cette étude indiquent que l'interaction de la gal-8 avec la (pro)-MMP9 serait responsable d'un changement de conformation accélérant les deux clivages d'activation de la MMP-9 par la MMP-3 (Kumar et al., 2018).

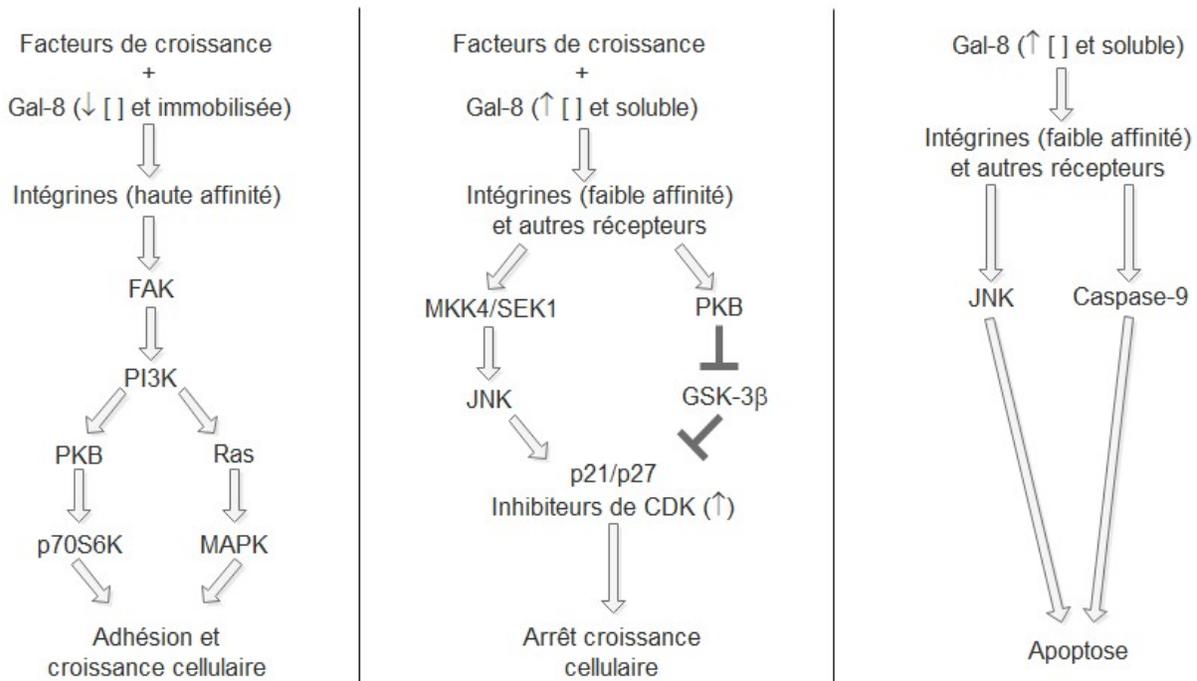


Figure 1.7 : Les différents modes d'action de la galectine-8. La gal-8 est impliquée dans plusieurs signalisations cellulaires qui aboutissent à des événements cellulaires distincts et qui dépendent des facteurs impliqués en amont de cette signalisation ainsi que du contexte cellulaire. Modifié d'Arbel-Goren et coll., 2005.

La gal-8 aurait également un rôle dans le maintien de l'intégrité du système lymphatique. Cueni et coll. (2009) ont ainsi démontré que via son interaction avec la podoplanine, une glycoprotéine membranaire grandement exprimée par les cellules endothéliales lymphatiques, la gal-8 favorise l'adhésion des cellules endothéliales lymphatiques à la matrice cellulaire ainsi que leurs migrations haptotaxiques (Cueni et al., 2009). D'un autre côté, cette interaction inhibe la formation des structures vasculaires, possiblement en stabilisant les cellules, les empêchant de se réarranger (Cueni et al., 2009). La présence de structure sialylée dans le domaine externe de la podoplanine précise une interaction possible via le N-CRD de la gal (Cueni et al., 2009).

1.2.3.4 Autophagie

L'autophagie est une voie intracellulaire de recyclage cytoplasmique très conservée chez les eucaryotes et nécessaire à la survie cellulaire (Parzych et al., 2014; Zhao et al., 2018). Bien qu'il existe plus d'une voie d'autophagie, l'étape ultime et commune est la livraison du contenu cellulaire au lysosome (Zhao et al., 2018). D'abord, il y a la formation d'un phagophore, c'est-à-dire, des membranes nouvellement formées qui englobent le contenu cytoplasmique et se fusionnent en vue de la formation de l'autophagosome à double membrane (Rubinsztein et al.,

2012). Contrairement au système ubiquitination-protéasome, l'autophagie permet de dégrader des éléments plus gros, tels que des pathogènes. Ces deux systèmes sont toutefois reliés puisque les pathogènes échappés de l'endosome sont identifiés par la liaison d'une ubiquitine (ub) par une ligase afin que l'ensemble soit intégré dans le processus autophagique (Kwon et al., 2018). La gal-8 intracellulaire, sans distinction entre les deux isoformes, reconnaît le dommage membranaire induit par un pathogène en raison de la présence de glucides intracellulaires qui ne sont normalement pas accessibles (Thurston et al., 2012). Les dommages aux endosomes peuvent être induits par une trop grande croissance bactérienne qui rompt les parois de la vacuole qui les contient (Kwon et al., 2018; Thurston et al., 2012). Donc, la gal-8 reconnaît les glucides provenant de la membrane endommagée et non le pathogène libre (Lai et al., 2015). Dans la littérature, les pathogènes ayant été utilisés dans les modèles expérimentaux visant l'étude de l'autophagie impliquant la gal-8 en tant que marqueur sont multiples : les bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus*, Streptococcus du groupe A (GAS)), *Listeria monocytogenes*), les bactéries à Gram négatif (*Salmonella typhimurium* ou *Shigella* sp.), *Mycobacterium tuberculosis* (Boyle et al., 2013; Scheidel et al., 2016; Spinnenhirn et al., 2014; Thurston et al., 2012), les virus de la famille des adénovirus ainsi que des picornavirus (Montespan et al., 2017; Staring et al., 2017). Après une détection anormale de glucide, la gal-8 s'associe avec les protéines adaptatrices NDP52 et de p62 qui initient ensemble l'autophagie en recrutant les éléments nécessaires aux processus (Kwon et al., 2018; Montespan et al., 2017). NDP52 dispose d'un site spécifique pour la liaison du C-CRD de la gal-8 (*galectin-8 binding region* ou GALBI): les résidus 371 à 381 de NDP52 lient la partie convexe de la gal-8 avec des liens hydrogènes et des contacts hydrophobiques, laissant la partie concave de cette lectine pour la liaison des glucides (Li et al., 2013). Ensuite, NDP52 se déplace vers le phagophore par son domaine CLIR (Kwon et al., 2018; Li et al., 2013). Il s'agit du domaine de reconnaissance des protéines LC3. Ce sont des protéines solubles recrutées sur les membranes de l'autophagosome lors de sa formation (figure 1.8) (Kwon et al., 2018; Tanida et al., 2008).

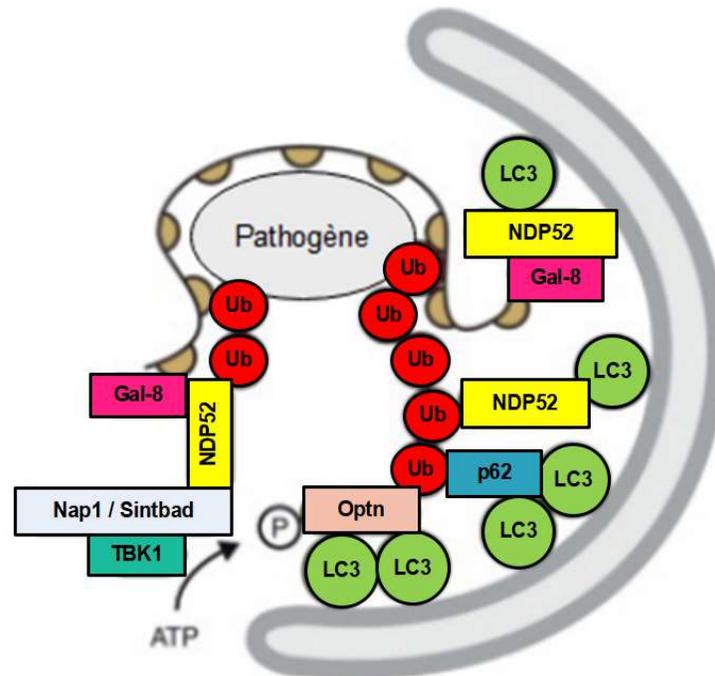


Figure 1.8 : Partenaires d'interaction autophagiques. La gal-8 détecte les glucides provenant de l'intérieur de la vésicule endommagée et enclenche alors une série de recrutement protéique aboutissant à la formation de l'autophagosome. Modifié de Boyle et coll., 2013.

Il est maintenant connu que les GAS n'infectent pas seulement les organismes via le milieu extracellulaire et qu'ils peuvent provoquer leurs internalisations afin d'échapper au contrôle immunitaire (Cheng et al., 2017). Dans les cellules épithéliales, le système associant les lysosomes aux phagosomes est suffisant pour gérer la menace, ce qui n'est toutefois pas le cas dans les cellules endothéliales. Cette différence peut s'expliquer par une expression supérieure de la gal-3 dans les cellules endothéliales en comparaison avec les cellules épithéliales. Au contraire, la gal-8 est plus exprimée dans les cellules épithéliales (Cheng et al., 2017). En effet, Cheng et coll. (2017) ont démontré que dans l'endothélium, la gal-3 qui y est fortement exprimée, bloque l'ubiquitination des GAS en empêchant le recrutement de la gal-8 et de la parkine (Cheng et al., 2017). La ligase parkine E3 catalyse la polyubiquitination sur la lysine⁶³ des membranes du phagosome contenant les bactéries. Les résultats de Cheng et coll. (2017) indiquent que lorsqu'elle n'est pas bloquée par la gal-3, la gal-8 est impliquée dans le recrutement de la parkine.

Dernièrement, Jia et coll. (2018) ont associé l'autophagie à la gal-8 et à l'enzyme mTOR. Normalement, les réponses cellulaires face aux changements métaboliques et au niveau d'énergie sont régulées par les kinases mTOR et AMPK. Parmi ces réponses cellulaires se

trouve l'autophagie (Jia et al., 2018). mTOR régule de façon négative ce processus en phosphorylant des sites inhibiteurs de l'autophagie. La gal-8 supprime l'activité inhibitrice de mTOR lorsqu'il y a un bris dans les membranes lysosomales (Jia et al., 2018). Finalement, selon Falcon et coll. (2018), l'enclenchement de l'autophagie par la gal-8 est associé à autre chose qu'une infection pathogénique. En effet, dans ce cas-là, la surveillance de l'intégrité endomembranaire prévient l'entrée de la protéine Tau dans le cytoplasme. En empêchant cette entrée, cela empêche aussi son agrégation, une caractéristique de plusieurs maladies neurodégénératives (Falcon et al., 2018; Sebastian-Serrano et al., 2018).

1.2.3.5 Autres ligands et fonctions métaboliques

Bien que les études sur la gal-8 aient surtout focalisé sur ses capacités de modulation du système immunitaire, de l'activation endothéliale, de l'adhésion cellulaire et de l'autophagie, une minorité de recherche concerne l'implication de cette protéine dans des voies métaboliques distinctes. Par exemple, son effet sur l'endocytose du récepteur de l'insuline, la régulation du cycle cellulaire et l'apoptose, le remodelage osseux, la formation des structures rénales et son implication dans la reproduction (Arbel-Goren et al., 2005; Boura-Halfon et al., 2003; Lim et al., 2017; Sun et al., 2016; Vinik et al., 2015). Ces études n'ont toutefois pas pris en compte l'existence de plusieurs isoformes. En utilisant des lymphocytes T, il a été démontré que la gal-8 inhibe entre 40 et 60% de l'internalisation totale du récepteur de l'insuline lorsque l'on compare avec d'autres ligands comme la fibronectine, le collagène ou la laminine (Boura-Halfon et al., 2003). Cette différence dans les niveaux d'endocytose du récepteur est due à un remodelage de l'actine par la gal-8 extracellulaire. Les cellules se liant à la gal-8 plutôt qu'à la fibronectine par exemple, modifient la disposition de leurs cytosquelettes de façon unique, impliquant la formation d'actine corticale, la projection cytoplasmique d'actine filamenteuse et une moins bonne organisation de microfilaments, sans qu'il n'y ait de différence dans le réseau de microtubule (Boura-Halfon et al., 2003). Il s'agit d'un remodelage de l'actine plutôt qu'une dépolarisation (Boura-Halfon et al., 2003).

La gal-8 est aussi connue pour son effet sur le cycle cellulaire. D'une part, elle inhibe la croissance cellulaire en provoquant l'accumulation de la kinase cycline dépendante inhibitrice p21 et de la p27 (Arbel-Goren et al., 2005). Lorsque la gal-8 extracellulaire s'associe à un sous-groupe de récepteur cellulaire comprenant les intégrines $\alpha_v\beta_8$ et $\alpha_6\beta_4$, il y a phosphorylation et donc activation des voies de la kinase terminale c-jun-N (*c-jun-N-terminal kinases* ou JNK) et de PKB. Ces activations mènent à une accumulation de p21 via une hausse de sa synthèse et une

baisse de sa dégradation (Arbel-Goren et al., 2005). La voie JNK, elle-même activée par la kinase MKK4, induit l'activité de NF- κ B qui augmente à son tour la transcription de p21 (figure 1.7) (Arbel-Goren et al., 2005), tandis que la voie PKB se résume en une phosphorylation inhibitrice de la kinase GSK3 β , responsable de la dégradation par le protéasome (figure 1.7) (Arbel-Goren et al., 2005; Watanabe et al., 2002). D'autre part, lorsqu'il n'y a pas d'accumulation de p21, il y a plutôt l'apoptose des cellules impliquant le clivage du *poly-ADP-ribose-polymerase-1* (PARP) augmente (Arbel-Goren et al., 2005). L'insuline réprime cet effet pro-apoptotique en permettant à la cellule de gérer de plus fortes concentrations de gal-8 sans entrer en processus de mort cellulaire. Selon les auteurs de cette étude, la présence de certains facteurs de croissance comme l'insuline outre-passe le caractère cytotatique de la gal-8 (Arbel-Goren et al., 2005). De plus, lorsqu'il y a accumulation de p21, cela protège la cellule des effets pro-apoptotiques connus de la gal-8. Ce phénomène a été observé seulement avec des lignées cellulaires transformées et non avec des cultures primaires (Arbel-Goren et al., 2005). P21 et p27 sont des protéines très semblables qui provoquent l'arrêt du cycle en G1 en inhibant différents complexes « kinases dépendantes des cyclines-cyclines » (Cdk-cyc) (figure 1.7), soit les complexes Cdk1-cycB, Cdk2-cycA, Cdk2-cycE et Cdk4-cycD (Darbon et al., 1995). Les Cdk doivent être associées à une sous-unité de régulation, la cycline, afin de réguler plusieurs aspects du cycle cellulaire, tel que le déclenchement de la mitose pour le complexe Cdk1-cycB (Wolowiec et al., 1996).

La gal-8 est aussi impliquée dans la régulation de la densité osseuse par son interaction avec plusieurs récepteurs, comme il a été démontré avec des modèles de souris gal-8-déficientes (Vinik et al., 2015). Son rôle est double : en s'associant aux récepteurs uPAR, MRC2 et LRP1 et en activant les voies de signalisation ERK et PKB, la gal-8 engendre l'expression et le relâchement du ligand du récepteur activateur de NF- κ B (*receptor activator of NF- κ B ligand* ou RANKL) par les ostéoblastes murins. Ces ostéoblastes sont responsables de la résorption osseuse et par le fait même, d'une inhibition de la formation des os (Vinik et al., 2018; Vinik et al., 2015). De plus, la présence de gal-8 a un effet inhibiteur sur l'expression de l'ostéoprotégérine, un inhibiteur naturel de RANKL. Toutefois, la gal-8 induit également l'expression du récepteur-1 de l'estrogène (*estrogen receptor 1* ou ESR1) qui favorise la formation osseuse et inhibe l'expression de RANKL (Vinik et al., 2018). Les auteurs ayant obtenu ces derniers résultats indiquent que les raisons de cette contradiction ne sont pas encore connues, ils ajoutent qu'il est possible que la formation osseuse soit en fait une

conséquence indirecte de l'interaction de la gal-8 avec CD44. CD44 est reconnue comme un activateur de la transcription et de l'activation d'ESR1 (Vinik et al., 2018).

La gal-8 a également d'autres rôles dans le développement, incluant celui de la fonction rénale. L'interaction dépendante du CRD de la gal-8 avec la podocalyxine, une sialoglycoprotéine, est nécessaire pour la formation de la lumière des tubules rénaux (Lim et al., 2017). En effet, la gal-8 régule le transport de la podocalyxine lors de sa synthèse, vers la surface apicale. Selon les auteurs de cette étude, il est possible que cette interaction permette à la podocalyxine d'être correctement emballée pour le transport vésiculaire polarisé malgré sa charge négative (Lim et al., 2017).

Finalement, Sun et coll. (2016) ont découvert que la gal-8 possède une grande affinité pour les spermatozoïdes, et ce, sur toute sa surface. En présence de cette gal, la réaction d'acrosome qui permet au spermatozoïde de compléter la fertilisation, est favorisée de façon significative (Sun et al., 2016). Chez la femme, la gal-8 est fortement exprimée dans l'épithélium de la surface luminale, l'épithélium glandulaire et le stroma de l'endomètre durant la phase lutéale du cycle menstruel, soit la période entre l'ovulation et le début des menstruations (Nikzad et al., 2013). Dans l'endomètre, la gal-8 module l'implantation de l'embryon durant la phase lutéale (Nikzad et al., 2013). De plus, elle est aussi exprimée dans le trophoblaste, plus intensément dans le cytotrophoblaste que dans le syncytiotrophoblaste (Kolundzic et al., 2011).

Dans l'ensemble, les études démontrent que la gal-8 peut accomplir un nombre important de fonctions physiologiques. Cette conclusion est importante si l'on considère le développement éventuel de thérapie ciblée sur la gal-8.

1.2.4 Fonctions pathologiques et ligands

1.2.4.1 Auto-immunité

Toutes les études sur le rôle de la gal-8 sur la modulation immunitaire citées dans la section précédente font de la gal-8 une protéine intéressante dans la recherche contre l'auto-immunité (Sampson et al., 2016). Encore une fois, les études citées dans cette section n'ont pas pris en compte l'existence de plusieurs isoformes lors de leurs analyses. L'implication de la gal-8 dans le développement des maladies immunitaires touchant l'œil est bien détaillé, notamment dans l'uvéïte, une maladie auto-immune responsable de 10 à 20% des cécités aux États-Unis

(Sampson et al., 2015). La fréquence d'expression élevée des cellules T_{H1} et T_{H17} et une présence moins élevée des cellules Treg seraient l'une des causes de cette maladie (Sampson et al., 2015). Des études réalisées avec des modèles de souris ont démontré qu'un traitement avec la gal-8 réduit les atteintes à la rétine et aux photorécepteurs cellulaires. Cette réduction corrèle avec une baisse de la production de cytokines inflammatoires (IFN γ et IL-17A) par les cellules T_{H1} et T_{H17}, dommageables pour la rétine, et avec une hausse de la réponse anti-inflammatoire des cellules Treg via l'augmentation d'IL-10 (Sampson et al., 2015). La gal-8 favorise aussi la réponse immunitaire de type T_{H2}, ce qui retarde la progression de la pathologie (Sampson et al., 2015). Les résultats indiquent que la gal-8 n'agit pas sur la différenciation des cellules T naïves, mais plutôt à titre de protéine restauratrice de l'équilibre immunitaire (Sampson et al., 2015). La gal-8 favorise la formation des plasmocytes en se liant efficacement au niveau des cellules B matures (Tsai et al., 2011). Elle y parvient via l'induction du domaine PRDM1 qui contrôle plusieurs événements, comme la croissance morphologique de la cellule et la sécrétion d'immunoglobuline (Tellier et al., 2016). L'IL-6 impliquée dans la différenciation des cellules B, est aussi augmentée en présence de gal-8 (Tsai et al., 2011). Alors que l'expression de *Igals8* diminue lors de la différenciation des cellules B, il y a accumulation de la protéine. Par rapport à ce phénomène, les auteurs proposent que l'isoforme protéique moyen de la gal-8 s'accumule en raison de son plus petit lien peptidique lui offrant plus de stabilité (Tsai et al., 2011).

Le développement du glaucome est aussi une maladie de l'œil dans laquelle la gal-8 est impliquée (Diskin et al., 2012). Les causes du développement de cette affection du nerf optique ne sont pas encore totalement connues, mais la pression intraoculaire résultant d'une altération de la circulation de l'humeur aqueuse, en fait partie (Diskin et al., 2012). L'intégrité de la matrice cellulaire du réseau trabéculaire est essentielle à la sortie du liquide oculaire (Diskin et al., 2012). La liaison CRD-dépendante de la gal-8 avec l'intégrine β 1 des cellules du réseau trabéculaire active l'une des voies de signalisation de la protéine Rho, une GTPase qui régule la réorganisation du cytosquelette d'actine et favorise la formation de structures fibreuses (Diskin et al., 2012). Cette interaction implique les résidus sialilés de l'intégrine et le N-CRD de la gal (Diskin et al., 2009). Toujours en lien avec le système immunitaire de l'œil chez la souris, il a été démontré que l'augmentation de l'expression de la gal-8 est associée au rejet d'allogreffe de cornée, la transplantation la plus exercée (Sugaya et al., 2015). Les auteurs relient le potentiel pro-angiogénique de la gal-8 par l'intermédiaire de la glycoprotéine membranaire CD166 à ces rejets de greffe (Sugaya et al., 2015).

Outre son rôle dans les troubles visuelles, la gal-8 est reliée à d'autres dérèglements immunitaires affectant les articulations, les muscles squelettiques, les nerfs, les tissus conjonctifs et les reins (Carlsson et al., 2012; Eshkar Sebban et al., 2007; Massardo et al., 2009; Pal et al., 2012; Pardo et al., 2017; Vicuna et al., 2013). Pour certaines études, son implication est détaillée alors que pour d'autres, de simples corrélations ont été conclues. Par exemple, la substitution d'une phénylalanine pour une tyrosine en position 19 de l'exon 1 de la gal-8 a été associée à l'arthrite rhumatoïde et à la myasthénie grave, affectant respectivement les articulations et la communication neuromusculaire. Cette mutation appelée F19Y (figure 1.5) n'affecte toutefois pas l'expression ni les capacités de liaison par le CRD de la gal-8 (Pal et al., 2012). Ensuite et plus précisément pour l'arthrite rhumatoïde, les cellules du fluide synovial des patients atteints de cette maladie, présentent un variant particulier de la glycoprotéine de surface CD44, le variant CD44vRA, en cause dans le développement de la maladie (Eshkar Sebban et al., 2007; Nedvetzki et al., 2003). Chez ces patients, la gal-8 interagit préférentiellement avec ce variant. De plus, la gal-8 exprimée et sécrétée par les cellules synoviales en régule l'apoptose de façon autocrine via la voie JNK (figure 1.7) (Eshkar Sebban et al., 2007). Bien que la gal-8 interagisse aussi avec les autres isoformes de CD44, le variant CD44vRA est formé d'un codon CAG supplémentaire qui lui permet une meilleure affinité avec la gal-8 (Eshkar Sebban et al., 2007). Lorsque le variant CD44vRA est solubilisé, probablement via un clivage enzymatique, il forme un complexe avec la gal-8 et le fibrinogène, après quoi l'apoptose est inhibée et l'inflammation s'en trouve augmentée (Eshkar Sebban et al., 2007).

Concernant la sclérose en plaques, une maladie affectant la gaine de myéline des nerfs du système nerveux central, Pardo et coll. (2017) ont constaté que la gal-8 a un effet protecteur chez les modèles murins précliniques. Cette protection serait liée à l'induction de l'apoptose chez les cellules immunitaires T_H17 activées. Toutefois, certains sujets sécrètent des auto-anticorps dirigés contre la gal-8 et ont alors un mauvais pronostic (Pardo et al., 2017). En lien avec la sécrétion d'auto-anticorps reconnaissant la gal-8, leurs présences dans l'organisme des personnes atteintes du lupus érythémateux, une maladie affectant les tissus conjonctifs, a un effet positif (McDaniel et al., 2018; Vicuna et al., 2013). Dans cette maladie, l'immunosuppression favorisée par la gal-8, ainsi que son interaction avec la protéine LFA-1, est bénéfique pour le patient (Vicuna et al., 2013). LFA-1 est une molécule d'adhésion cellulaire surexprimée chez les personnes atteintes du lupus. Cette molécule est impliquée dans les échanges entre les cellules présentatrices d'antigène et les lymphocytes T, l'adhésion des lymphocytes T aux cellules endothéliales et l'activation des cellules T mémoires dans les tissus

lymphoïdes. La gal-8 s'associe à LFA-1 de façon CRD-dépendante et y bloque son interaction avec la molécule-1 d'adhésion intercellulaire (*intercellular adhesion molecule 1* ou ICAM-1). Il s'agit d'un récepteur cellulaire surexprimé à la surface des cellules T et endothéliales chez les patients atteints de lupus (Vicuna et al., 2013).

D'autres études concernant le lupus, l'arthrite rhumatoïde et le syndrome des anticorps anti-phospholipides ont également documenté la présence d'auto-anticorps contre la gal-8 chez l'humain (Massardo et al., 2009; Sarter et al., 2013). Toutefois, selon ces études, les auto-anticorps ne sont pas spécifiques aux maladies auto-immunes puisqu'ils sont aussi augmentés durant le processus inflammatoire septicémique (Massardo et al., 2009; Sarter et al., 2013). Finalement, il y a une corrélation entre les ratios de gal-8 et de gal-1 et une néphropathie auto-immune : la baisse du niveau sérique de gal-1 liée à un glycoconjugué associée à une hausse de ceux de gal-8 corrèle avec la présence de la maladie de Berger (Carlsson et al., 2012).

1.2.4.2 Cancer

Les études concernant la gal-8 (totale, sans distinction aux isoformes) et les différents cancers sont multiples. En lien avec le développement du cancer, la surexpression pathologique de la gal-8 favorise la transformation cellulaire des cellules épithéliales en favorisant une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) partielle et réversible, ainsi que l'apparition de caractéristiques pro-tumorales telles que la prolifération et la formation de métastase (Oyanadel et al., 2018). Normalement, la TEM est un processus qui survient durant la formation des organes, la réparation de tissus et la guérison de ceux-ci, tandis qu'elle est pathologiquement associée à la fibrose des organes et à la progression du cancer (Oyanadel et al., 2018). La gal-8 lie l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ distribuée sur la membrane basolatérale, ce qui active la kinase d'adhésion focale (*focal adhesion kinase* ou FAK), une protéine majeure pour la signalisation des intégrines. Cette activation mène ultimement à l'augmentation de l'expression génique du récepteur du facteur de croissance épidermique (*epidermal growth factor receptor* ou EGFR). L'augmentation d'EGFR induit l'activation du protéasome et de la TEM (Cornillon et al., 2003; Oyanadel et al., 2018). Les fonctions d'EGFR incluent la régulation de la prolifération et de la différenciation des cellules épithéliales. L'activation de FAK peut promouvoir d'autres voies de signalisation menant à la progression tumorale (Oyanadel et al., 2018).

La plupart des conclusions impliquant la gal-8 et le cancer associent sa présence à un pronostic défavorable. Par exemple, lors du développement du cancer de la prostate, la gal-8 est

impliquée dans la formation de métastases en favorisant la migration et l'agrégation des cellules tumorales, sans avoir d'influence sur la tumeur primaire (Gentilini et al., 2017). L'agrégation des cellules tumorales améliore la survie de celles-ci lors de leurs circulations dans le sang. La gal-8 est impliquée dans cette formation d'agrégat via un contrôle positif de l'expression de la glycoprotéine transmembranaire E-cadhérine et une réorganisation du cytosquelette (Gentilini et al., 2017). La baisse de l'expression d'E-cadhérine est souvent associée à la progression tumorale, mais ces derniers résultats ajoutés à d'autres montrent une implication plus complexe et variable (Gentilini et al., 2017; Mauro et al., 2010). De plus, la gal-8 empêcherait l'anoïkose (l'apoptose engendrée par le détachement d'une cellule de sa matrice extracellulaire) via une inhibition de l'activation de la caspase-3 (Gentilini et al., 2017; Simpson et al., 2008). Les auteurs de ces études supposent que la gal-8 serait la seule gal à contrôler le processus métastatique des patients atteints du cancer de la prostate (Gentilini et al., 2017).

Chez les patients atteints de carcinome rénal à cellule claire de stade T1b, la présence de gal-8 serait un bio-marqueur défavorable lors du suivi de la récurrence de la maladie chez les patients ayant subi une néphrectomie (Liu et al., 2015).

Dans les cas de cancer de la vessie, du poumon et deux formes agressive de cancer du cerveau, celui affectant les astrocytes du parenchyme et le glioblastome multiforme, la gal-8 est fortement associée au développement du cancer et la progression métastatique de façon CRD-dépendante (Camby et al., 2001; Kramer et al., 2011; Metz et al., 2016; Reticker-Flynn et al., 2012). Dans les cellules de glioblastome, la quantité de résidus d'acide sialique est supérieure à celle observée chez les cellules saines, en raison d'une augmentation de l'expression des sialyltransférases (Metz et al., 2016). Cette dernière observation pourrait expliquer l'implication de la gal-8 dans ce cancer, en raison de sa forte affinité pour ce type de résidus (Metz et al., 2016). L'expression de la gal-8 est supérieure dans le sérum des donneurs atteints d'un myélome multiple comparativement aux donneurs sains, ce qui est associée avec un pronostic défavorable (Friedel et al., 2016). Contrairement à la plupart des études, dans ce cas-ci, les auteurs ont porté une attention particulière aux isoformes de gal-8. Ils ont démontré que l'expression des deux isoformes répertoriés (petit et long) dans cette étude varie en fonction de la lignée cellulaire (Friedel et al., 2016). Les deux isoformes de gal-8 extracellulaire s'y lient de façon CRD-dépendante et influencent l'adhésion des cellules de myélome aux cellules endothéliales, mais d'une façon plus remarquée dans le cas de l'isoforme long (Friedel et al., 2016). Les auteurs ont proposé que la différence d'interaction entre les deux isoformes est liée à

la plus grande flexibilité du lien peptidique reliant les deux CRD de la gal-8 longue, le lien plus long offrant plus de combinaisons de ligands glucidiques (Friedel et al., 2016). Une autre étude dans laquelle les deux isoformes de la gal-8 ont été considérées portait sur la migration des cellules tumorales. Plus spécifiquement, cette étude, réalisée sur des cellules endothéliales bovines a permis de mettre en évidence la présence de trois isoformes protéiques dans le noyau et le cytoplasme des cellules saines ainsi que dans les cellules tumorales (Delgado et al., 2011). Dans cette étude, la gal-8 induit la morphogenèse des cellules endothéliales, l'angiogenèse ainsi que la migration des cellules endothéliales avec l'aide de CD166 (Delgado et al., 2011).

Des études sur le cancer de la glande thyroïde ont démontré que la gal-8 totale est présente dans la majorité des tissus tumoraux de la glande thyroïde, mais absente dans les cellules saines avoisinantes (Savin et al., 2009). Les auteurs indiquent que la gal-8 est un bio-marqueur potentiel indiquant le développement d'un carcinome papillaire thyroïdien. Toutefois, ce n'est pas un bon marqueur pour différencier les cancers thyroïdiens folliculaires (Savin et al., 2009).

Les recherches de Remmelink et coll. (2010) concernant les tumeurs des glandes salivaires révèlent que la localisation intracellulaire des gals pourrait servir à évaluer le développement de la maladie. Par exemple, contrairement aux autres gals étudiées (gal-1, -3 et -7), la gal-8 totale est exclusivement cytoplasmique dans les conduits intra- et inter-lobulaire des échantillons témoins (Remmelink et al., 2011). La formation d'adénome pléomorphe est associée avec l'apparition de gal-8 nucléaire, en plus de sa présence dans le cytoplasme. Dans ces échantillons, c'est la gal-8 que l'on retrouve en plus grand nombre. De plus, les tumeurs malignes présentent une diminution des taux de gal-8 (Remmelink et al., 2011).

Contrairement à ce qui est observé dans les tumeurs malignes salivaires, l'augmentation de l'expression de la gal-8 dans le cancer du larynx est liée à l'augmentation de la malignité. Cette gal influence aussi l'interaction entre les cellules cancéreuses épidermoïdes et le stroma du larynx (Dong et al., 2009). Les auteurs affirment que la gal-8 peut être utilisée à titre de marqueur pour ce type de cancer (Dong et al., 2009).

En étudiant des cellules T de lymphomes cutanés, il a été trouvé que la gal-8, tout comme la gal-3, serait liée à une perte du contrôle de la prolifération et à des changements dans

l'adhésion des cellules, phénomènes impliqués dans la dispersion des cellules malignes (Wollina et al., 2002).

Dans le cancer du côlon, les niveaux de gal-8 sont moindres dans les échantillons au stade malin et dans les cancers plus invasifs, lorsque comparés avec les échantillons sains ou moins invasifs, respectivement (Nagy et al., 2002; Nagy et al., 2003). Selon les auteurs de cette étude, les pronostics associés à la gal-8 sont pertinents pour les stades cliniques tardifs (Nagy et al., 2003).

Contrairement à plusieurs des études citées ci-haut, certaines études présentent des corrélations positives quant à la présence de la gal-8 totale et la survie des patients cancéreux. Les résultats d'une étude clinique réalisée sur une cohorte de patients atteints d'un cancer de l'estomac non métastatique, révèlent l'existence d'une corrélation entre une forte expression de gal-8 et un pronostic favorable (Wu et al., 2016). Les auteurs concluent que cette gal peut être utilisée à titre de bio-marqueur dans l'évaluation du patient à la suite d'une résection chirurgicale (Wu et al., 2016). La gal-8 peut aussi être utilisée pour déterminer le pronostic des patientes atteintes d'un cancer des ovaires (Labrie et al., 2017; Schulz et al., 2018). La faible expression de la gal-8 dans les cytoplasmes des cellules cancéreuses corrèle avec la présence de métastase aux ganglions lymphatiques et à un plus haut grade d'évolution du cancer (Schulz et al., 2018). Dans le même ordre d'idée, la gal-8 pourrait aussi être utilisée pour estimer la réponse à la chimiothérapie chez les patientes atteintes d'un cancer des ovaires (Labrie et al., 2017). Cela concorde avec les résultats de Carlsson et coll. (2012) qui ont montré une corrélation entre les niveaux sériques à la hausse de gal-1 et une baisse de ceux du N-CRD de la gal-8 avec la présence de métastase du cancer du sein (Satelli et al., 2008). Une étude faite avec des lignées cellulaires de cancer du sein, du colon et cérébrales, indique la présence de deux isoformes transcriptionnels de gal-8 dans le milieu extracellulaire ainsi que de la présence d'une protéine de 36 kDa dans les compartiments nucléaire et cytoplasmique (Satelli et al., 2008). Les résultats d'immunoprécipitations du milieu extracellulaire montrent aussi la présence d'une protéine équivalente à 18 kDa. Selon les auteurs, cela suggère que la gal-8 subit des modifications post-traductions après sécrétion (Satelli et al., 2008).

Dans l'ensemble, ces résultats mettent en lumière un double rôle de la gal-8 dans le cancer, ce qui complique son utilisation comme bio-marqueur prédictif. À cela s'ajoute le fait que la gal-8

peut s'exprimer sous différents isoformes et peut se localiser tant au niveau extracellulaire qu'intracellulaire, et même dans différents compartiments intracellulaires.

1.3 Le cancer du sein et ses sous-types

Au Canada, plus de 25 000 femmes sont diagnostiquées d'un cancer du sein chaque année, il s'agit d'environ une femme sur huit (www.cancer.ca). Ce cancer est une maladie très hétérogène pouvant être classifiée en différents sous-types moléculaires déterminés selon le profil d'expression de certains gènes (Perou et al., 2000). Cette classification est possible depuis l'importante étude de Perou et coll. (2000) qui ont, entre autres, évalué 8 102 gènes humains provenant de 42 individus. De plus, ces auteurs ont analysé 17 lignées cellulaires à titre de comparaison au prélèvement de tissus mammaire. Plusieurs autres groupes de recherches ont apporté leurs résultats à ceux de Perou et coll. (2000) afin que l'on puisse aujourd'hui classer les cancers du sein en quatre principaux sous-types moléculaires : Luminal A, Luminal B, positif au récepteur-2 de croissance épidermique humain (*human epidermal growth factor receptor 2* ou HER-2+) et les Triples-négatifs (Parker et al., 2009; Sorlie et al., 2001). Voici donc une brève description de ces quatre sous-types.

1.3.1 Les sous types moléculaires

1.3.1.1 Luminal A

Il s'agit de l'un des deux sous-types moléculaires, avec le luminal B, les plus fréquemment diagnostiqué. Il est fréquemment caractérisé par une expression des récepteurs de l'estrogène et de la progestérone ainsi qu'avec un plus faible index de prolifération (Engstrom et al., 2013). Ce sous-type répond normalement bien à l'hormonothérapie et corrèle avec un bon pronostic (Di Cosimo et al., 2010).

1.3.1.2 Luminal B

Ce sous-type est aussi fréquemment diagnostiqué, mais est associé avec un moins bon pronostic que le luminal A en raison de son index de prolifération supérieur et de ces caractéristiques plus agressives (Ades et al., 2014; Di Cosimo et al., 2010). Les marqueurs tissulaires *Human epidermal receptor-2* (HER-2) et la présence fréquente des récepteurs à

l'œstrogène et de la progestérone sont parmi les caractéristiques de ce sous-type (Ades et al., 2014).

1.3.1.3 HER-2+

Ce sous-type compte pour 15 à 20% des diagnostiques de cancer du sein. Sa principale caractéristique est l'importante expression de la protéine oncogène HER-2 et l'absence des récepteurs hormonaux de l'estrogène et de la progestérone (Ross et al., 2004). Son pronostic est défavorable en raison du caractère agressif et infiltrant de ce type de cancer, ajouté au manque de traitement disponible (Bedard et al., 2013; Grosset et al., 2016).

1.3.1.4 Triple-négatif

Ce sous-type est caractérisé par l'absence des récepteurs hormonaux propre à l'estrogène et la progestérone, ainsi qu'à l'absence de la surexpression d'HER-2. Ce diagnostic est émis dans 10 à 17% des cas de cancer du sein (Badve et al., 2011). Encore une fois, l'absence de traitement spécifique ainsi que l'agressivité de ce sous-type l'associe aux plus bas taux de survie chez les patientes atteintes d'un cancer du sein. Son pronostic est le plus défavorable des sous-types moléculaires de cancer du sein (Bedard et al., 2013; Grosset et al., 2016).

1.3.2 La gal-8 et le cancer du sein

Les résultats les plus convaincants concernant l'implication de la gal-8 dans le cancer du sein concernent les recherches de Grosset et coll. (2016). En effets, ces auteurs ont démontré que l'expression de la gal-8 est associée de façon significative à la survie des patientes souffrant d'un cancer du sein de sous-type triple-négatif. En utilisant des biopsies, ils ont constaté que la localisation nucléaire de la gal-8 est associée à un taux de survie sur 5 ans de 100% alors que l'absence de cette gal dans le noyau corrèle avec un taux de survie de 70%. Bien que cette observation soit aussi vraie lorsque les sous-types de cancer ne sont pas pris en compte lors de l'analyse, les auteurs se sont surtout intéressés aux triples négatifs (Grosset et al., 2016). C'est d'ailleurs cette étude qui a menée à la réalisation du présent travail, puisque le profil des isoformes de la gal-8 n'a pas été pris en compte lors de l'analyse des résultats (Grosset et al., 2016).

Dans les tissus sains de glande mammaire, la gal-8 se retrouve de façon modérée dans le milieu extracellulaire et le cytoplasme, alors qu'à l'état cancéreux, la gal-8 se retrouve aussi

dans le noyau. En lien avec l'existence de plusieurs sous-types moléculaires de cancer du sein, ces auteurs ont évalué que l'expression transcriptionnelle de la gal-8 est, selon un ordre décroissant d'expression, la plus forte dans les sous-types luminal A, HER-2+, luminal B suivi du sous-type triple-négatif (Grosset et al., 2016).

CHAPITRE 2 : HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

2.1 But de l'étude

Approfondir les connaissances concernant le profil d'expression transcriptionnelle et protéique de *Igals8* dans des lignées cellulaires de cancer du sein.

2.2 Hypothèses et objectifs

En fonction des connaissances disponibles dans la littérature, les hypothèses sur lesquelles se basent les objectifs de ce mémoire sont les suivantes. Dans un premier temps, il est attendu d'observer l'expression de minimalement deux isoformes de *Igals8* au niveau transcriptionnel et protéique. De plus, il est attendu d'observer une expression significativement supérieure de l'isoforme protéique moyen par rapport à l'isoforme long en raison de la susceptibilité de ce dernier pour le clivage protéolytique (Nishi et al., 2006). Pour confirmer la présence de ces isoformes, nous mettrons en culture plusieurs lignées cellulaires de cancer du sein et nous analyserons l'expression de la gal-8 en utilisant les techniques de transcription inverse et de réaction de polymérase en chaîne, de séquençage, d'immunobuvardage de type Western et d'imagerie confocale. Dans un second temps, puisque la localisation intracellulaire de la gal-8 corrèle avec des pronostics différents chez les patientes atteintes d'un cancer du sein de sous-types triples négatifs, il est attendu que la nature de l'isoforme dicte sa localisation intracellulaire (Grosset et al., 2016). Cette hypothèse sera testée par immunobuvardage de type Western avec les fractions protéiques cytoplasmiques et nucléaires. Finalement, notre dernière hypothèse suppose que l'expression de *Igals8* ne soit pas un mécanisme stochastique au contraire de ce que Gopalkrishnan et coll. (2000) ont conclu. Afin de répondre à cette question, nous contrôlerons la densité cellulaire des lignées en culture et nous ajouterons différentes concentrations d'une autre gal, la gal-7, dans le milieu de culture. Ensuite, nous analyserons l'expression par transcription inverse et réaction de polymérase en chaîne.

CHAPITRE 3 : MATÉRIELS ET MÉTHODES

3.1 Lignées cellulaires et réactifs

Les six lignées cellulaires d'adénocarcinomes mammaires (MCF7, MDA-MB-468, MDA-MB-231, SKBR3, Hs578t et T47D) ont été obtenues de l'American Type Culture Collection (ATCC, Burlington, ON, Canada). Toutes les lignées ont été maintenues dans du milieu complet Dulbecco's modified Eagle's (Wisent, St-Bruno, Qc, Canada) supplémentés de 10% FBS (v/v) (Wisent), 2 mmol/L de L-glutamine (Life Technologies, Burlington, ON, Canada), 20 mmol/L de tampon HEPES (Wisent) et 1 mmol/L de sodium pyruvate (Life Technologies). Les cultures ont été incubées à 37°C avec 5% CO₂. Les densités cellulaires ont été calculées avec un hémacymètre. La gal-7 recombinante humaine (gal-7RH) a été produite selon le protocole décrit par Vladioiu et coll. (2015), stérilisée avec une seringue et un filtre 0,22 micron et diluée dans du milieu de culture DMEM complet supplémenté de 2% FBS (v/v) selon la concentration voulue : 1 µM, 5 µM ou 25 µM pendant 96 h.

3.2 Isolation de l'ARN, transcription inverse et réaction de polymérase en chaîne et réactifs (Rt-PCR).

L'ARN cellulaire total a été extrait des cellules par le réactif TRIzol (Life Technologies) selon les recommandations du manufacturier. L'ADN complémentaire (ADNc) de premier ordre a été obtenu à partir de 2 µg ou de 5 µg d'ARN total pour les expériences préliminaires et les expériences suivantes, respectivement. L'ARN total a été ensuite converti en ADNc en utilisant le « *Reverse transcriptase Omniscript kit* » (QIAGEN, Mississauga, ON, Canada) pour les expériences préliminaires et la « *M-MuLV reverse transcriptase* » (New England Biolabs, Ipswich, MA, États-Unis) pour les expériences suivantes. Après la transcription inverse, l'ADNc a été utilisé pour la mesure de l'expression en ARNm de la gal-8 humaine en utilisant les amorces suivantes : (Gene ID: 3964, amorce sens : 5'-GCAGAATGGCAGCAGTGTGAA-3', amorce anti-sens : 5'-TTCAGGCGTGGGTTCAAGTG-3'). Comme témoin, le gène codant pour le glycéraldehyde-3-phosphate deshydrogénase humaine (GAPDH, Gene ID: 2597, amorce sens : 5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT-3', amorce anti-sens : 5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3') a été utilisé. L'amplification a été réalisée avec le « *Polymerase chain reaction kit* » (BioBasic, Markham, ON, Canada) selon les conditions suivantes : 3 min à 94°C suivi de 35 cycles de 40 sec à 94°C, 40 sec à 65°C (gal-8, gal-7 et GAPDH), 40 sec à 72°C. L'amplification s'est terminée par une incubation de 10 min à 72°C. La

réaction de polymérase en chaîne s'est faite dans un Mastercycler Pro (Eppendorf, Mississauga, ON, Canada). Les produits d'amplifications ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose avec coloration au SYBR Safe (Life Technologies) et sur une plaque à illumination aux rayons ultra-violet avec analyse densitométrique par le logiciel Image J.

3.3 Séquençage

Les protocoles d'isolation de l'ARN, de transcription inverse et de réaction de polymérase en chaîne sont les mêmes que ceux décrits à la section précédente à l'exception des amorces. Pour l'isoforme long de gal-8 : amorce sens : 5'-GCAGAATGGCAGCAGTGTGAA-3', amorce anti-sens : 5'-GACAGTTCTGGGTGCG-3' et pour l'isoforme moyen : amorce sens 5'-ACAGTTCTGGGTGCG-3', amorce anti-sens : 5'-ATGGCAGCCTAAGCTGGGGC-3'. Les échantillons ont ensuite été séquencés par Génome Québec selon les directives spécifiques au séquençage de type Sanger (gginnovationcenter.com).

3.4 Imagerie confocale et réactifs

Les cellules ont d'abord été mises en culture sur des lamelles de verre jusqu'à semi-confluence. Après 24 h, les cellules ont été lavées avec du PBS froid, fixées avec une solution de 3% (v/v) de paraformaldéhyde/PBS, perméabilisées avec une solution de 0,1% (v/v) de Triton X-100/PBS et bloquées avec une solution de 1% (v/v) de BSA/PBS pendant 30 min. Les cellules ont ensuite été incubées 12 h à 4°C avec des anticorps primaires spécifiques pour la gal-8 (un anticorps polyclonal de lapin dilué 1 :1000 obtenu d'Abcam, Toronto, ON, Canada). Après plusieurs lavages, les cellules ont été incubées avec des anticorps secondaires (anti-IgG) de chèvre couplés au fluorochrome Alexa Fluor 647 (1/500, Molecular Probes) pour la gal-8 pendant 1h à température pièce. Les échantillons ont été montés sur des lames de verre avec le réactif *ProLong gold antifade* en présence de 4'-6-diamino-2-phenylindole (DAPI, Molecular Probes). Les analyses ont été faites avec un microscope confocal Zeiss LSM780 (Carl Zeiss Microimaging, Thornwood, NY).

3.5 Immunobuvardage de type Western et réactifs

L'extraction des protéines totales s'est faite dans 40 à 75 µl de tampon RIPA (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) contenant un cocktail commercial d'inhibiteurs de protéases (ROCHE, Laval, Qc, Canada). Les échantillons ont ensuite été placés dans un bain de glace durant 30

min avec mélange par vortex toutes les 10 min. La période d'incubation s'est terminée par une centrifugation de 15 min à 15 000 x g.

Le surnageant contenant les protéines extraites a ensuite été récolté. Pour l'extraction des protéines cytoplasmiques et nucléaires, les cellules ont été solubilisées dans 100 µl du tampon de lyse par 20 µl d'échantillon cellulaire. Le tampon de lyse contenait 88,2% d'eau stérile, 9,8% (v/v) de tampon hypotonique de lyse, 1% (v/v) de dithiothreitol 0,1M (DTT) et 1% (v/v) d'inhibiteurs de protéases. Après une incubation de 15 min dans un bain de glace et 5 sec de vortex, il y a eu ajout de 0,6% (v/v) d'octylphenoxy poly(ethyleneoxy)ethanol (IGEPAL) suivi de 10 sec de vortex afin d'obtenir la fraction cytoplasmique. La fraction nucléaire a été obtenue après l'ajout de 15 µl de tampon d'extraction nucléaire par 20 µl d'échantillon cellulaire et 30 min d'incubation à 4°C sous agitation constante se terminant par une centrifugation de 30 sec à 15 300 x g. Le tampon d'extraction nucléaire était constitué de 98% du tampon d'extraction 1X, 1% (v/v) de DTT 0,1M et 1% (v/v) d'inhibiteurs de protéase. Les réactifs provenaient tous du « *CellLytic NuCLEAR Extraction Kit* » (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada).

À la suite des deux types d'extractions protéiques, des quantités égales de protéines (50 µg) ont été séparées par SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) et transférées sur une membrane de *polyvinylidene difluoride* (PVDF, Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada). Les membranes de PVDF ont été prétraitées durant 1 min dans du méthanol suivi d'une autre minute dans l'eau et de 15 min dans le tampon de transfert. Les membranes ont été bloquées avec du lait 5% (v/v) dans du PBS/0,05% (v/v) Tween 20 (Sigma-Aldrich) pendant 1h et ont ensuite été incubées 16 h à 4°C avec les anticorps primaires spécifiques pour la gal-8 (1:2000, Abcam), un anticorps monoclonal de lapin contre la β -tubuline humaine (1:1000, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, États-Unis), un anticorps monoclonal de souris contre la lamine A/C humaine (1:2000, Cell Signaling Technology Inc.) ou contre la β -actine (1 :10 000, Sigma-Aldrich). Les anticorps spécifiques ont été dilués dans une solution d'albumine de sérum bovin (*bovine serum albumin* ou BSA) 3% (v/v) (MP Biomedicals, Illkirch-Graffenstaden, France) dans du PBS avec 0,02% (v/v) d'azide de sodium (Sigma-Aldrich). Les membranes ont ensuite été incubées avec des anticorps secondaires anti-souris (1/10 000, GE Healthcare Life Sciences, Mississauga, ON, Canada) et anti-rat (1/10 000, GE Healthcare Life Sciences) en fonction de l'anticorps primaire durant 1h à température pièce. Les membranes ont finalement été incubées pendant 1 min à température pièce dans des réactifs de détection à chimioluminescence améliorée (GE Healthcare Life Sciences). Entre chaque

étape, les membranes ont été rincées trois fois 5 min dans une solution de PBS/0,05% (v/v) Tween 20 (Sigma-Aldrich). Les résultats ont été analysés par densitométrie avec le logiciel Image J.

3.6 Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques faites pour l'analyse des résultats sont des tests de *Student* complétés avec le logiciel GraphPad en ligne (www.graphpad.com). Le nombre d'échantillons par analyses est variable et précisé dans la légende des figures.

CHAPITRE 4 : RÉSULTATS

4.1 Expression transcriptionnelle de *Igals8* dans des lignées cellulaires de cancer du sein.

Afin de mieux connaître l'expression de gal-8 dans les cellules de cancer du sein, nous avons utilisé un panel de lignées cellulaires de cancer du sein humain ayant différentes caractéristiques et plus ou moins représentatives de différents sous-types moléculaires (tableau 4.1). Dans un premier temps, nous avons examiné l'expression du gène *Igals8* par RT-PCR.

Lignées cellulaire	Sous-type moléculaire	Profil immunologique	Prévalence (%)
MCF7 et T47D	Luminal A	ER ⁺ , PR ^{+/-} , HER2 ⁻	74
MDA-MB-468 MDA-MB-231 Hs578t	Triple négatif	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁻	11
SKBR3	HER-2 enrichie	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁺	5

Tableau 4.1 : Descriptions des lignées cellulaires de cancer du sein analysées. Résultats tirés des travaux de Mota et coll. (2017) et de Fallahpour et coll., (2017). *ER*: Récepteur de l'estrogène ou Estrogen receptor, *PR*: Récepteur de la progestérone ou Progesteron receptor, *HER-2*: Human epidermal receptor-2.

Nos analyses ont démontré une expression de deux isoformes de *Igals8*, à savoir l'isoforme long et l'isoforme moyen, et ce pour les six lignées cellulaires testées (figure 4.1 panneau supérieur). Les niveaux d'expression varient en fonction de la lignée cellulaire et de l'isoforme. La lignée cellulaire MCF7 montre que 38% de son expression totale de *Igals8* est sous la forme de l'isoforme long et 62% est sous la forme de l'isoforme moyen. La lignée MDA-MB-468 présente une moyenne d'expression de 53% et de 47% respectivement pour l'isoforme long et moyen alors que la lignée MDA-MB-231 exprime en moyenne 83% d'isoforme long pour seulement 17% d'isoforme moyen. SKBR3 présente un profil moyen inverse avec 16% d'isoforme long pour 84% d'isoforme moyen. Ensuite, les lignées Hs578t ainsi que T47D présentent un profil d'expression totale de la *Igals8* similaire : respectivement 16% et 24% sous la forme du plus long transcrit alors que 84% et 76% de cette expression est sous la forme du transcrit moyen.

La différence entre les pourcentages d'expression de l'isoforme long par rapport à l'isoforme moyen est significative ($p < 0,05$) pour l'ensemble des lignées cellulaires (figure 4.1 panneau inférieur). Bien que tous les profils présentent des différences significatives ($p < 0,05$), ces résultats montrent trois profils d'expression différents : un premier avec des pourcentages similaires d'expression des deux isoformes (MCF7 et MDA-MB-468), un deuxième montrant une expression supérieure de l'isoforme long par rapport au moyen (MDA-MB-231) et un troisième où l'expression de l'isoforme moyen est supérieur à celle de l'isoforme long (SKBR3, Hs578t et T47D) (figure 4.1).

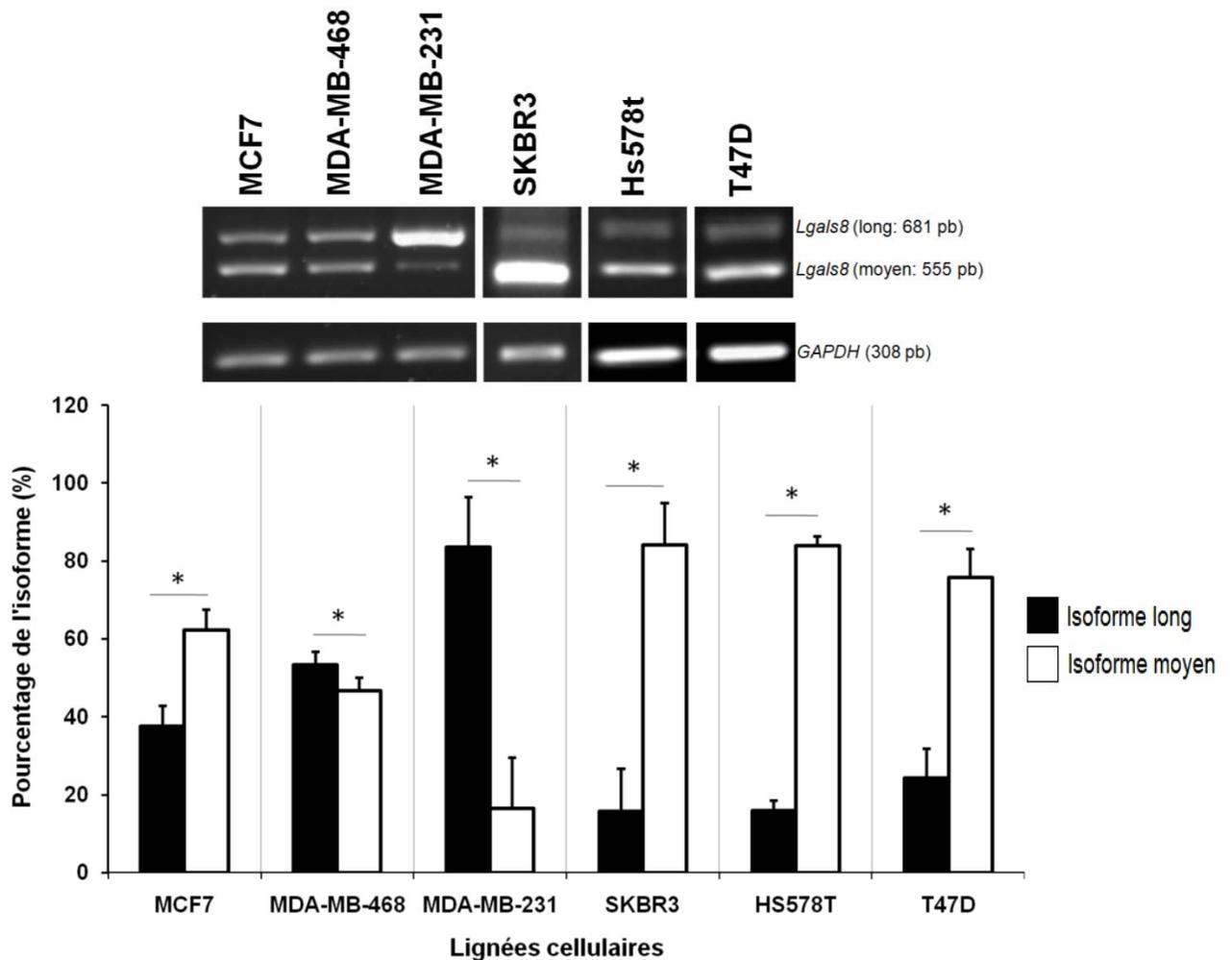


Figure 4.1 : Expression transcriptionnelle des isoformes de *Igals8* dans six lignées cellulaires de cancer du sein. Panneau supérieur : L'expression de *Igals8* a été effectuée par les méthodes standards de RT-PCR suivi d'une électrophorèse sur gel d'agarose telles que décrites dans la méthodologie. L'expression du *GAPDH* a été utilisée comme témoin. Panneau inférieur : Pour chacune des lignées cellulaires, les valeurs densitométriques (Image J) de l'expression de *Igals8* totale ont été rationalisées en fonction des deux isoformes et transformées en pourcentage. Test de *Student* (MCF7, MDA-MB-468, MDA-MB-231, SKBR3 : 5N, HS578T : 3N et T47D : 6N) * $p < 0,05$.

4.2 Expression protéique de la gal-8 dans des lignées cellulaires de cancer du sein.

Afin de corrélérer les niveaux d'expression des ARNm avec celui des protéines, nous avons réalisé une série d'analyses par immunobuvardage de type western en utilisant un anticorps anti-gal-8 dont la spécificité a été validée dans une étude précédente de notre laboratoire (Labrie et al., 2017). Nos résultats mettent en évidence l'expression de deux isoformes protéiques, un isoforme long et un isoforme moyen, pour les cinq lignées cellulaires de cancer du sein testées. L'analyse réalisée à partir des extraits nucléaires et cytosoliques démontre que les deux isoformes sont présents dans ces compartiments cellulaires. De plus, le ratio entre les isoformes moyens et longs ne varie pas en fonction du compartiment. Le profil d'expression des isoformes de la gal-8 pour la lignée MDA-MB-468 est particulier par rapport aux autres puisqu'il est le seul à être significativement différent ($p < 0,05$) lorsque l'on compare les ratios entre le compartiment cytoplasmique et nucléaire. Pour cette même lignée, l'expression d'un isoforme par rapport à l'autre dans les fractions nucléaires et cytoplasmique est aussi significativement différente ($p < 0,05$). L'expression de la gal-8 totale pour la lignée MCF7 présente aussi un profil distinct des autres lignées cellulaires testées, car au contraire de MDA-MB-468, il n'y a pas de différence significative ($p > 0,05$) entre les pourcentages d'expression des deux isoformes dans les deux compartiments cellulaires. Respectivement pour les compartiments cytoplasmique et nucléaire, il y a 41% et 55% pour l'isoforme long et 59% et 45% pour l'isoforme moyen. Pour la lignée MDA-MB-468, dans le compartiment cytoplasmique l'expression totale de la gal-8 est de 63% pour l'isoforme long et de 37% pour l'isoforme moyen alors que dans le noyau, il y a 85% de la forme longue pour 16% de la forme moyenne. Les trois dernières lignées cellulaires montrent un profil d'expression avec un écart significatif ($p < 0,05$) d'expression entre les deux isoformes d'un même compartiment sans différence significative ($p > 0,05$) entre les deux compartiments. Respectivement pour les lignées MDA-MB-231, SKBR3 et T47D et pour les isoformes longs/moyens, les pourcentages d'expressions sont de 97/3 (%), 98/2 (%) et 88/12 (%) pour la gal-8 cytoplasmique et de 94/6 (%), 93/7 (%), 70/30% pour la gal-8 nucléaire.

L'analyse comparative des résultats de l'expression transcriptionnelle (figure 4.1) et protéique (figure 4.2.1) de gal-8 démontre qu'il y a une différence entre ce qui est transcrit et traduit, parce que pour une même lignée cellulaire, les ratios ne sont pas les mêmes. Cette conclusion est notamment basée sur les profils obtenus avec SKBR3. Bien que ces cellules expriment de très

hauts niveaux d'ARNm de l'isoforme long, celui-ci est indétectable au niveau protéique, à l'inverse de ce qu'on observe pour l'isoforme moyen. Il en est de même pour la lignée cellulaire T47D. Dans d'autres cas, comme MCF-7 et MDA-MB-468, les ratios entre les isoformes aux niveaux protéiques et d'ARNm sont similaires. Il en est de même pour la lignée MDA-MB-231. Dans l'ensemble, ces résultats démontrent que : 1) le répertoire d'isoformes de gal-8 varie d'une lignée cellulaire à l'autre, 2) que la localisation intracellulaire de la gal-8 n'est pas dépendante de l'épissage alternatif des isoformes de *lgals8*, et 3) qu'il n'existe pas de corrélation entre les niveaux d'ARNm et protéiques pour la gal-8.

Afin de mieux étudier la localisation de la gal-8 intracellulaire, nous avons par la suite procédé à des analyses par microscopie confocale sur les diverses lignées de cancer du sein. Dans l'ensemble, et ce pour les quatre lignées cellulaires analysées avec imagerie confocale, les résultats en microscopie confirment une distribution cytoplasmique et nucléaire de la gal-8. Résultats aussi observés en immunobuvardage (figure 4.2.2). Les distributions cytoplasmiques sont plus intenses que les distributions nucléaires, bien que la délimitation des nucléoles confirme une distribution nucléaire. L'intensité du marquage est plus élevée au niveau péri-nucléaire pour certaines cellules des lignées cellulaires MCF7, MDA-MB-468 et MDA-MB-231 et plus forte dans la zone péri-membranaire des cellules de la lignée cellulaire SKBR3 (figure 4.2.2). Ces résultats avec MDA-MB-231 et SKBR3 supportent notre conclusion précédente que l'épissage alternatif ne semble pas avoir d'impact sur la distribution intracellulaire de la gal-8.

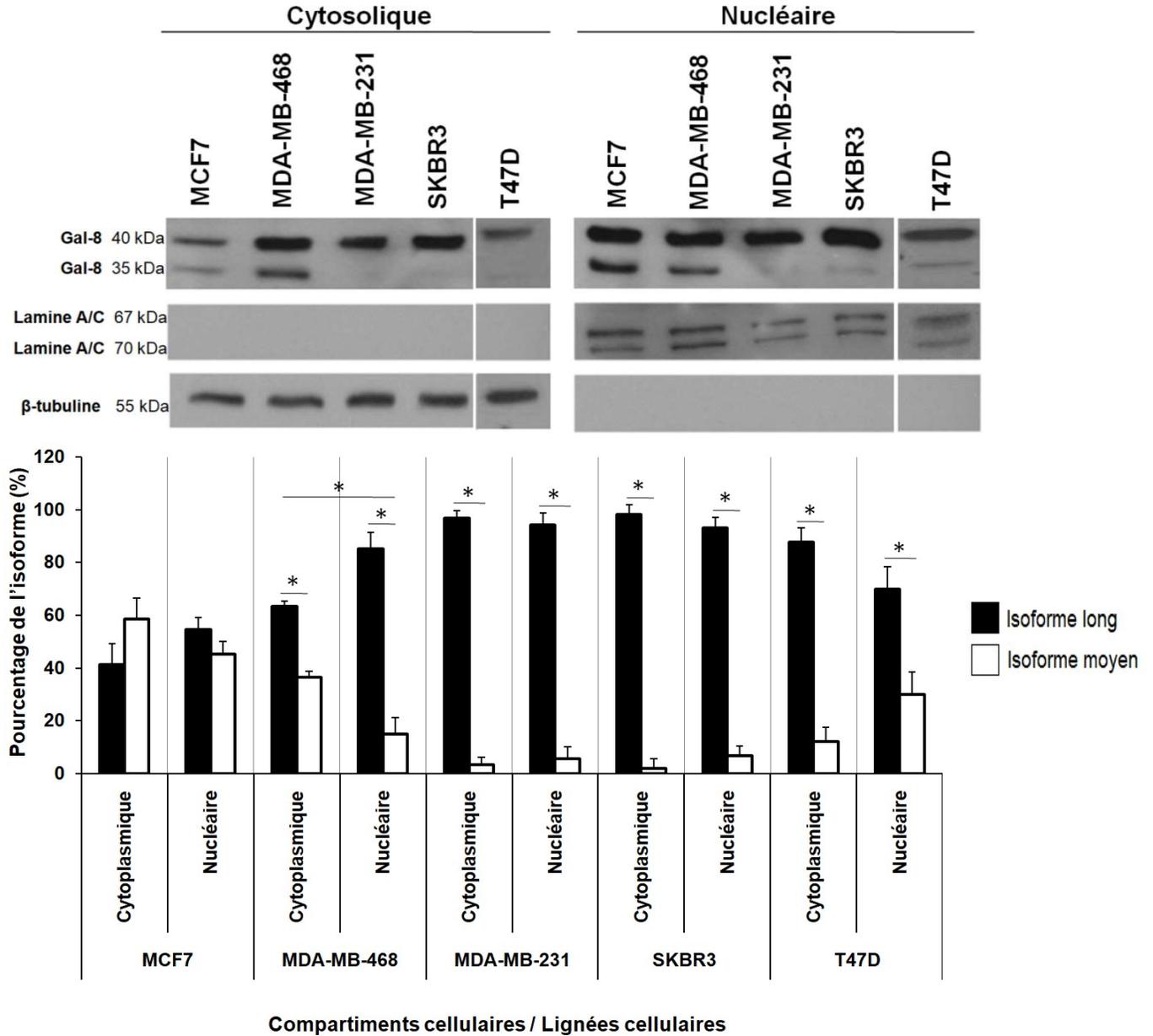


Figure 4.2.1 : Expression protéique des isoformes de la gal-8 dans six lignées cellulaires de cancer du sein. Panneau supérieur : L'expression de la gal-8 a été effectuée par les méthodes standards d'extraction protéique cytoplasmique et nucléaire suivie d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide telles que décrites dans la section Matériel et méthode. L'expression de la β -tubuline a été utilisée comme témoin de la fraction cytoplasmique et l'expression de la lamine A/C pour la fraction nucléaire. Panneau inférieur : Pour chacune des lignées cellulaires, les valeurs densitométriques (par Image J) de l'expression protéique de la gal-8 totale ont été rapportées en fonction des deux isoformes et transformées en pourcentage. Test de *Student* (MCF7, MDA-MB-468, MDA-MB-231, T47D : 3N, SKBR3 : 4N) * $p < 0,05$.

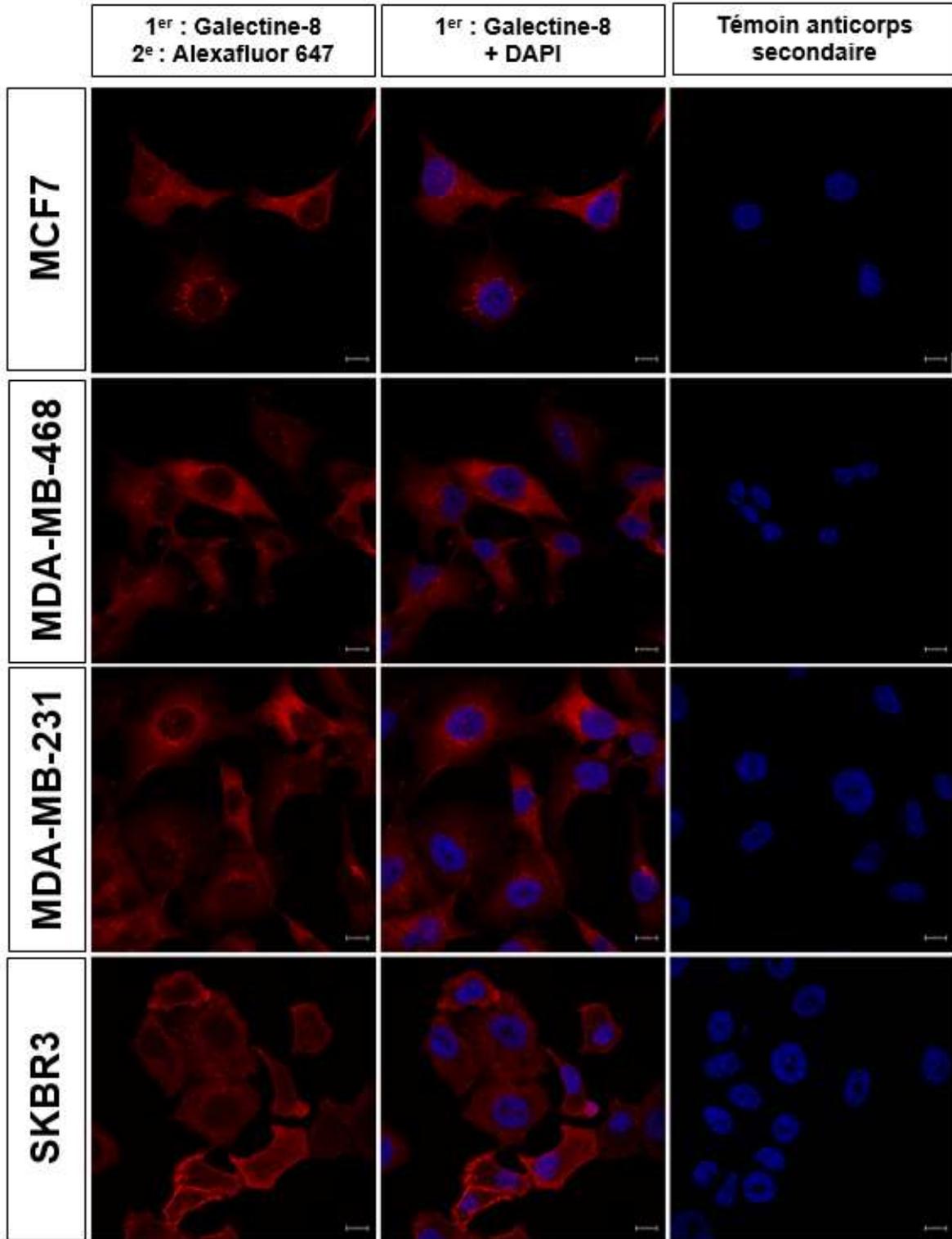


Figure 4.2.2 : Expression protéique de la gal-8 dans quatre lignées cellulaires de cancer du sein. Le marquage intracellulaire de la gal-8 a été effectué par immunofluorescence. Les analyses ont été faites avec un microscope à laser Zeiss LSM780 et les images ont été préparé via le logiciel Zen 2.3 lite. Les barres blanches (coin inférieur droit) représentent 10 μ m.

4.3 Modulation de l'expression transcriptionnelle de *Igals8* dans des lignées cellulaires de cancer du sein en fonction de la densité cellulaire.

Des études précédentes ont suggéré que la densité cellulaire pourrait jouer un rôle sur l'expression de gal-8. Afin de déterminer si la densité cellulaire peut moduler l'expression transcriptionnelle de *Igals8*, nous avons procédé à des analyses Rt-PCR sur quatre des lignées cellulaires, soit les lignées MCF7, MDA-MB-468, MDA-MB-231 et T47D (figures 4.3.1.1 à 4.3.1.4). Les lignées cellulaires ont été mises en culture jusqu'à l'obtention d'une densité cellulaire inférieure à 100 000 cellules/cm² ou supérieure à 300 000 cellules/cm². Les résultats rapportés aux figures 4.3.1.1, 4.3.1.3 et 4.3.1.4 montrent, dans certains cas, une modulation significative ($p < 0,05$) du profil d'expression des deux isoformes de *Igals8* en fonction de la densité cellulaire. Par exemple, la lignée cellulaire MCF7, lorsque tenue en culture à basse confluence (<100 000 cellules/cm²), montre une expression des isoformes de *Igals8* à 23% pour l'isoforme long et à 77% pour l'isoforme moyen, alors que lorsque les cellules sont récoltées à forte confluence (>300 000 cellules/cm²), il y a une différence significative ($p < 0,05$) entre le pourcentage de ces isoformes : soit 13% pour l'isoforme long et 87% pour l'isoforme moyen (figure 4.3.1.1). La lignée cellulaire MDA-MB-468 est la seule des lignées analysées à ne pas montrer une telle modulation. En effet, il n'y a pas de différence significative entre les pourcentages d'expression des isoformes retrouvés après extraction sous basse ou forte confluence cellulaire (figure 4.3.1.2).

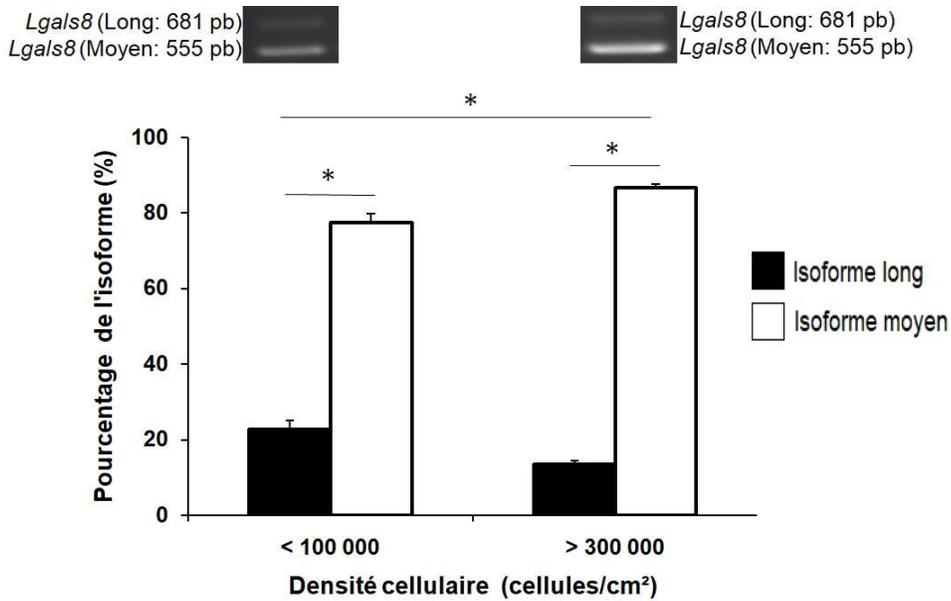


Figure 4.3.1.1 : Modulation de l'expression transcriptionnelle des isoformes de *lgals8* en fonction de la densité cellulaire pour la lignée cellulaire MCF7. Panneau supérieur : L'expression de *lgals8* a été mesurée par RT-PCR conventionnel. Panneau inférieur : Les valeurs densitométriques (par Image J) de l'expression de *lgals8* total ont été rationalisées en fonction des deux isoformes et transformées en pourcentage. Test de *Student* (<100 000 cellules/cm² : 4N, >300 000 cellules/cm² : 3N) * $p < 0,05$.

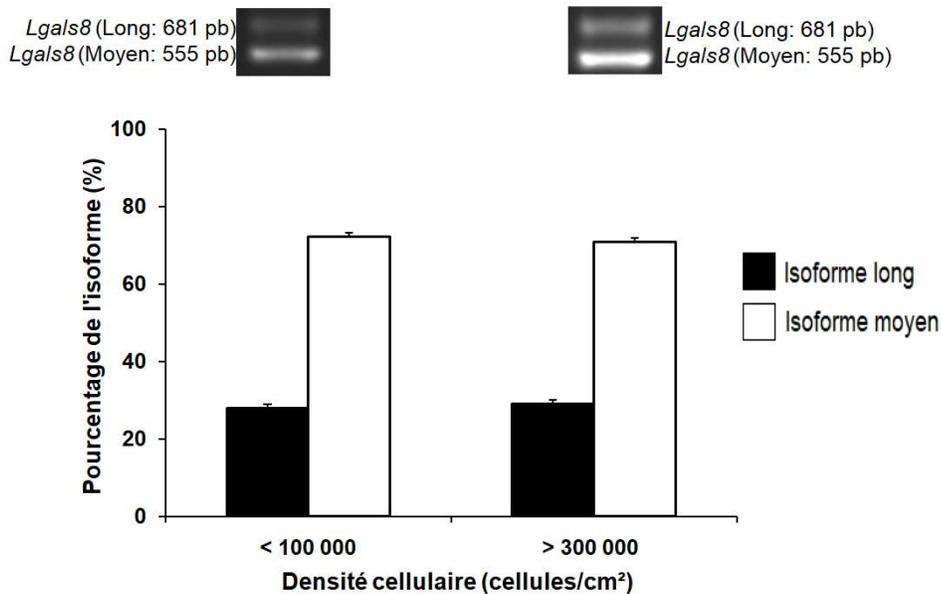


Figure 4.3.1.2 : Modulation de l'expression transcriptionnelle des isoformes de *lgals8* en fonction de la densité cellulaire pour la lignée cellulaire MDA-MB-468. Panneau supérieur : L'expression de *lgals8* a été mesurée par RT-PCR conventionnel. Panneau inférieur : Les valeurs densitométriques (par Image J) de l'expression de *lgals8* total ont été rationalisées en fonction des deux isoformes et transformées en pourcentage. Test de *Student* (<100 000 cellules/cm² et >300 000 cellules/cm² : 3N) * $p < 0,05$.

À l'inverse des lignées MCF7 et MDA-MB-468, la lignée cellulaire MDA-MB-231 montre une inversion du profil d'expression de *Igals8* en fonction de la densité cellulaire. À basse confluence, le pourcentage de l'isoforme long et du moyen sont de 68% et 32% alors qu'à forte confluence, l'isoforme long ne représente que 15% pour 85% d'isoforme moyen (figure 4.3.1.3). La densité cellulaire a aussi un effet significatif ($p < 0,05$) sur l'expression des isoformes de *Igals8* pour la lignée T47D : les résultats indiquent qu'à plus faible confluence, 31% de l'expression du gène est sous la forme de l'isoforme long et 69% sous la forme du transcrit moyen alors qu'à forte confluence, ces mêmes isoformes sont représentés à 18% et 82% (figure 4.3.1.4).

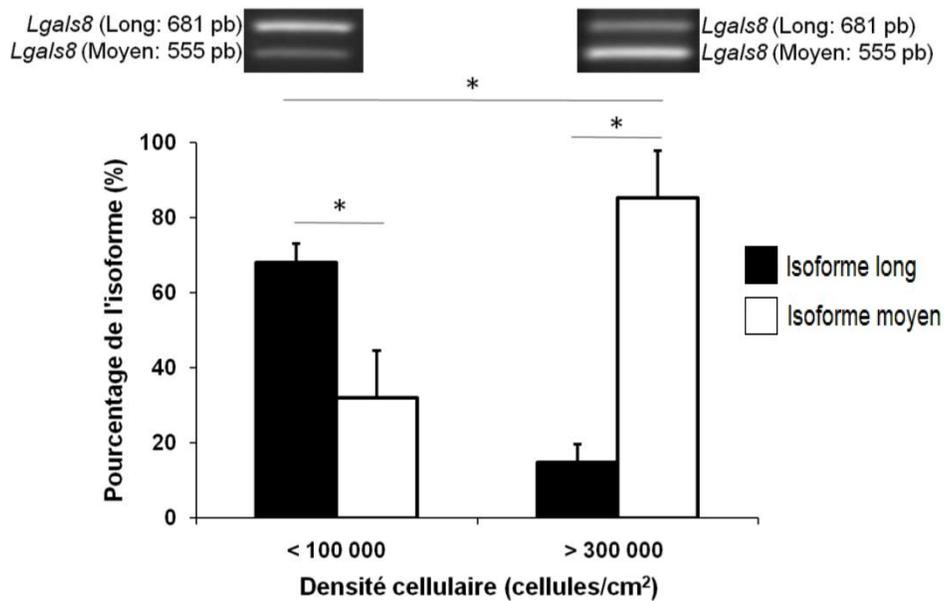


Figure 4.3.1.3 : Modulation de l'expression transcriptionnelle des isoformes de *Igals8* en fonction de la densité cellulaire pour la lignée cellulaire MDA-MB-231. Panneau supérieur : L'expression de *Igals8* a été mesurée par RT-PCR conventionnel. Panneau inférieur : Les valeurs densitométriques (par Image J) de l'expression de *Igals8* total ont été rationalisées en fonction des deux isoformes et transformées en pourcentage. Test de *Student* (<100 000 cellules/cm² : 9N et >300 000 cellules/cm² : 7N) * $p < 0,05$.

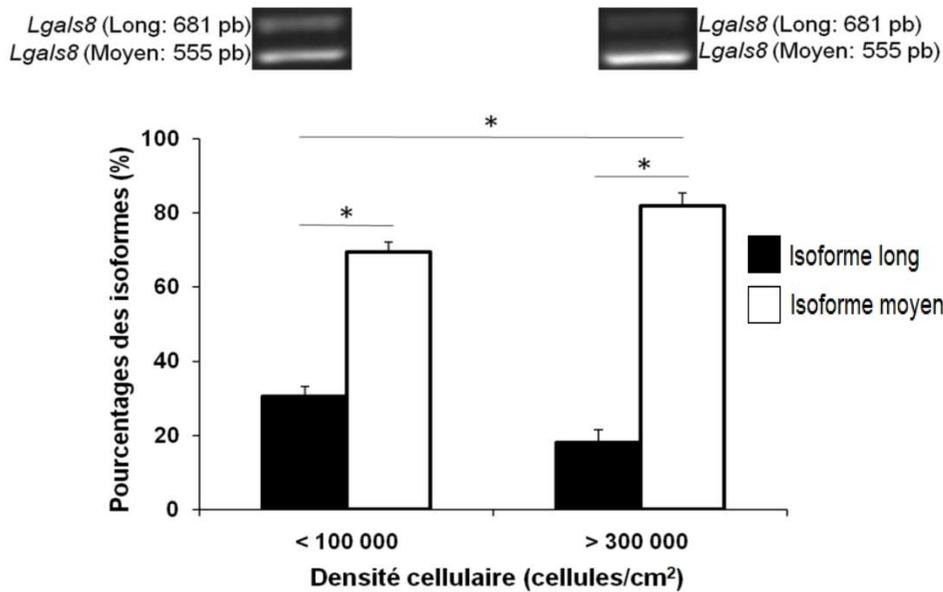


Figure 4.3.1.4 : Modulation de l'expression transcriptionnelle des isoformes de *Igals8* en fonction de la densité cellulaire pour la lignée cellulaire T47D. Panneau supérieur : L'expression de *Igals8* a été mesurée par RT-PCR conventionnel. Panneau inférieur : Les valeurs densitométriques (par Image J) de l'expression de *Igals8* total ont été rationalisées en fonction des deux isoformes et transformées en pourcentage. Test de *Student* (<100 000 cellules/cm² et >300 000 cellules/cm² : 3N) **p*<0,05.

4.4 Modulation de la densité cellulaire et de l'expression transcriptionnelle de *Igals8* dans la lignée cellulaire de cancer du sein MDA-MB-231 en fonction de la concentration de gal-7RH.

Ensuite, nous avons poursuivi les analyses avec le traitement de la lignée cellulaire MDA-MB-231 avec différentes concentrations de gal-7RH pour vérifier si d'autres voies de signalisation sont impliquées dans la modulation de l'expression des isoformes de *Igals8* et son impact sur la densité cellulaire (figure 4.4.1 et 4.4.2). *In vivo*, la gal-7 est connue pour induire l'activation de nombreuse voie de signalisation cellulaire (Guo et al., 2017; Luo et al., 2018; Park et al., 2009) et de réguler l'expression de gènes codant pour les gals (Bibens-Laulan et al., 2017). Afin de déterminer l'effet de l'exposition à la gal-7, les cellules de MDA-MB-231 ont d'abord été traitées avec des concentrations de 1, 5 et 25 μ M de gal-7 recombinante humaine (gal-7RH) pendant 96 heures avant d'être comptées et analysées par Rt-PCR. Les résultats montrent qu'en présence d'une concentration supérieure à 5 μ M gal-7RH, il y a une diminution légère, mais statistiquement significative (*p*<0,05) de la densité cellulaire chez MDA-MB-231 (figure 4.4.1). Les analyses transcriptionnelles montrent que l'expression de *Igals8* totale est significativement

($p < 0,05$) augmentée en présence d'1 μM de gal-7RH et plus, lorsque comparée au groupe témoin (figure 4.4.2 panneau inférieur de gauche). Les résultats montrent aussi qu'en présence d'une concentration supérieure à 5 μM de gal-7RH, il y a une augmentation significative ($p < 0,05$) de l'expression du transcrite moyen par rapport au long lorsque comparé aux résultats des échantillons témoins (figure 4.4.2 panneau supérieur et inférieur de droite).

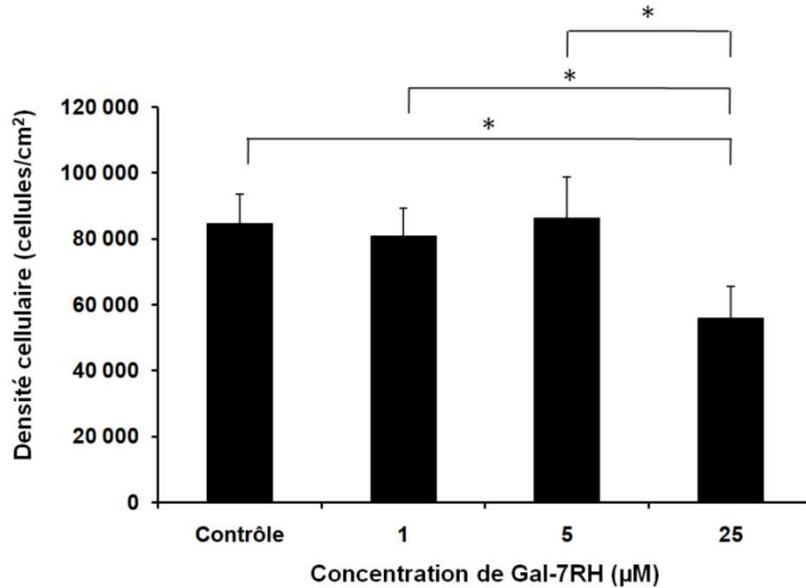


Figure 4.4.1 : Modulation de la densité cellulaire de la lignée cellulaire MDA-MB-231 en fonction de la concentration de gal-7RH. La densité cellulaire a été obtenue par décompte avec un hémacymètre. Test de *Student* (Contrôle, 1 et 5 μM : 5N et 25 μM : 3N) * $p < 0,05$.

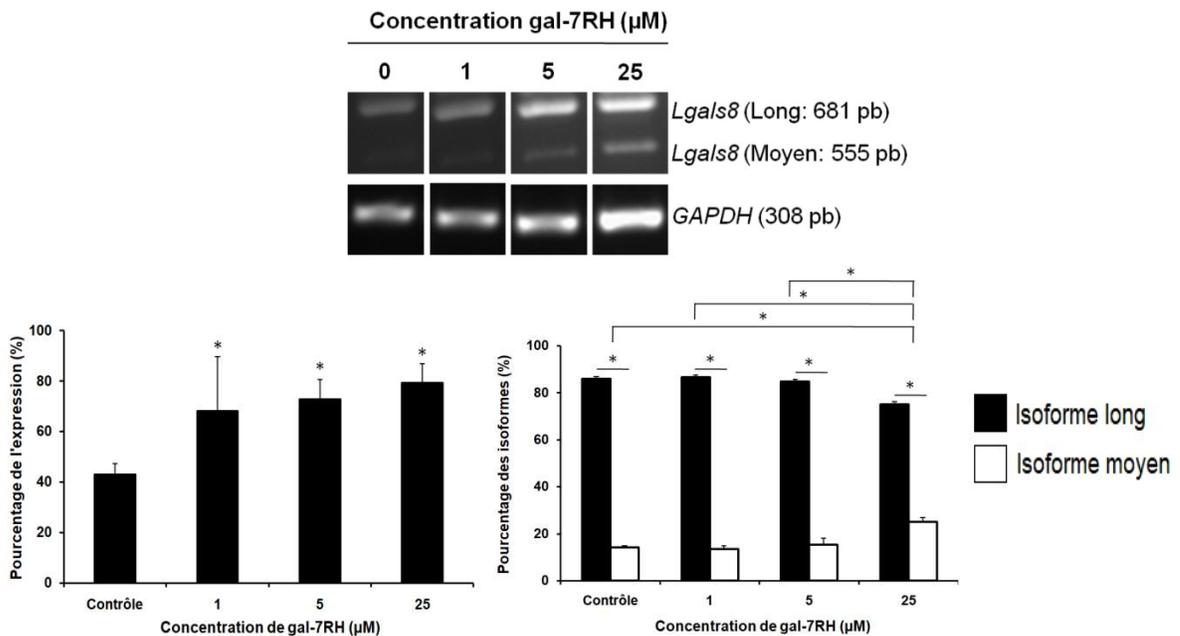


Figure 4.4.2 : Modulation de l'expression transcriptionnelle des isoformes de *Igals8* dans la lignée cellulaire MDA-MB-231 en fonction de la concentration de gal-7RH. Panneau supérieur : L'expression

de *Igals8* a été effectuée par les méthodes standards de RT-PCR suivi d'une électrophorèse sur gel d'agarose telles que décrites dans la méthodologie. Panneau inférieur gauche : Les valeurs densitométriques (Image J) de l'expression de *Igals8* total ont été rationalisées en fonction de l'expression du *GAPDH* et transformées en pourcentage en fonction de la plus haute valeur. Panneau inférieur droit : Les valeurs densitométriques de l'expression de *Igals8* total ont été rationalisées en fonction des deux isoformes et transformées en pourcentage. Test de *Student* (Contrôle, 1 et 5 μ M : 5N et 25 μ M : 3N) * p <0,05.

4.5 Modulation de l'expression protéique de la gal-8 en fonction de la densité cellulaire chez la lignée cellulaire MDA-MB-231.

Les analyses par immunobuvardage de type western ont montré l'expression d'un seul isoforme de gal-8, l'isoforme long (figure 4.5.1). Les résultats présentés à la figure 4.5.1 montrent une diminution non significative (p <0,05) de l'expression de l'isoforme long de la gal-8 en fonction de la densité cellulaire pour la lignée MDA-MB-231.

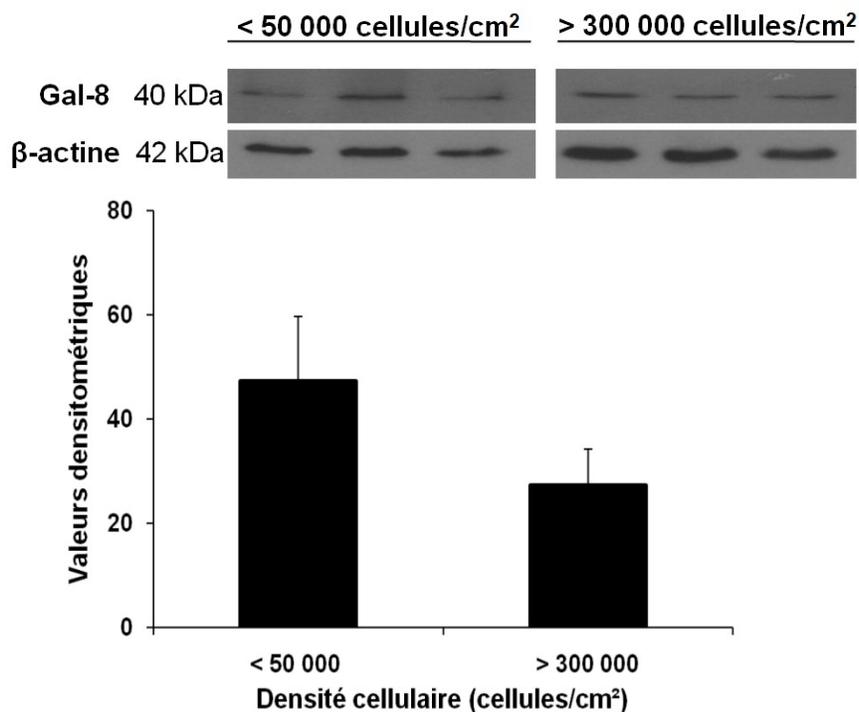


Figure 4.5.1 : Modulation de l'expression protéique de la gal-8 en fonction de la densité cellulaire pour la lignée cellulaire MDA-MB-231. Panneau supérieur : L'expression de la gal-8 a été effectuée par les méthodes standards d'extraction protéique totale suivie d'une électrophorèse sur gel d'acrylamide telles que décrites dans la méthodologie. L'expression de la β -actine a été utilisée comme témoin. Panneau inférieur : Les valeurs densitométriques (Image J) de l'expression protéique de la gal-8 totale ont été rationalisées en fonction de l'expression de la β -actine. Test de *Student* (<50 000 cellules/cm² et >300 000 cellules/cm² : 3N) * p <0,05.

CHAPITRE 5 : DISCUSSION ET CONCLUSION

5.1 Sommaire des résultats

Il n'y a que très peu d'article disponible à ce jour qui prennent en compte l'existence de l'épissage alternatif de *Igals8* pour l'analyse des résultats obtenus lors des recherches impliquant ce gène, ce qui laisse en suspens plusieurs questions concernant les fonctions individuelles de ces isoformes. Bien que nous n'ayons pas répondu aux questions de dynamique fonctionnelle, ce travail a permis d'augmenter nos connaissances sur le profil d'expression des isoformes de la gal-8 au niveau transcriptionnel et protéique dans plusieurs lignées cellulaires humaines de cancer du sein. Les lignées cellulaires de cancer du sein sont un modèle *in vitro* d'importance étant donné la corrélation entre le profil intracellulaire *in vivo* de la gal-8 et la survie des femmes atteintes d'un cancer du sein de sous-type moléculaire triple-négatif, le plus agressif des sous-types (Palma et al., 2015). Ainsi, nous avons mis en évidence 1) l'existence de deux isoformes de gal-8 au niveau transcriptionnel et protéique dans les lignées cellulaires MCF7, MDA-MB-468, MDA-MB-231, SKBR3, T47D et Hs578t, 2) la variabilité de ces profils d'expression en fonction de la lignée cellulaire, puisque chaque lignée cellulaire présentant un pourcentage d'isoformes distinct, 3) l'invariabilité du profil d'expression protéique en fonction du compartiment intracellulaire, puisque le pourcentage des isoformes est le même dans le compartiment cytoplasmique et celui nucléaire pour une même lignée cellulaire, et 4) la modulation du profil d'expression transcriptionnelle en faveur de l'isoforme moyen par la confluence en cas de densité cellulaire supérieure à 300 000 cellules/cm² et de l'ajout d'une concentration supérieure à 5 µM de gal-7RH pour les lignées cellulaires testées. Globalement, ces résultats nous ont permis d'en apprendre davantage sur la complexité de l'expression des isoformes de la gal-8 au niveau transcriptionnel et protéique et jettent les bases pour de futures études sur les mécanismes moléculaires qui régulent leurs expressions et fonctions.

5.2 Identification de deux isoformes de gal-8 au niveau transcriptionnel

Nos résultats nous ont permis de documenter pour la première fois l'expression des deux isoformes de *Igals8*, le moyen (*Igals8* 555 pb) et le long (*Igals8* 681 pb), pour six lignées cellulaires de cancer du sein au profil moléculaire distinct. L'observation de la gal-8 dans des lignées cellulaires de cancer du sein concorde avec celles de Bidon-Wagner et coll. (2002) voulant que l'expression de gal-8 soit fréquente dans les cellules de tissus mammaires sains et

tumoraux. La présence de plusieurs isoformes est due à l'épissage alternatif, un mécanisme omniprésent permettant l'expression de plusieurs ARNm à partir d'un même gène. *Lgals8* fait donc partie du 90 à 95% des gènes subissant ce type d'épissage à la base de la diversité du protéome (Baralle et al., 2017). Les isoformes moyens et longs observés dans la présente étude corrélaient avec les deux isoformes confirmés par le National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3964). Plus précisément, il existe quatre variants de *Lgals8* menant à deux transcrits traduits en deux protéines différentes par le lien peptidique reliant les deux CRD. La différence entre les variants d'un même isoforme au niveau de l'ARNm semble se situer dans leurs régions 5' UTR. Plusieurs possibilités peuvent expliquer pourquoi seulement deux isoformes transcriptionnels et protéiques ont été mis en évidence dans notre étude alors que certains auteurs, notamment Bidon-Wagner et coll. (2002), suggèrent l'existence de six isoformes potentiels. Voici quelques-unes de ces possibilités : 1) formation d'un transcrit non codant qui ne sera pas traduit en protéine, 2) altération de la stabilité menant à une dégradation précoce, et 3) délocalisation du transcrit menant à un défaut fonctionnel de celui-ci ou de la protéine en découlant. Toutefois, l'épissage alternatif n'est pas nécessairement le même d'un tissu à l'autre, puisque chaque type cellulaire peut avoir un patron d'épissage différent (Ronkainen et al., 2014). Dans le cas des lignées cellulaires utilisées dans le cadre de ce projet, nous avons eu recours au séquençage afin de confirmer la nature exacte des transcrits analysés pour les deux isoformes de *Lgals8* présentées à la figure 4.1, soit les isoformes long et moyen. De plus, la similarité inter-gal est aussi une possibilité pouvant expliquer la mention d'isoformes protéiques supplémentaires à ceux confirmés. Par exemple, notre laboratoire a récemment démontré que l'un des anticorps commerciaux ciblant la gal-14 reconnaît également les gal-1 et -7 (*résultats non publiés*).

Nos résultats ont démontré que les six lignées cellulaires utilisées expriment des niveaux variables des isoformes moyen et long de *Lgals8*. Cette observation concorde avec les résultats mis en ligne sur la base de données *Expression Atlas* (www.ebi.ac.uk/gxa/home) et basé sur le travail de Barretina et coll. (2012) voulant, d'une part, que ces lignées cellulaires expriment *Lgals8* et d'autre part, que le niveau d'expression du gène n'est pas le même d'une lignée à l'autre (annexe 1). En effet, en y sélectionnant les lignées cellulaires d'intérêts, il est possible de les classer selon leurs niveaux d'expression transcriptionnelle de *Lgals8* en ordre croissant, donnant la séquence suivante : Hs578t, MDA-MB-468, MDA-MB-231, T47D, MCF7 et SK-BR3 (Barretina et al., 2012). Cette classification appuie donc nos résultats voulant que les niveaux d'expression soient variables. Ensuite, les résultats de Curtis et coll. (2012) et de Pereira et coll.

(2016) montrent que pour 19,2% des échantillons de cancers du sein (481/2491) analysés, *Igals8* est amplifié (annexe 2; cbioportal.org). Finalement, pour les 20 différents types de cancer pour lesquelles l'expression de l'ARNm et de la protéine de gal-8 totale a été testée et recensée par immunohistochimie dans *The Human Protein Atlas*, une autre base de données d'importance, c'est le cancer du sein qui montre la plus forte expression cytoplasmique de gal-8 (annexe 3; proteinatlas.org). Ces résultats *in silico* appuient le recours aux lignées cellulaires de cancer du sein à titre de modèle d'étude pour la recherche sur la gal-8. Toutefois, tel que mentionné dans la problématique, ces résultats ne font pas de distinctions entre les deux isoformes existants, ne nous permettant pas de bien comparer nos résultats avec les leurs. Ainsi, à la figure 4.1, la comparaison graphique du pourcentage des isoformes est une première en ce qui concerne *Igals8* : l'isoforme moyen est significativement ($p < 0,05$) plus exprimé par rapport à l'isoforme long pour la majorité des lignées cellulaires présentées, soit MCF7, SKBR3, Hs578t et T47D. À l'inverse, dans les lignées cellulaires MDA-MB-468 et MDA-MB-231, l'isoforme long est exprimé significativement plus que l'isoforme moyen ($p < 0,05$). Toutefois, les lignées MCF7 ainsi que MDA-MB-468 ont un écart dans leurs pourcentages d'isoformes plus petit que les autres lignées. Il est important de prendre en compte l'existence de plusieurs isoformes lors des études concernant la gal-8, car l'implication de l'un ou l'autre des isoformes dans les nombreuses voies de signalisation qui lui sont associées est très peu détaillée. Par exemple, les trois isoformes de la gal-9, une autre gal du type « répétition en tandem », ont des fonctions biologiques différentes lors du développement cancéreux (Zhang et al., 2009). La précision quant à l'implication des isoformes de la gal-8 dans le développement du cancer du sein pourrait aider à la compréhension de l'hétérogénéité de cette maladie (Grosset et al., 2016).

5.3 Identification de deux isoformes de la gal-8 au niveau protéique

Nos résultats ont démontré une expression significativement supérieure ($p < 0,05$) pour l'isoforme long (40 kDa) dans les deux compartiments intracellulaires par rapport au moyen (35 kDa) pour les lignées MDA-MB-468, MDA-MB-231, SKBR3 et T47D alors que le pourcentage des isoformes de la lignée cellulaire MCF7 ne montre aucune différence significative ($p < 0,05$) tant dans le compartiment cytoplasmique que nucléaire. Ce n'était pas le résultat attendu étant donné les conclusions présentes dans la littérature voulant que l'isoforme long ait une prédisposition pour le clivage protéolytique. En effet, le site de clivage de la thrombine, -IAPRT-, se trouve dans la portion additionnelle du lien peptidique de l'isoforme long de la gal-8 et est

absent chez l'isoforme moyen (Nishi et al., 2006). C'est d'ailleurs le résultat que Metz et coll. (2016) ont obtenu : Aucune détection de l'isoforme long dans les extraits protéiques provenant d'une lignée cellulaire de glioblastome (U87). L'anticorps anti-gal-8 utilisé lors de cette étude n'est toutefois pas mentionné. Il semble donc que la thrombine n'ait pas d'influence sur le pool intracellulaire de la gal-8 dans les lignées de cancer du sein étudiées. Il est toutefois envisageable que le pool extracellulaire en soit affecté, bien que nous n'ayons pas été en mesure de détecter la gal-8 dans le milieu de culture après récolte des surnageants, même après lyophilisation et chromatographie d'affinité. Une autre méthode serait sans doute nécessaire pour valider ce résultat négatif obtenu par chromatographie, tel que l'ELISA ou encore par la cytométrie en flux puisqu'il est possible que la gal-8 sécrétée se fixe rapidement sur les glycorécepteurs de la cellule.

En accord avec nos résultats, une étude concernant la complexité du protéome par rapport à l'épissage alternatif met en évidence que dans 89,6 % des gènes subissant ce type d'épissage, c'est l'isoforme long qui est dominant, c'est-à-dire minimalement cinq fois supérieur, au niveau de la protéine (Gonzalez-Porta et al., 2013). Puisqu'il n'y a pas encore d'explication concernant cette dominance des isoformes plus long par rapport aux autres, il serait intéressant de savoir si ce phénomène est associé à une fonction en particulier dans la biologie du cancer pour la gal-8. Finalement, la lignée MDA-MB-468 présente aussi une particularité, puisqu'il s'agit de la seule lignée cellulaire étudiée montrant une augmentation significative de l'isoforme long nucléaire par rapport au cytoplasmique (figure 4.2.1). Ces résultats sont ainsi en accord avec la littérature indiquant que le cancer du sein est une maladie très hétérogène (Grosset et al., 2016). En effet, tout comme la lignée MDA-MB-468, les lignées MDA-MB-231 et Hs578t sont aussi du sous-type triple-négatif, mais ne présente pas cette particularité (figure 4.2.1).

Nos résultats de localisation intracellulaire, cytoplasmique et nucléaire de gal-8 concordent avec notre hypothèse de départ. En effet, l'étude de Grosset et coll. (2016) démontre une expression dans ces deux compartiments. Selon cette même étude, l'expression de la gal-8 est soit restreinte au cytoplasme ou partagée entre ce dernier et le noyau, ce qui explique la plus grande intensité de signal cytoplasmique observable par imagerie confocale par rapport au signal nucléaire (figure 4.2.2). En effet, la distribution de la gal-8 est estimée à 70% cytoplasmique, 17% nucléaire, 9% mitochondriale et 4% pour le réticulum endoplasmique (Vladoiu et al., 2014). La distribution subcellulaire de la gal-8 visible par imagerie confocale montre aussi une variation dans l'intensité des résultats entre les lignées cellulaires, conclusion concordant avec les résultats transcriptionnels. À titre de comparaison, les résultats d'imagerie

confocale obtenus par Fernandez et coll. (2016) montrent des signaux de gal-8 cytoplasmique très évidents pour les lignées cellulaires MCF7 et MDA-MB-231 et une présence nucléaire moins évidente que ceux que nous avons observés (figure 4.2.2). Toutefois, ces auteurs n'ont pas utilisé le même couple anticorps primaires-secondaires (R&D Systems et Alexa fluor 555) que pour notre étude (ABCAM et Alexa Fluor 647) (Fernandez et al., 2016), une différence notoire considérant les problèmes de spécificité des anticorps contre les gals.

Alors que la distribution cytoplasmique est associée à des rôles d'adhésion, de migration et de signalisation, les fonctions nucléaires des gals sont reliées à la progression du cycle cellulaire (Viguié et al., 2014). Viguié et coll. (2014) soulignent que la localisation cytoplasmique ou nucléaire peut varier drastiquement en fonction de l'état de différenciation cellulaire des cellules de certains cancers en progression. Ainsi, l'ajout de plusieurs marqueurs de compartiment et la discrimination des résultats en fonction du stade cellulaire sont des perspectives tout à fait pertinentes. Par rapport à cela, il est possible que les cellules se divisant le moins présente plus de gal-8 nucléaire. Cela pourrait alors expliquer pourquoi les cellules en culture qui se divisent le plus sont associées avec des taux de survie plus faible. Cette hypothèse peut être soutenue par nos résultats montrant une modification du ratio des isoformes en faveur de l'isoforme moyen, lorsque les lignées cellulaires sont amenées à une densité de plus de 300 000 cellules/cm² (section 4.3.1). Les variations présentes entre les nombreuses études reliant la gal-8 aux cancers du sein concordent aussi avec l'étude de Grosset et coll. (2016) indiquant que les différents profils d'expression des gals contribuent à l'hétérogénéité des cancers du sein.

En perspectives, il serait intéressant d'avoir recours aux *nanobodies*, des immunoglobulines à un seul domaine produit chez les camélidés, spécifiques à la portion supplémentaire de l'isoforme long, pour les tests tels que l'imagerie confocale et l'immunohistochimie. Ces immunoglobulines spécifiques nous permettraient d'élargir notre répertoire de résultats *in vitro*, tout en augmentant la spécificité des résultats de ratio des isoformes long et moyen pour chacune des lignées cellulaires (Desmyter et al., 2015). Les avantages de ce type d'anticorps sont leurs faibles tailles et leurs régions CRD-3 prolongés. Ces deux caractéristiques leurs permettent d'avoir accès à des épitopes normalement peu accessibles, tels que le lien peptidique qui distingue les isoformes dans le cas de la gal-8 (Van Audenhove et al., 2016). De plus, il serait pertinent d'en apprendre plus sur le profil d'expression des isoformes de la gal-8 dans le milieu extracellulaire, car il a été confirmé par Fernandez et coll. (2016) via

immunobuvardage de type Western qu'au moins une de nos lignées cellulaires, la lignée MDA-MB-231, sécrète de la gal-8 dans son milieu extracellulaire.

5.4 Variabilité du profil d'expression des isoformes en fonction de la lignée cellulaire

Nos résultats ont permis de mettre en évidence la variabilité du profil d'expression tant transcriptionnelle que protéique de la gal-8 en fonction de la lignée cellulaire étudiée. Au niveau transcriptionnel, quatre lignées cellulaires sur six montrent une expression de l'isoforme moyen significativement supérieure ($p < 0,05$) par rapport à l'isoforme long et un résultat inverse pour les deux autres lignées cellulaires (MCF7 et MDA-MB-468). Au niveau protéique, la majorité des lignées cellulaires étudiées expriment significativement plus d'isoformes longs que de moyen dans les deux compartiments intracellulaires à l'exception de la lignée MCF7 qui ne présente pas de différence. La discordance entre les résultats au niveau de l'ARNm et de la protéine pour une même lignée cellulaire et ce pour plusieurs lignées, sous-entendent des modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles d'importance. Au niveau de la protéine, plusieurs éléments peuvent influencer la présence d'un isoforme par rapport à l'autre tel que la stabilité de l'ARNm influençant son rythme de traduction ou la stabilité de la protéine influençant sa détection. Par exemple, la protéine p53 a une demi-vie d'environ 10 à 20 min, ce qui rend sa détection plus difficile (Cadwell et al., 2001; Giaccia et al., 1998; Ronkainen et al., 2014). En lien avec cette donnée, et puisqu'il n'y a pas de données concernant la demi-vie de la gal-8, nous ne pouvons exclure la possibilité que l'un ou l'autre des isoformes soit dégradé plus rapidement que l'autre. Encore, il est possible que certaines protéines chaperonnes, telles que les protéines de choc thermique (*heat shock protein* ou HSP), qui sont impliquées dans presque tous les processus cellulaires, aient une affinité plus forte pour un isoforme plutôt que l'autre dans certains cas pathologiques comme le cancer du sein qui nous intéresse ici (Locatelli et al., 2015). Comme l'indique Gry et coll. (2009), le manque de concordance entre les profils transcriptionnels et protéiques peut être dû à plusieurs facteurs biologiques, mais pourraient aussi être dû à une faible performance des anticorps pour l'un ou l'autre des isoformes ce qui aurait comme conséquence d'altérer les résultats obtenus. Bien que la spécificité de notre anticorps anti-gal-8 ait été validé précédemment par notre laboratoire (Labrie et al., 2017), il n'est pas certain que les autres études disponibles dans la littérature concernant cette protéine aient un anticorps spécifique, ce qui rend les comparaisons moins évidentes. La présence de différences dans les régions non traduites des ARNm de *Igals8* appuie cette possibilité. De plus,

la présence de miARN présent naturellement dans la cellule, est une autre possibilité. Il s'agit de petits ARNs non codants ciblant la région 3' UTR d'ARNm spécifique pour favoriser leurs dégradations ou réprimer leurs traductions (Hwang et al., 2009). À ce jour, toutefois, il n'y a pas de miARN reconnaissant la gal-8, ou l'un de ces isoformes en particulier, qui ont été identifiés.

En perspectives, pour comparer la stabilité des isoformes d'ARNm, nous pourrions utiliser de la cycloheximide afin de bloquer la traduction au niveau de l'initiation et de l'élongation (Schneider-Poetsch et al., 2010). En bloquant la traduction et en analysant le profil d'expression des isoformes à plusieurs temps d'incubation différents, nous pourrions détecter lequel des isoformes est le plus stable, car l'isoforme en question resterait visible sur une plus longue durée. Dans le même ordre d'idée, nous pourrions aussi utiliser du MG-132, un aldéhyde peptidique qui bloque l'activité protéolytique du protéasome 26S pour les molécules ubiquitinées (Han et al., 2009). Avec ce produit, nous pourrions analyser à plusieurs temps d'incubations différents, lequel des isoformes est le plus rapidement dégradé des deux et donc vraisemblablement, le moins détecté lors des analyses. Nous pourrions ainsi étudier plus en détail pourquoi l'isoforme moyen de la gal-8 est plus rarement présent pour l'ensemble des lignées cellulaires testées, à savoir si c'est son expression qui est réduite et/ou s'il est plus rapidement sujet à la dégradation protéolytique par rapport à l'isoforme long.

5.5 La nature de l'isoforme ne dicte pas sa localisation intracellulaire

Nos résultats ont démontré un même profil d'expression tant cytoplasmique que nucléaire pour les lignées cellulaires analysées. Ceci implique donc qu'un isoforme n'est pas spécifique à un compartiment intracellulaire, du moins dans les cellules que nous avons utilisées. En fonction des résultats obtenus par Grosset et coll. (2016) voulant que le profil intracellulaire ait un impact majeur, nous nous attendions à avoir un profil distinct. C'est d'ailleurs le cas des isoformes de la protéine Transaldolase-1 (TALDO-1) : l'isoforme long se retrouve dans le noyau alors que l'isoforme court se retrouve dans le cytoplasme. La raison de cette différence subcellulaire se trouve dans la séquence de l'isoforme long, car ce dernier dispose de 10 acides aminés supplémentaires lui permettant de se lier à l'importine α/β (Moriyama et al., 2016). Contrairement à TALDO-1, la différence entre les deux isoformes de la gal-8 se situe au centre de la protéine dans le lien peptidique ce qui pourrait expliquer que le transport intracellulaire des deux isoformes ne soit pas différent, surtout si ce transport implique le CRD. Dans d'autres cas, certains isoformes ont des localisations précises et distinctes au sein d'un même compartiment.

C'est le cas pour le récepteur D2 de la dopamine (*dopamine D2 receptor* ou D2R) et de la protéine phosphatase PP-1. D2R possèdent deux isoformes variant de 29 acides aminés dans sa troisième boucle. L'isoforme court se situe au niveau de la membrane plasmique alors que l'isoforme long se retrouve dans la zone périnucléaire près de l'appareil de Golgi (Takeuchi et al., 2003). Les trois isoformes majeurs de PP-1 ont des domaines catalytiques très similaires, mais ils ont des variations dans les extrémités NH₂ et COOH. Au moment de l'interphase, l'isoforme α se situe au niveau de la matrice nucléaire, l'isoforme γ 1 se concentre dans le nucléole et l'isoforme δ se concentre au niveau de la chromatine entière non nucléolaire. De plus, les localisations distinctes fluctuent au moment de la mitose : l'isoforme α se situe alors avec les centrosomes, l'isoforme γ 1 se trouve avec les microtubules mitotiques et l'isoforme δ se joint au chromosome (Andreassen et al., 1998). Ainsi, notre hypothèse voulant que la nature de l'isoforme dicte sa localisation intracellulaire ne peut être complètement réfutée.

Par rapport à la complexité de l'expression de *Igals8*, il est maintenant connu que l'épissage alternatif peut être altéré en faveur du développement d'une pathologie comme le cancer. Ces altérations peuvent être la cause d'une mutation d'oncogènes ou des molécules composant le spliceosome (Lee et al., 2016). Par exemple, dans le cas du carcinome hépatocellulaire, il semble qu'une modification du ratio des isoformes du facteur VEGF-A en faveur des variants VEGFS-165 et -121 pro-angiogéniques favorisent la progression de ce cancer (Chesnokov et al., 2018). Concernant la glande mammaire, une modification du ratio des isoformes A ou B du récepteur de la progestérone a un impact sur le développement tumoral : normalement les cellules saines expriment des niveaux équivalents d'isoforme A et B et les tumeurs particulièrement agressives sont riches en récepteurs A (Jacobsen et al., 2005; Khan et al., 2012). Ce sont deux exemples de l'importance à accorder au profil d'expression des gènes présentant un épissage alternatif et ayant été associés au développement d'une maladie, soit de la gal-8 et des cancers du sein dans ce cas-ci.

5.6 Modulation du profil d'expression de la gal-8

Nos résultats concernant la modulation du profil d'expression transcriptionnelle des isoformes de *Igals8* en fonction de deux conditions, la densité cellulaire et l'ajout de gal-7RH, modifiant l'homéostasie des lignées cellulaires sont des résultats qui étaient anticipés. Par rapport à la densité cellulaire, toute condition de croissance sous-optimale pour les cellules en culture constitue un stress potentiel. Certaines voies de signalisation sont communes à plusieurs stress cellulaires alors que d'autres sont spécifiques. Les principales réponses à un stress se font via

le contrôle de l'expression génique, du métabolisme, du cycle cellulaire, de l'organisation du cytosquelette et de l'activité des enzymes (de Nadal et al., 2011). Bien que nous n'ayons pas de données précises sur les conséquences d'une forte confluence dans nos cultures cellulaires, il est bien établi par la littérature que la densité cellulaire est un stress facilement réalisable qui modifie plusieurs paramètres importants dans l'environnement de culture des cellules *in vitro*. Par exemple, la densité cellulaire impose un stress oxydatif en raison d'une consommation plus rapide de l'oxygène présent et par le fait même, une plus grande production de peroxyde d'hydrogène et autres espèces réactives de l'oxygène (Halliwell, 2014). Il existe plusieurs protocoles pour quantifier le stress oxydatif, tel le dosage ROS-Glo™ élaboré par Promega qui est facilement réalisable en deux heures par l'ajout de deux réactifs et l'analyse par spectrophotométrie (Kim et al., 2018). La densité cellulaire corrèle aussi avec la quantité de déchets métaboliques en suspension dans le milieu de culture (ATCC.org). L'augmentation des déchets métaboliques implique ensuite une modification du pH du milieu de culture, changement aussi facilement quantifiable avec un pH mètre et le surnageant des cultures cellulaires. Comme l'indiquent nos résultats et ceux d'autres auteurs, la confluence cellulaire est un paramètre important à considérer lors des études *in vitro*. Voici un exemple plus concret des conséquences d'une forte densité cellulaire sur l'homéostasie des cellules : La densité cellulaire a un effet sur le ratio œstradiol/progestérone des cellules de la granulosa. Lorsque la densité de culture cellulaire est faible, c'est la sécrétion d'œstradiol qui est favorisée alors qu'à de fortes densités, la sécrétion de progestérone et l'expression des enzymes progestagéniques sont en hausse, deux hormones impliquées dans le développement des sous-types de cancer du sein positif à leurs récepteurs cellulaires respectifs (Portela et al., 2010). En lien avec les fonctions de la gal-8 pour le recrutement des protéines adaptatrices de l'autophagie, il a été démontré que des fortes confluences corrélaient avec une baisse de la formation de l'autophagosome (Pavel et al., 2018). Comme nous l'avons observé dans la section 4.3.1 et 4.4, une forte densité cellulaire modifie le ratio des isoformes en faveur de l'isoforme moyen. Puisque la gal-8 est impliquée dans les étapes initiales de la formation de l'autophagosome et que la littérature indique qu'une forte confluence mène à une réduction de ce phagosome, il serait très intéressant d'analyser si l'isoforme long de la gal-8 est celui impliqué dans ce processus. Ainsi, nous n'avons pas suffisamment approfondi les conséquences sous-jacentes à la forte densité cellulaire (stress oxydatif, pH, déchets métaboliques...) menant à une modification du ratio des isoformes de la gal-8, mais nos résultats montrent qu'il y a bien corrélation (section 4.31 et 4.4).

Par ailleurs, il était attendu que la présence d'un stress cellulaire ait un impact sur le profil d'expression de la gal-8 puisque les gals sont reconnues comme des alarmines, c'est-à-dire des protéines dont la présence est augmentée en cas de stress cellulaire afin d'entamer une réponse immunitaire. De plus, les alarmines en générales ont un point commun avec les gals, elles sont relâchées dans le milieu extracellulaire par une voie non conventionnelle (Nefla et al., 2016). Ces alarmines sont connues pour agir via une réticulation des récepteurs membranaires, ce qui encore une fois est l'une des principales caractéristiques des gals (Nefla et al., 2016). Par exemple, la gal-3 est fortement exprimée dans les cartilages et le tissu synovial durant les phases inflammatoires des personnes atteintes d'arthrose (Nefla et al., 2016). Ensuite, la gal-9 est surexprimée dans les poumons en cas d'infection septique par *Francisella nivicida* pour l'enclenchement de la réponse inflammatoire (Steichen et al., 2015). La gal-8 est maintenant reconnue comme une alarmine en ce qui concerne son rôle dans l'autophagie (Falcon et al., 2018; Nefla et al., 2016).

Quant à la dominance de l'isoforme moyen de la gal-8 par rapport à l'isoforme long, une explication concerne les miARNs. Pour certaines lignées cellulaires, il est connu que la confluence cellulaire corrèle avec la présence de miARNs (Hwang et al., 2009). Le résultat obtenu à la suite d'un stress de confluence met en évidence une dominance de l'expression ou de la stabilité de l'isoforme moyen transcriptionnel par rapport au long, et ce pour trois des quatre lignées testées, soit les lignées MCF7, MDA-MB-231, T47D (section 4.3.1). Il serait ainsi intéressant d'analyser s'il existe un miARN spécifique à cet isoforme moyen. Cette information nous permettrait d'en savoir un peu plus sur la régulation post-transcriptionnelle du gène ainsi qu'à titre de comparaison entre la régulation des deux isoformes.

La lignée MDA-MB-468 est la seule lignée testée pour laquelle l'augmentation de la densité cellulaire n'a pas eu d'effet sur le profil d'expression de l'isoforme moyen de *Igals8*. L'une des possibilités concernant cette différence est la plus forte expression constitutive de gal-7 par cette lignée par rapport aux autres (Campion et al., 2013). Cela fait le pont avec le résultat suivant concernant la modulation du profil d'expression de *Igals8* en présence de gal-7RH chez la lignée cellulaire MDA-MB-231. En effet, ce résultat suggère qu'une gal pourrait moduler l'expression d'une autre gal, notamment en situation de stress. Nos résultats montrent non seulement une baisse de la densité cellulaire avec l'ajout d'une concentration supérieure à 5 μM de gal-7RH, mais aussi une augmentation de l'expression de l'isoforme moyen et de la gal-8 totale à une même concentration. Dans les cancers, la gal-7 est significativement plus exprimée

dans les sous-types les plus agressifs tels que ceux négatifs au récepteur de l'estrogène (Campion et al., 2013). De plus, la gal-7 est fortement associée à l'apoptose via une activation de la voie de signalisation du p53 pour certains cancers comme celui du colon, alors que pour les cancers du sein et les lymphomes, la gal-7 augmente l'habilité des cellules cancéreuses à métastaser et les protègent de l'apoptose (Biron-Pain et al., 2013). Ainsi, contrairement à ce que l'on aurait pu attendre concernant ce dernier point, les cellules ayant été soumises à de fortes concentrations de gal-7RH sont celles associées à une plus faible densité cellulaire. Certains facteurs telles qu'une durée d'incubation trop longue ou même que l'utilisation d'un modèle *in vitro* plutôt qu'un modèle *in vivo* peuvent expliquer la discordance entre nos résultats et ceux de la littérature. De plus, bien que les densités cellulaires obtenues soient inférieures à la barre des 100 000 cellules/cm², il est intéressant de constater que le seul résultat montrant une modulation de l'expression de l'isoforme moyen est obtenu à la plus faible densité cellulaire sachant que pour cette même lignée cellulaire, notre résultat précédent associe cette modulation à de fortes densités cellulaires (figure 4.3.1.3). Ceci implique donc l'existence de plusieurs voies de signalisation distinctes, potentiellement toutes deux reliées à un stress cellulaire, menant à l'augmentation de l'expression de l'isoforme moyen de *Igals8*.

En perspective, il serait donc très intéressant d'analyser les effets d'un inhibiteur de la dimérisation de la gal-7, ou de petit ARN interférent, sur le profil d'expression des isoformes de *Igals8* pour la lignée cellulaire MDA-MB-468. En effet, l'analyse de ces effets en fonction de la confluence cellulaire permettrait de confirmer si l'omniprésence de la gal-7 endogène à cette lignée est en cause pour la particularité de celle-ci observée à la figure 4.3.1.2. En ce qui concerne la modulation de l'expression des isoformes de la gal-8 pour la lignée cellulaire MDA-MB-231, les résultats obtenus au niveau du profil protéique, soit une absence de différence significative selon la catégorie de densité cellulaire, ne reflètent pas les résultats du profil transcriptionnel obtenu montrant une augmentation de l'expression de l'isoforme moyen en période de forte densité cellulaire (figure 4.3.1.2). Par contre, ces résultats concordent avec ceux de Catteneo et coll. (2014), ils indiquent que la présence de lipopolysaccharide bactérien, impliquant alors un stress cellulaire, module l'expression de l'isoforme moyen à la hausse. Afin de détailler cette différence, à savoir s'il existe une différence entre les stabilités ou les taux de traduction des deux isoformes protéiques en faveur de l'isoforme long, l'utilisation de la cycloheximide et du MG132 mentionnés précédemment gagne en importance.

5.7 Conclusion générale

Par rapport au travail de Bidon-Wagner et coll. (2002) concernant les isoformes de la gal-8, qui est certainement l'un des ouvrages les plus détaillés sur la complexité du profil d'expression de ce gène, nos résultats permettent de combler certaines informations n'ayant pas été incluses dans cette précédente étude ou n'étant pas disponibles au moment de sa publication. D'abord, nous avons pu déterminer 1) qu'il n'y a que deux transcrits de *Igals8* et non trois, 2) qu'il existe bien une modulation du profil d'expression des transcrits, 3) que la densité cellulaire ainsi que la gal-7 font partie des causes modifiant les voies de signalisation à la base de cette modulation, 4) que les deux transcrits sont traduits en protéines de façon variable et 5) que ces deux isoformes protéiques sont présents dans les deux compartiments intracellulaires.

Nos résultats soutiennent l'importance de la recherche concernant la régulation de l'expression transcriptionnelle et protéique de *Igals8* en lien avec les cancers du sein. En effet, le cancer du sein est une maladie très hétérogène qui se reflète dans nos résultats par des profils d'expression variable en fonction de la lignée cellulaire, et ce même pour deux lignées cellulaires ayant un même sous-type moléculaire, tel que les lignées MCF7 et T47D qui sont deux luminaux A ou MDA-MB-231 et Hs578t qui font partie du sous-type moléculaire triple négatif faible en Claudines. De plus, l'augmentation de l'expression de l'isoforme moyen en période de stress cellulaire, causé par une forte densité cellulaire et par le traitement à la gal-7, soulève une implication différente pour cet isoforme moyen par rapport à l'isoforme long. Cette implication se doit d'être désormais prise en compte lors des études concernant la gal-8. Ainsi, les résultats obtenus sont en mesure de soulever l'existence d'un niveau de complexité supplémentaire en ce qui concerne les gals ayant plusieurs isoformes. La considération de cette complexité par la communauté scientifique permettrait d'augmenter l'exactitude des résultats à obtenir par celle-ci.

RÉFÉRENCES

- Ades F, Zardavas D, Bozovic-Spasojevic I, Pugliano L, Fumagalli D, de Azambuja E, Viale G, Sotiriou C & Piccart M (2014) Luminal B breast cancer: molecular characterization, clinical management, and future perspectives. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 32(25):2794-2803.
- Advedissian T, Deshayes F, Poirier F, Grandjean C & Viguier M (2015) [Galectins, a class of unconventional lectins]. *Medecine sciences : M/S* 31(5):499-505.
- Ahmad N, Gabius HJ, Andre S, Kaltner H, Sabesan S, Roy R, Liu B, Macaluso F & Brewer CF (2004) Galectin-3 precipitates as a pentamer with synthetic multivalent carbohydrates and forms heterogeneous cross-linked complexes. *The Journal of biological chemistry* 279(12):10841-10847.
- Andreassen PR, Lacroix FB, Villa-Moruzzi E & Margolis RL (1998) Differential subcellular localization of protein phosphatase-1 alpha, gamma1, and delta isoforms during both interphase and mitosis in mammalian cells. *The Journal of cell biology* 141(5):1207-1215.
- Arbel-Goren R, Levy Y, Ronen D & Zick Y (2005) Cyclin-dependent kinase inhibitors and JNK act as molecular switches, regulating the choice between growth arrest and apoptosis induced by galectin-8. *The Journal of biological chemistry* 280(19):19105-19114.
- Arthur CM, Rodrigues LC, Baruffi MD, Sullivan HC, Cummings RD & Stowell SR (2015) Detection of phosphatidylserine exposure on leukocytes following treatment with human galectins. *Methods Mol Biol* 1207:185-200.
- Badve S, Dabbs DJ, Schnitt SJ, Baehner FL, Decker T, Eusebi V, Fox SB, Ichihara S, Jacquemier J, Lakhani SR, Palacios J, Rakha EA, Richardson AL, Schmitt FC, Tan PH, Tse GM, Weigelt B, Ellis IO & Reis-Filho JS (2011) Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 24(2):157-167.
- Baralle FE & Giudice J (2017) Alternative splicing as a regulator of development and tissue identity. *Nature reviews. Molecular cell biology* 18(7):437-451.
- Barretina J, Caponigro G, Stransky N, Venkatesan K, Margolin AA, Kim S, Wilson CJ, Lehar J, Kryukov GV, Sonkin D, Reddy A, Liu M, Murray L, Berger MF, Monahan JE, Morais P, Meltzer J, Korejwa A, Jane-Valbuena J, Mapa FA, Thibault J, Bric-Furlong E, Raman P, Shipway A, Engels IH, Cheng J, Yu GK, Yu J, Aspesi P, Jr., de Silva M, Jagtap K, Jones MD, Wang L, Hatton C, Palesscandolo E, Gupta S, Mahan S, Sougnez C, Onofrio RC, Liefeld T, MacConaill L, Winckler W, Reich M, Li N, Mesirov JP, Gabriel SB, Getz G, Ardlie K, Chan V, Myer VE, Weber BL, Porter J, Warmuth M, Finan P, Harris JL, Meyerson M, Golub TR, Morrissey MP, Sellers WR, Schlegel R & Garraway LA (2012) The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 483(7391):603-607.
- Bedard PL, Hansen AR, Ratain MJ & Siu LL (2013) Tumour heterogeneity in the clinic. *Nature* 501(7467):355-364.
- Bibens-Laulan N & St-Pierre Y (2017) Intracellular galectin-7 expression in cancer cells results from an autocrine transcriptional mechanism and endocytosis of extracellular galectin-7. *PLoS one* 12(11):e0187194.
- Bidon-Wagner N & Le Pennec JP (2002) Human galectin-8 isoforms and cancer. *Glycoconjugate journal* 19(7-9):557-563.
- Bidon N, Brichory F, Hanash S, Bourguet P, Dazord L & Le Pennec JP (2001) Two messenger RNAs and five isoforms for Po66-CBP, a galectin-8 homolog in a human lung carcinoma cell line. *Gene* 274(1-2):253-262.

- Biron-Pain K, Grosset AA, Poirier F, Gaboury L & St-Pierre Y (2013) Expression and functions of galectin-7 in human and murine melanomas. *PLoS one* 8(5):e63307.
- Boura-Halfon S, Voliovitch H, Feinstein R, Paz K & Zick Y (2003) Extracellular matrix proteins modulate endocytosis of the insulin receptor. *The Journal of biological chemistry* 278(18):16397-16404.
- Boyd WC & Shapleigh E (1954) Separation of individuals of any blood group into secretors and non-secretors by use of a plant agglutinin (lectin). *Blood* 9(12):1194-1198.
- Boyle KB & Randow F (2013) The role of 'eat-me' signals and autophagy cargo receptors in innate immunity. *Current opinion in microbiology* 16(3):339-348.
- Brewer CF (2001) Lectin cross-linking interactions with multivalent carbohydrates. *Advances in experimental medicine and biology* 491:17-25.
- Cadwell C & Zambetti GP (2001) The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth. *Gene* 277(1-2):15-30.
- Camby I, Belot N, Rorive S, Lefranc F, Maurage CA, Lahm H, Kaltner H, Hadari Y, Ruchoux MM, Brotchi J, Zick Y, Salmon I, Gabius HJ & Kiss R (2001) Galectins are differentially expressed in supratentorial pilocytic astrocytomas, astrocytomas, anaplastic astrocytomas and glioblastomas, and significantly modulate tumor astrocyte migration. *Brain Pathol* 11(1):12-26.
- Camby I, Decaestecker C, Lefranc F, Kaltner H, Gabius HJ & Kiss R (2005) Galectin-1 knocking down in human U87 glioblastoma cells alters their gene expression pattern. *Biochemical and biophysical research communications* 335(1):27-35.
- Campion CG, Labrie M, Lavoie G & St-Pierre Y (2013) Expression of galectin-7 is induced in breast cancer cells by mutant p53. *PLoS one* 8(8):e72468.
- Carabelli J, Quattrocchi V, D'Antuono A, Zamorano P, Tribulatti MV & Campetella O (2017) Galectin-8 activates dendritic cells and stimulates antigen-specific immune response elicitation. *Journal of leukocyte biology* 102(5):1237-1247.
- Carcamo C, Pardo E, Oyanadel C, Bravo-Zehnder M, Bull P, Caceres M, Martinez J, Massardo L, Jacobelli S, Gonzalez A & Soza A (2006) Galectin-8 binds specific beta1 integrins and induces polarized spreading highlighted by asymmetric lamellipodia in Jurkat T cells. *Experimental cell research* 312(4):374-386.
- Carlsson MC, Balog CI, Kilsgard O, Hellmark T, Bakoush O, Segelmark M, Ferno M, Olsson H, Malmstrom J, Wuhler M & Leffler H (2012) Different fractions of human serum glycoproteins bind galectin-1 or galectin-8, and their ratio may provide a refined biomarker for pathophysiological conditions in cancer and inflammatory disease. *Biochimica et biophysica acta* 1820(9):1366-1372.
- Carlsson S, Carlsson MC & Leffler H (2007) Intracellular sorting of galectin-8 based on carbohydrate fine specificity. *Glycobiology* 17(9):906-912.
- Cattaneo V, Tribulatti MV & Campetella O (2011) Galectin-8 tandem-repeat structure is essential for T-cell proliferation but not for co-stimulation. *The Biochemical journal* 434(1):153-160.
- Cattaneo V, Tribulatti MV, Carabelli J, Carestia A, Schattner M & Campetella O (2014) Galectin-8 elicits pro-inflammatory activities in the endothelium. *Glycobiology* 24(10):966-973.
- Cederfur C, Salomonsson E, Nilsson J, Halim A, Oberg CT, Larson G, Nilsson UJ & Leffler H (2008) Different affinity of galectins for human serum glycoproteins: galectin-3 binds many protease inhibitors and acute phase proteins. *Glycobiology* 18(5):384-394.
- Chabot S, Kashio Y, Seki M, Shirato Y, Nakamura K, Nishi N, Nakamura T, Matsumoto R & Hirashima M (2002) Regulation of galectin-9 expression and release in Jurkat T cell line cells. *Glycobiology* 12(2):111-118.
- Chan YC, Lin HY, Tu Z, Kuo YH, Hsu SD & Lin CH (2018) Dissecting the Structure-Activity Relationship of Galectin-Ligand Interactions. *International journal of molecular sciences* 19(2).

- Cheng YL, Wu YW, Kuo CF, Lu SL, Liu FT, Anderson R, Lin CF, Liu YL, Wang WY, Chen YD, Zheng PX, Wu JJ & Lin YS (2017) Galectin-3 Inhibits Galectin-8/Parkin-Mediated Ubiquitination of Group A Streptococcus. *mBio* 8(4).
- Chesnokov MS, Khesina PA, Shavochkina DA, Kustova IF, Dyakov LM, Morozova OV, Mugue NS, Kudashkin NE, Moroz EA, Patyutko YI & Lazarevich NL (2018) Shift in VEGFA isoform balance towards more angiogenic variants is associated with tumor stage and differentiation of human hepatocellular carcinoma. *PeerJ* 6:e4915.
- Cornillon J, Campos L & Guyotat D (2003) [Focal adhesion kinase (FAK), a multifunctional protein]. *Medicine sciences : M/S* 19(6-7):743-752.
- Crocker PR & Zhang J (2002) New I-type lectins of the CD 33-related siglec subgroup identified through genomics. *Biochemical Society symposium* (69):83-94.
- Cueni LN & Detmar M (2009) Galectin-8 interacts with podoplanin and modulates lymphatic endothelial cell functions. *Experimental cell research* 315(10):1715-1723.
- Cummings RD & Liu FT (2009) Galectins. *Essentials of Glycobiology*, Nd, Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW & Etzler ME (Édit.) Cold Spring Harbor (NY).
- Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, Speed D, Lynch AG, Samarajiwa S, Yuan Y, Graf S, Ha G, Haffari G, Bashashati A, Russell R, McKinney S, Langerod A, Green A, Provenzano E, Wishart G, Pinder S, Watson P, Markowitz F, Murphy L, Ellis I, Purushotham A, Borresen-Dale AL, Brenton JD, Tavare S, Caldas C & Aparicio S (2012) The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* 486(7403):346-352.
- Dapat IC, Pascapurnama DN, Iwasaki H, Labayo HK, Chagan-Yasutan H, Egawa S & Hattori T (2017) Secretion of Galectin-9 as a DAMP during Dengue Virus Infection in THP-1 Cells. *International journal of molecular sciences* 18(8).
- Darbon JM, Fesquet D & Cavadore JC (1995) De nouveaux régulateurs dy cycle cellulaire : les protéines modulatrices des complexes cdk-cyclines. *médecine/sciences* 11(3):349-356.
- Davidson PJ, Li SY, Lohse AG, Vandergaast R, Verde E, Pearson A, Patterson RJ, Wang JL & Arnoys EJ (2006) Transport of galectin-3 between the nucleus and cytoplasm. I. Conditions and signals for nuclear import. *Glycobiology* 16(7):602-611.
- de Nadal E, Ammerer G & Posas F (2011) Controlling gene expression in response to stress. *Nature reviews. Genetics* 12(12):833-845.
- Delgado VM, Nugnes LG, Colombo LL, Troncoso MF, Fernandez MM, Malchiodi EL, Frahm I, Croci DO, Compagno D, Rabinovich GA, Wolfenstein-Todel C & Elola MT (2011) Modulation of endothelial cell migration and angiogenesis: a novel function for the "tandem-repeat" lectin galectin-8. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25(1):242-254.
- Desmyter A, Spinelli S, Roussel A & Cambillau C (2015) Camelid nanobodies: killing two birds with one stone. *Current opinion in structural biology* 32:1-8.
- Di Cosimo S & Baselga J (2010) Management of breast cancer with targeted agents: importance of heterogeneity. [corrected]. *Nature reviews. Clinical oncology* 7(3):139-147.
- Diskin S, Cao Z, Leffler H & Panjwani N (2009) The role of integrin glycosylation in galectin-8-mediated trabecular meshwork cell adhesion and spreading. *Glycobiology* 19(1):29-37.
- Diskin S, Chen WS, Cao Z, Gyawali S, Gong H, Soza A, Gonzalez A & Panjwani N (2012) Galectin-8 promotes cytoskeletal rearrangement in trabecular meshwork cells through activation of Rho signaling. *PloS one* 7(9):e44400.
- Dong GW, Kim J, Park JH, Choi JY, Cho SI & Lim SC (2009) Galectin-8 expression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Clinical and experimental otorhinolaryngology* 2(1):13-19.
- Drickamer K (1993) Recognition of complex carbohydrates by Ca(2+)-dependent animal lectins. *Biochemical Society transactions* 21(2):456-459.

- Drickamer K, Dordal MS & Reynolds L (1986) Mannose-binding proteins isolated from rat liver contain carbohydrate-recognition domains linked to collagenous tails. Complete primary structures and homology with pulmonary surfactant apoprotein. *The Journal of biological chemistry* 261(15):6878-6887.
- Earl LA, Bi S & Baum LG (2011) Galectin multimerization and lattice formation are regulated by linker region structure. *Glycobiology* 21(1):6-12.
- Elantak L, Espeli M, Boned A, Bornet O, Bonzi J, Gauthier L, Feracci M, Roche P, Guerlesquin F & Schiff C (2012) Structural basis for galectin-1-dependent pre-B cell receptor (pre-BCR) activation. *The Journal of biological chemistry* 287(53):44703-44713.
- Engstrom MJ, Opdahl S, Hagen AI, Romundstad PR, Akslen LA, Haugen OA, Vatten LJ & Bofin AM (2013) Molecular subtypes, histopathological grade and survival in a historic cohort of breast cancer patients. *Breast cancer research and treatment* 140(3):463-473.
- Eshkar Sebban L, Ronen D, Levartovsky D, Elkayam O, Caspi D, Aamar S, Amital H, Rubinow A, Golan I, Naor D, Zick Y & Golan I (2007) The involvement of CD44 and its novel ligand galectin-8 in apoptotic regulation of autoimmune inflammation. *J Immunol* 179(2):1225-1235.
- Falcon B, Noad J, McMahon H, Randow F & Goedert M (2018) Galectin-8-mediated selective autophagy protects against seeded tau aggregation. *The Journal of biological chemistry* 293(7):2438-2451.
- Fallahpour S, Navaneelan T, De P & Borgo A (2017) Breast cancer survival by molecular subtype: a population-based analysis of cancer registry data. *CMAJ open* 5(3):E734-E739.
- Fernandez MM, Ferragut F, Cardenas Delgado VM, Bracalente C, Bravo AI, Cagnoni AJ, Nunez M, Morosi LG, Quinta HR, Espelt MV, Troncoso MF, Wolfenstein-Todel C, Marino KV, Malchiodi EL, Rabinovich GA & Elola MT (2016) Glycosylation-dependent binding of galectin-8 to activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166) promotes its surface segregation on breast cancer cells. *Biochimica et biophysica acta* 1860(10):2255-2268.
- Friedel M, Andre S, Goldschmidt H, Gabius HJ & Schwartz-Albiez R (2016) Galectin-8 enhances adhesion of multiple myeloma cells to vascular endothelium and is an adverse prognostic factor. *Glycobiology* 26(10):1048-1058.
- Fujimoto Z, Tateno H & Hirabayashi J (2014) Lectin structures: classification based on the 3-D structures. *Methods Mol Biol* 1200:579-606.
- Gentilini LD, Jaworski FM, Tiraboschi C, Perez IG, Kotler ML, Chauchereau A, Laderach DJ & Compagno D (2017) Stable and high expression of Galectin-8 tightly controls metastatic progression of prostate cancer. *Oncotarget* 8(27):44654-44668.
- Genuth NR & Barna M (2018) Heterogeneity and specialized functions of translation machinery: from genes to organisms. *Nature reviews. Genetics* 19(7):431-452.
- Giaccia AJ & Kastan MB (1998) The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes & development* 12(19):2973-2983.
- Gladkikh A, Kovaleva A, Tvorogova A & Vorobjev IA (2018) Heterogeneity of Focal Adhesions and Focal Contacts in Motile Fibroblasts. *Methods Mol Biol* 1745:205-218.
- Gong HC, Honjo Y, Nangia-Makker P, Hogan V, Mazurak N, Bresalier RS & Raz A (1999) The NH2 terminus of galectin-3 governs cellular compartmentalization and functions in cancer cells. *Cancer research* 59(24):6239-6245.
- Gonzalez-Porta M, Frankish A, Rung J, Harrow J & Brazma A (2013) Transcriptome analysis of human tissues and cell lines reveals one dominant transcript per gene. *Genome biology* 14(7):R70.
- Gopalkrishnan RV, Roberts T, Tuli S, Kang D, Christiansen KA & Fisher PB (2000) Molecular characterization of prostate carcinoma tumor antigen-1, PCTA-1, a human galectin-8 related gene. *Oncogene* 19(38):4405-4416.

- Grosset AA, Labrie M, Vladoiu MC, Yousef EM, Gaboury L & St-Pierre Y (2016) Galectin signatures contribute to the heterogeneity of breast cancer and provide new prognostic information and therapeutic targets. *Oncotarget* 7(14):18183-18203.
- Gry M, Rimini R, Stromberg S, Asplund A, Ponten F, Uhlen M & Nilsson P (2009) Correlations between RNA and protein expression profiles in 23 human cell lines. *BMC genomics* 10:365.
- Guo JP & Li XG (2017) Galectin-7 promotes the invasiveness of human oral squamous cell carcinoma cells via activation of ERK and JNK signaling. *Oncology letters* 13(3):1919-1924.
- Hadari YR, Paz K, Dekel R, Mestrovic T, Accili D & Zick Y (1995) Galectin-8. A new rat lectin, related to galectin-4. *The Journal of biological chemistry* 270(7):3447-3453.
- Halliwell B (2014) Cell culture, oxidative stress, and antioxidants: avoiding pitfalls. *Biomedical journal* 37(3):99-105.
- Han YH, Moon HJ, You BR & Park WH (2009) The effect of MG132, a proteasome inhibitor on HeLa cells in relation to cell growth, reactive oxygen species and GSH. *Oncology reports* 22(1):215-221.
- Hanke AA, Joch C & Grolinger K (2013) Long-term safety and efficacy of a pasteurized nanofiltered prothrombin complex concentrate (Beriplex P/N): a pharmacovigilance study. *British journal of anaesthesia* 110(5):764-772.
- Haudek KC, Spronk KJ, Voss PG, Patterson RJ, Wang JL & Arnoys EJ (2010) Dynamics of galectin-3 in the nucleus and cytoplasm. *Biochimica et biophysica acta* 1800(2):181-189.
- Hébert E (2001) Lectines membranaires et transduction du signal. *médecine/sciences* 17(4):486-489.
- Hirabayashi J, Hashidate T, Arata Y, Nishi N, Nakamura T, Hirashima M, Urashima T, Oka T, Futai M, Muller WE, Yagi F & Kasai K (2002) Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochimica et biophysica acta* 1572(2-3):232-254.
- Hunt BJ & Jurd KM (1998) Endothelial cell activation. A central pathophysiological process. *BMJ* 316(7141):1328-1329.
- Hwang HW, Wentzel EA & Mendell JT (2009) Cell-cell contact globally activates microRNA biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(17):7016-7021.
- Ideo H, Matsuzaka T, Nonaka T, Seko A & Yamashita K (2011) Galectin-8-N-domain recognition mechanism for sialylated and sulfated glycans. *The Journal of biological chemistry* 286(13):11346-11355.
- Ideo H, Seko A, Ishizuka I & Yamashita K (2003) The N-terminal carbohydrate recognition domain of galectin-8 recognizes specific glycosphingolipids with high affinity. *Glycobiology* 13(10):713-723.
- Iwamoto DV & Calderwood DA (2015) Regulation of integrin-mediated adhesions. *Current opinion in cell biology* 36:41-47.
- Jacobsen BM, Schittone SA, Richer JK & Horwitz KB (2005) Progesterone-independent effects of human progesterone receptors (PRs) in estrogen receptor-positive breast cancer: PR isoform-specific gene regulation and tumor biology. *Mol Endocrinol* 19(3):574-587.
- Jia J, Abudu YP, Claude-Taupin A, Gu Y, Kumar S, Choi SW, Peters R, Mudd MH, Allers L, Salemi M, Phinney B, Johansen T & Deretic V (2018) Galectins Control mTOR in Response to Endomembrane Damage. *Molecular cell* 70(1):120-135 e128.
- Keller M, Ruegg A, Werner S & Beer HD (2008) Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell* 132(5):818-831.
- Khalili AA & Ahmad MR (2015) A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications. *International journal of molecular sciences* 16(8):18149-18184.
- Khan JA, Bellance C, Guiochon-Mantel A, Lombes M & Loosfelt H (2012) Differential regulation of breast cancer-associated genes by progesterone receptor isoforms PRA and PRB in a new bi-inducible breast cancer cell line. *PloS one* 7(9):e45993.

- Kim BW, Hong SB, Kim JH, Kwon DH & Song HK (2013) Structural basis for recognition of autophagic receptor NDP52 by the sugar receptor galectin-8. *Nature communications* 4:1613.
- Kim CW, Go RE, Hwang KA, Bae ON, Lee K & Choi KC (2018) Effects of cigarette smoke extracts on apoptosis and oxidative stress in two models of ovarian cancer in vitro. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 52:161-169.
- Kobayashi T, Shimura T, Yajima T, Kubo N, Araki K, Wada W, Tsutsumi S, Suzuki H, Kuwano H & Raz A (2011) Transient silencing of galectin-3 expression promotes both in vitro and in vivo drug-induced apoptosis of human pancreatic carcinoma cells. *Clinical & experimental metastasis* 28(4):367-376.
- Kolundzic N, Bojic-Trbojevic Z, Radojic L, Petronijevic M & Vicovac L (2011) Galectin-8 is expressed by villous and extravillous trophoblast of the human placenta. *Placenta* 32(11):909-911.
- Kramer MW, Waalkes S, Serth J, Hennenlotter J, Tezval H, Stenzl A, Kuczyk MA & Merseburger AS (2011) Decreased galectin-8 is a strong marker for recurrence in urothelial carcinoma of the bladder. *Urologia internationalis* 87(2):143-150.
- Kumar S & Cieplak P (2018) Role of N-glycosylation in activation of proMMP-9. A molecular dynamics simulations study. *PLoS one* 13(1):e0191157.
- Kumar S, Frank M & Schwartz-Albiez R (2013) Understanding the specificity of human Galectin-8C domain interactions with its glycan ligands based on molecular dynamics simulations. *PLoS one* 8(3):e59761.
- Kwon DH & Song HK (2018) A Structural View of Xenophagy, a Battle between Host and Microbes. *Molecules and cells* 41(1):27-34.
- Labrie M, De Araujo LOF, Communal L, Mes-Masson AM & St-Pierre Y (2017) Tissue and plasma levels of galectins in patients with high grade serous ovarian carcinoma as new predictive biomarkers. *Scientific reports* 7(1):13244.
- Lai SC & Devenish R (2015) Peering into the 'black box' of pathogen recognition by cellular autophagy systems. *Microb Cell* 2(9):322-328.
- Lajoie P, Goetz JG, Dennis JW & Nabi IR (2009) Lattices, rafts, and scaffolds: domain regulation of receptor signaling at the plasma membrane. *The Journal of cell biology* 185(3):381-385.
- Lee SC & Abdel-Wahab O (2016) Therapeutic targeting of splicing in cancer. *Nature medicine* 22(9):976-986.
- Leonidas DD, Vatzaki EH, Vorum H, Celis JE, Madsen P & Acharya KR (1998) Structural basis for the recognition of carbohydrates by human galectin-7. *Biochemistry* 37(40):13930-13940.
- Lepur A, Carlsson MC, Novak R, Dumic J, Nilsson UJ & Leffler H (2012) Galectin-3 endocytosis by carbohydrate independent and dependent pathways in different macrophage like cell types. *Biochimica et biophysica acta* 1820(7):804-818.
- Levy Y, Arbel-Goren R, Hadari YR, Eshhar S, Ronen D, Elhanany E, Geiger B & Zick Y (2001) Galectin-8 functions as a matricellular modulator of cell adhesion. *The Journal of biological chemistry* 276(33):31285-31295.
- Levy Y, Auslender S, Eisenstein M, Vidavski RR, Ronen D, Bershadsky AD & Zick Y (2006) It depends on the hinge: a structure-functional analysis of galectin-8, a tandem-repeat type lectin. *Glycobiology* 16(6):463-476.
- Li S, Wandel MP, Li F, Liu Z, He C, Wu J, Shi Y & Randow F (2013) Sterical hindrance promotes selectivity of the autophagy cargo receptor NDP52 for the danger receptor galectin-8 in antibacterial autophagy. *Science signaling* 6(261):ra9.
- Lim H, Yu CY & Jou TS (2017) Galectin-8 regulates targeting of Gp135/podocalyxin and lumen formation at the apical surface of renal epithelial cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 31(11):4917-4927.

- Lindstedt R, Apodaca G, Barondes SH, Mostov KE & Leffler H (1993) Apical secretion of a cytosolic protein by Madin-Darby canine kidney cells. Evidence for polarized release of an endogenous lectin by a nonclassical secretory pathway. *The Journal of biological chemistry* 268(16):11750-11757.
- Liu FT & Rabinovich GA (2005) Galectins as modulators of tumour progression. *Nature reviews. Cancer* 5(1):29-41.
- Liu Y, Xu L, Zhu Y, Zhang W, Liu W, Liu H & Xu J (2015) Galectin-8 predicts postoperative recurrence of patients with localized T1 clear cell renal cell carcinoma. *Urologic oncology* 33(3):112 e111-118.
- Locatelli D, Terao M, Kurosaki M, Zanellati MC, Pletto DR, Finardi A, Colciaghi F, Garattini E & Battaglia GS (2015) Different Stability and Proteasome-Mediated Degradation Rate of SMN Protein Isoforms. *PLoS one* 10(7):e0134163.
- Lukyanov P, Furtak V & Ochieng J (2005) Galectin-3 interacts with membrane lipids and penetrates the lipid bilayer. *Biochemical and biophysical research communications* 338(2):1031-1036.
- Luo Z, Ji Y, Tian D, Zhang Y, Chang S, Yang C, Zhou H & Chen ZK (2018) Galectin-7 promotes proliferation and Th1/2 cells polarization toward Th1 in activated CD4+ T cells by inhibiting The TGFbeta/Smad3 pathway. *Molecular immunology* 101:80-85.
- Madrigal-Matute J, Lindholt JS, Fernandez-Garcia CE, Benito-Martin A, Burillo E, Zalba G, Beloqui O, Llamas-Granda P, Ortiz A, Egado J, Blanco-Colio LM & Martin-Ventura JL (2014) Galectin-3, a biomarker linking oxidative stress and inflammation with the clinical outcomes of patients with atherothrombosis. *Journal of the American Heart Association* 3(4).
- Mason CP & Tarr AW (2015) Human lectins and their roles in viral infections. *Molecules* 20(2):2229-2271.
- Massardo L, Metz C, Pardo E, Mezzano V, Babul M, Jarpa E, Guzman AM, Andre S, Kaltner H, Gabius HJ, Jacobelli S, Gonzalez A & Soza A (2009) Autoantibodies against galectin-8: their specificity, association with lymphopenia in systemic lupus erythematosus and detection in rheumatoid arthritis and acute inflammation. *Lupus* 18(6):539-546.
- Mauro L, Pellegrino M, Lappano R, Vivacqua A, Giordano F, Palma MG, Ando S & Maggiolini M (2010) E-cadherin mediates the aggregation of breast cancer cells induced by tamoxifen and epidermal growth factor. *Breast cancer research and treatment* 121(1):79-89.
- McDaniel B & Tanner LS (2018) Lupus Erythematosus, Discoid. *StatPearls*, Treasure Island (FL).
- Merani S, Chen W & Elahi S (2015) The bitter side of sweet: the role of Galectin-9 in immunopathogenesis of viral infections. *Reviews in medical virology* 25(3):175-186.
- Merten M & Thiagarajan P (2000) P-selectin expression on platelets determines size and stability of platelet aggregates. *Circulation* 102(16):1931-1936.
- Metz C, Doger R, Riquelme E, Cortes P, Holmes C, Shaughnessy R, Oyanadel C, Grabowski C, Gonzalez A & Soza A (2016) Galectin-8 promotes migration and proliferation and prevents apoptosis in U87 glioblastoma cells. *Biological research* 49(1):33.
- Mignone F, Gissi C, Liuni S & Pesole G (2002) Untranslated regions of mRNAs. *Genome biology* 3(3):REVIEWS0004.
- Montespan C, Marvin SA, Austin S, Burrage AM, Roger B, Rayne F, Faure M, Campell EM, Schneider C, Reimer R, Grunewald K, Wiethoff CM & Wodrich H (2017) Multi-layered control of Galectin-8 mediated autophagy during adenovirus cell entry through a conserved PPxY motif in the viral capsid. *PLoS pathogens* 13(2):e1006217.
- Moriyama T, Tanaka S, Nakayama Y, Fukumoto M, Tsujimura K, Yamada K, Bamba T, Yoneda Y, Fukusaki E & Oka M (2016) Two isoforms of TALDO1 generated by alternative translational initiation show differential nucleocytoplasmic distribution to regulate the global metabolic network. *Scientific reports* 6:34648.
- Mota AL, Evangelista AF, Macedo T, Oliveira R, Scapulatempo-Neto C, Vieira RA & Marques MMC (2017) Molecular characterization of breast cancer cell lines by clinical immunohistochemical markers. *Oncology letters* 13(6):4708-4712.

- Nagae M, Nishi N, Murata T, Usui T, Nakamura T, Wakatsuki S & Kato R (2006) Crystal structure of the galectin-9 N-terminal carbohydrate recognition domain from *Mus musculus* reveals the basic mechanism of carbohydrate recognition. *The Journal of biological chemistry* 281(47):35884-35893.
- Nagy N, Bronckart Y, Camby I, Legendre H, Lahm H, Kaltner H, Hadari Y, Van Ham P, Yeaton P, Pector JC, Zick Y, Salmon I, Danguy A, Kiss R & Gabius HJ (2002) Galectin-8 expression decreases in cancer compared with normal and dysplastic human colon tissue and acts significantly on human colon cancer cell migration as a suppressor. *Gut* 50(3):392-401.
- Nagy N, Legendre H, Engels O, Andre S, Kaltner H, Wasano K, Zick Y, Pector JC, Decaestecker C, Gabius HJ, Salmon I & Kiss R (2003) Refined prognostic evaluation in colon carcinoma using immunohistochemical galectin fingerprinting. *Cancer* 97(8):1849-1858.
- Nedvetzki S, Golan I, Assayag N, Gonen E, Caspi D, Gladnikoff M, Yayon A & Naor D (2003) A mutation in a CD44 variant of inflammatory cells enhances the mitogenic interaction of FGF with its receptor. *The Journal of clinical investigation* 111(8):1211-1220.
- Nefla M, Holzinger D, Berenbaum F & Jacques C (2016) The danger from within: alarmins in arthritis. *Nature reviews. Rheumatology* 12(11):669-683.
- Nikzad H, Haddad Kashani H, Kabir-Salmani M, Akimoto Y & Iwashita M (2013) Expression of galectin-8 on human endometrium: Molecular and cellular aspects. *Iranian journal of reproductive medicine* 11(1):65-70.
- Nishi N, Itoh A, Fujiyama A, Yoshida N, Araya S, Hirashima M, Shoji H & Nakamura T (2005) Development of highly stable galectins: truncation of the linker peptide confers protease-resistance on tandem-repeat type galectins. *FEBS letters* 579(10):2058-2064.
- Nishi N, Itoh A, Shoji H, Miyanaka H & Nakamura T (2006) Galectin-8 and galectin-9 are novel substrates for thrombin. *Glycobiology* 16(11):15C-20C.
- Nishi N, Shoji H, Seki M, Itoh A, Miyanaka H, Yuube K, Hirashima M & Nakamura T (2003) Galectin-8 modulates neutrophil function via interaction with integrin alphaM. *Glycobiology* 13(11):755-763.
- Nishio M (2011) The CH/pi hydrogen bond in chemistry. Conformation, supramolecules, optical resolution and interactions involving carbohydrates. *Physical chemistry chemical physics : PCCP* 13(31):13873-13900.
- Ochieng J, Fridman R, Nangia-Makker P, Kleiner DE, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG & Raz A (1994) Galectin-3 is a novel substrate for human matrix metalloproteinase-2 and -9. *Biochemistry* 33(1994):14109-14114.
- Oishi T, Itamochi H, Kigawa J, Kanamori Y, Shimada M, Takahashi M, Shimogai R, Kawaguchi W, Sato S & Terakawa N (2007) Galectin-3 may contribute to Cisplatin resistance in clear cell carcinoma of the ovary. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* 17(5):1040-1046.
- Overgaard NH, Jung JW, Steptoe RJ & Wells JW (2015) CD4+/CD8+ double-positive T cells: more than just a developmental stage? *Journal of leukocyte biology* 97(1):31-38.
- Oyanadel C, Holmes C, Pardo E, Retamal C, Shaughnessy R, Smith P, Cortes P, Bravo-Zehnder M, Metz C, Feuerhake T, Romero Dt, Roa JC, Montecinos V, Soza A & Gonzalez A (2018) Galectin-8 induces partial epithelial-mesenchymal transition with invasive tumorigenic capabilities involving a FAK/EGFR/proteasome pathway in Madin-Darby canine kidney cells. *Molecular biology of the cell* 29(5):557-574.
- Pace KE, Lee C, Stewart PL & Baum LG (1999) Restricted receptor segregation into membrane microdomains occurs on human T cells during apoptosis induced by galectin-1. *J Immunol* 163(7):3801-3811.

- Pal Z, Antal P, Srivastava SK, Hullam G, Semsei AF, Gal J, Svebis M, Soos G, Szalai C, Andre S, Gordeeva E, Nagy G, Kaltner H, Bovin NV, Molnar MJ, Falus A, Gabius HJ & Buzas EI (2012) Non-synonymous single nucleotide polymorphisms in genes for immunoregulatory galectins: association of galectin-8 (F19Y) occurrence with autoimmune diseases in a Caucasian population. *Biochimica et biophysica acta* 1820(10):1512-1518.
- Palma G, Frasci G, Chirico A, Esposito E, Siani C, Saturnino C, Arra C, Ciliberto G, Giordano A & D'Aiuto M (2015) Triple negative breast cancer: looking for the missing link between biology and treatments. *Oncotarget* 6(29):26560-26574.
- Pardo E, Carcamo C, Uribe-San Martin R, Ciampi E, Segovia-Miranda F, Curkovic-Pena C, Montecino F, Holmes C, Tichauer JE, Acuna E, Osorio-Barrios F, Castro M, Cortes P, Oyanadel C, Valenzuela DM, Pacheco R, Naves R, Soza A & Gonzalez A (2017) Galectin-8 as an immunosuppressor in experimental autoimmune encephalomyelitis and a target of human early prognostic antibodies in multiple sclerosis. *PloS one* 12(6):e0177472.
- Parel Y & Chizzolini C (2004) CD4+ CD8+ double positive (DP) T cells in health and disease. *Autoimmunity reviews* 3(3):215-220.
- Parham P (2003) *Le système immunitaire*. Paris. 407 p.
- Park JE, Chang WY & Cho M (2009) Induction of matrix metalloproteinase-9 by galectin-7 through p38 MAPK signaling in HeLa human cervical epithelial adenocarcinoma cells. *Oncology reports* 22(6):1373-1379.
- Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, Davies S, Fauron C, He X, Hu Z, Quackenbush JF, Stijleman IJ, Palazzo J, Marron JS, Nobel AB, Mardis E, Nielsen TO, Ellis MJ, Perou CM & Bernard PS (2009) Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27(8):1160-1167.
- Parzych KR & Klionsky DJ (2014) An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants & redox signaling* 20(3):460-473.
- Pavel M, Renna M, Park SJ, Menzies FM, Ricketts T, Fullgrabe J, Ashkenazi A, Frake RA, Lombarte AC, Bento CF, Franze K & Rubinsztein DC (2018) Contact inhibition controls cell survival and proliferation via YAP/TAZ-autophagy axis. *Nature communications* 9(1):2961.
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO & Botstein D (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406(6797):747-752.
- Popa SJ, Stewart SE & Moreau K (2018) Unconventional secretion of annexins and galectins. *Seminars in cell & developmental biology* 10.1016/j.semcdb.2018.02.022.
- Portela VM, Zamberlam G & Price CA (2010) Cell plating density alters the ratio of estrogenic to progestagenic enzyme gene expression in cultured granulosa cells. *Fertility and sterility* 93(6):2050-2055.
- Rabinovich GA & Toscano MA (2009) Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nature reviews. Immunology* 9(5):338-352.
- Rabinovich GA, Toscano MA, Jackson SS & Vasta GR (2007) Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. *Current opinion in structural biology* 17(5):513-520.
- Remmelink M, de Leval L, Decaestecker C, Duray A, Crompton E, Sirtaine N, Andre S, Kaltner H, Leroy X, Gabius HJ & Saussez S (2011) Quantitative immunohistochemical fingerprinting of adhesion/growth-regulatory galectins in salivary gland tumours: divergent profiles with diagnostic potential. *Histopathology* 58(4):543-556.
- Reticker-Flynn NE, Malta DF, Winslow MM, Lamar JM, Xu MJ, Underhill GH, Hynes RO, Jacks TE & Bhatia SN (2012) A combinatorial extracellular matrix platform identifies cell-extracellular matrix interactions that correlate with metastasis. *Nature communications* 3:1122.

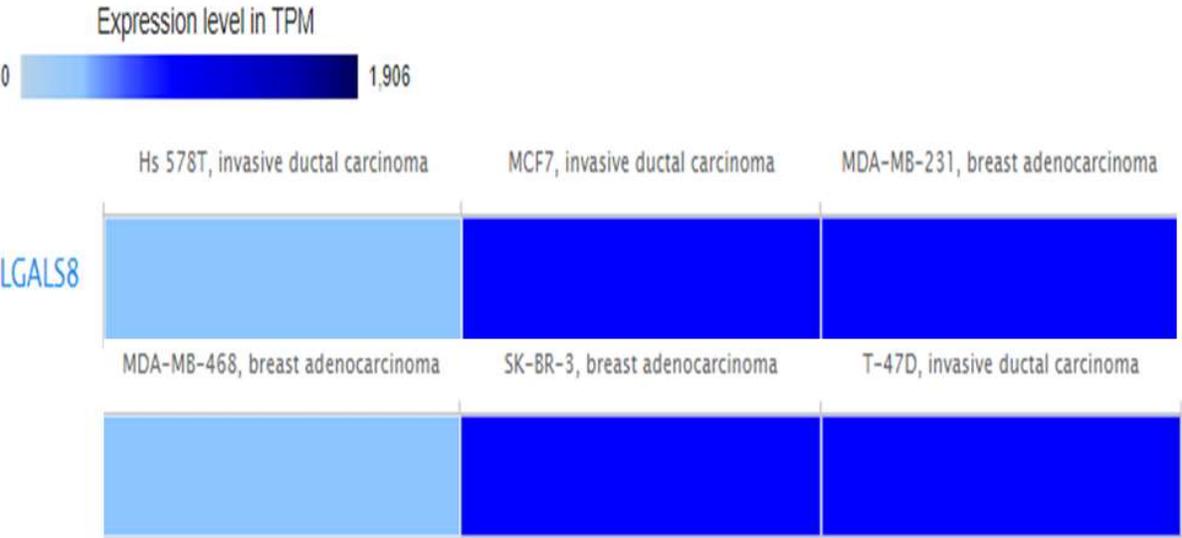
- Romaniuk MA, Tribulatti MV, Cattaneo V, Laponi MJ, Molinas FC, Campetella O & Schattner M (2010) Human platelets express and are activated by galectin-8. *The Biochemical journal* 432(3):535-547.
- Ronkainen NJ & Okon SL (2014) Nanomaterial-Based Electrochemical Immunosensors for Clinically Significant Biomarkers. *Materials (Basel)* 7(6):4669-4709.
- Ross JS, Fletcher JA, Bloom KJ, Linette GP, Stec J, Symmans WF, Pusztai L & Hortobagyi GN (2004) Targeted therapy in breast cancer: the HER-2/neu gene and protein. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 3(4):379-398.
- Rubinsztein DC, Shpilka T & Elazar Z (2012) Mechanisms of autophagosome biogenesis. *Current biology : CB* 22(1):R29-34.
- Rudiger M & Weber K (1993) Characterization of the post-translational modifications in tubulin from the marginal band of avian erythrocytes. *European journal of biochemistry* 218(1):107-116.
- Russo-Marie F, Peltier A & Polla BS (1998) *L'inflammation*. Paris.
- Sakthivel D, Littler D, Shahine A, Troy S, Johnson M, Rossjohn J, Piedrafita D & Beddoe T (2015) Cloning, expression, purification and crystallographic studies of galectin-11 from domestic sheep (*Ovis aries*). *Acta crystallographica. Section F, Structural biology communications* 71(Pt 8):993-997.
- Sampson JF, Hasegawa E, Mulki L, Suryawanshi A, Jiang S, Chen WS, Rabinovich GA, Connor KM & Panjwani N (2015) Galectin-8 Ameliorates Murine Autoimmune Ocular Pathology and Promotes a Regulatory T Cell Response. *PLoS one* 10(6):e0130772.
- Sampson JF, Suryawanshi A, Chen WS, Rabinovich GA & Panjwani N (2016) Galectin-8 promotes regulatory T-cell differentiation by modulating IL-2 and TGFbeta signaling. *Immunology and cell biology* 94(2):213-219.
- Santos AFS, da Silva MDC, Napoleao TH, Paiva PMG, Correia MTS & Coelho LCBB (2014) Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications. *Current Topics in Peptide & Protein Research* 41-62.
- Sarter K, Janko C, Andre S, Munoz LE, Schorn C, Winkler S, Rech J, Kaltner H, Lorenz HM, Schiller M, Andreoli L, Manfredi AA, Isenberg DA, Schett G, Herrmann M & Gabius HJ (2013) Autoantibodies against galectins are associated with antiphospholipid syndrome in patients with systemic lupus erythematosus. *Glycobiology* 23(1):12-22.
- Satelli A, Rao PS, Gupta PK, Lockman PR, Srivenugopal KS & Rao US (2008) Varied expression and localization of multiple galectins in different cancer cell lines. *Oncology reports* 19(3):587-594.
- Sato S, Burdett I & Hughes RC (1993) Secretion of the baby hamster kidney 30-kDa galactose-binding lectin from polarized and nonpolarized cells: a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *Experimental cell research* 207(1):8-18.
- Savin S, Cvejic D, Jankovic M, Isic T, Paunovic I & Tatic S (2009) Evaluation of galectin-8 expression in thyroid tumors. *Med Oncol* 26(3):314-318.
- Schafer T, Zentgraf H, Zehe C, Brugger B, Bernhagen J & Nickel W (2004) Unconventional secretion of fibroblast growth factor 2 is mediated by direct translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* 279(8):6244-6251.
- Scheidel J, Amstein L, Ackermann J, Dikic I & Koch I (2016) In Silico Knockout Studies of Xenophagic Capturing of Salmonella. *PLoS computational biology* 12(12):e1005200.
- Schneider-Poetsch T, Ju J, Eyley DE, Dang Y, Bhat S, Merrick WC, Green R, Shen B & Liu JO (2010) Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nature chemical biology* 6(3):209-217.
- Schulz H, Kuhn C, Hofmann S, Mayr D, Mahner S, Jeschke U & Schmoeckel E (2018) Overall Survival of Ovarian Cancer Patients Is Determined by Expression of Galectins-8 and -9. *International journal of molecular sciences* 19(1).

- Sebastian-Serrano A, de Diego-Garcia L & Diaz-Hernandez M (2018) The Neurotoxic Role of Extracellular Tau Protein. *International journal of molecular sciences* 19(4).
- Si Y, Wang Y, Gao J, Song C, Feng S, Zhou Y, Tai G & Su J (2016) Crystallization of Galectin-8 Linker Reveals Intricate Relationship between the N-terminal Tail and the Linker. *International journal of molecular sciences* 17(12).
- Simpson CD, Anyiwe K & Schimmer AD (2008) Anoikis resistance and tumor metastasis. *Cancer letters* 272(2):177-185.
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lonning PE & Borresen-Dale AL (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(19):10869-10874.
- Spinnenhirn V, Farhan H, Basler M, Aichem A, Canaan A & Groettrup M (2014) The ubiquitin-like modifier FAT10 decorates autophagy-targeted Salmonella and contributes to Salmonella resistance in mice. *Journal of cell science* 127(Pt 22):4883-4893.
- Staring J, von Castelmur E, Blomen VA, van den Hengel LG, Brockmann M, Baggen J, Thibaut HJ, Nieuwenhuis J, Janssen H, van Kuppeveld FJ, Perrakis A, Carette JE & Brummelkamp TR (2017) PLA2G16 represents a switch between entry and clearance of Picornaviridae. *Nature* 541(7637):412-416.
- Stefanidakis M & Koivunen E (2006) Cell-surface association between matrix metalloproteinases and integrins: role of the complexes in leukocyte migration and cancer progression. *Blood* 108(5):1441-1450.
- Steichen AL, Simonson TJ, Salmon SL, Metzger DW, Mishra BB & Sharma J (2015) Alarmin function of galectin-9 in murine respiratory tularemia. *PLoS one* 10(4):e0123573.
- Stowell SR, Arthur CM, Slanina KA, Horton JR, Smith DF & Cummings RD (2008) Dimeric Galectin-8 induces phosphatidylserine exposure in leukocytes through polylectosamine recognition by the C-terminal domain. *The Journal of biological chemistry* 283(29):20547-20559.
- Su ZZ, Lin J, Shen R, Fisher PE, Goldstein NI & Fisher PB (1996) Surface-epitope masking and expression cloning identifies the human prostate carcinoma tumor antigen gene PCTA-1 a member of the galectin gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(14):7252-7257.
- Sugaya S, Chen WS, Cao Z, Kenyon KR, Yamaguchi T, Omoto M, Hamrah P & Panjwani N (2015) Comparison of galectin expression signatures in rejected and accepted murine corneal allografts. *Cornea* 34(6):675-681.
- Sun Y, Cheng L, Gu Y, Xin A, Wu B, Zhou S, Guo S, Liu Y, Diao H, Shi H, Wang G & Tao SC (2016) A Human Lectin Microarray for Sperm Surface Glycosylation Analysis. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 15(9):2839-2851.
- Takeuchi Y & Fukunaga K (2003) Differential subcellular localization of two dopamine D2 receptor isoforms in transfected NG108-15 cells. *Journal of neurochemistry* 85(4):1064-1074.
- Tanida I, Ueno T & Kominami E (2008) LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol* 445:77-88.
- Tellier J, Shi W, Minnich M, Liao Y, Crawford S, Smyth GK, Kallies A, Busslinger M & Nutt SL (2016) Blimp-1 controls plasma cell function through the regulation of immunoglobulin secretion and the unfolded protein response. *Nature immunology* 17(3):323-330.
- Than NG, Romero R, Balogh A, Karpati E, Mastrolia SA, Staretz-Chacham O, Hahn S, Erez O, Papp Z & Kim CJ (2015) Galectins: Double-edged Swords in the Cross-roads of Pregnancy Complications and Female Reproductive Tract Inflammation and Neoplasia. *Journal of pathology and translational medicine* 49(3):181-208.

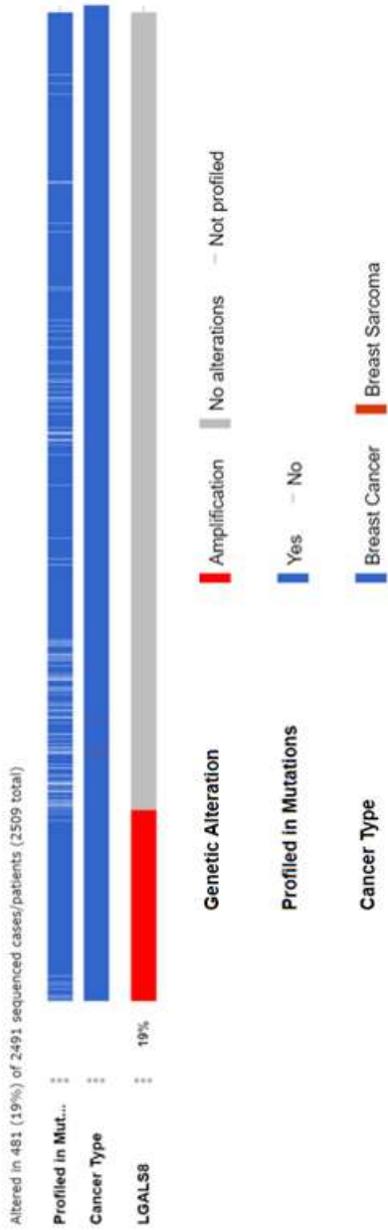
- Thurston TL, Wandel MP, von Muhlinen N, Foeglein A & Randow F (2012) Galectin 8 targets damaged vesicles for autophagy to defend cells against bacterial invasion. *Nature* 482(7385):414-418.
- To WS & Midwood KS (2011) Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair. *Fibrogenesis & tissue repair* 4:21.
- Tribulatti MV, Cattaneo V, Hellman U, Mucci J & Campetella O (2009) Galectin-8 provides costimulatory and proliferative signals to T lymphocytes. *Journal of leukocyte biology* 86(2):371-380.
- Tribulatti MV, Figini MG, Carabelli J, Cattaneo V & Campetella O (2012) Redundant and antagonistic functions of galectin-1, -3, and -8 in the elicitation of T cell responses. *J Immunol* 188(7):2991-2999.
- Tribulatti MV, Mucci J, Cattaneo V, Aguero F, Gilmartin T, Head SR & Campetella O (2007) Galectin-8 induces apoptosis in the CD4(high)CD8(high) thymocyte subpopulation. *Glycobiology* 17(12):1404-1412.
- Troncoso MF, Ferragut F, Bacigalupo ML, Cardenas Delgado VM, Nugnes LG, Gentilini L, Laderach D, Wolfenstein-Todel C, Compagno D, Rabinovich GA & Elola MT (2014) Galectin-8: a matricellular lectin with key roles in angiogenesis. *Glycobiology* 24(10):907-914.
- Tsai CM, Guan CH, Hsieh HW, Hsu TL, Tu Z, Wu KJ, Lin CH & Lin KI (2011) Galectin-1 and galectin-8 have redundant roles in promoting plasma cell formation. *J Immunol* 187(4):1643-1652.
- Van Audenhove I & Gettemans J (2016) Nanobodies as Versatile Tools to Understand, Diagnose, Visualize and Treat Cancer. *EBioMedicine* 8:40-48.
- Vasta GR (2009) Roles of galectins in infection. *Nature reviews. Microbiology* 7(6):424-438.
- Vicuna L, Pardo E, Curkovic C, Doger R, Oyanadel C, Metz C, Massardo L, Gonzalez A & Soza A (2013) Galectin-8 binds to LFA-1, blocks its interaction with ICAM-1 and is counteracted by anti-Gal-8 autoantibodies isolated from lupus patients. *Biological research* 46(3):275-280.
- Viguier M, Advedissian T, Delacour D, Poirier F & Deshayes F (2014) Galectins in epithelial functions. *Tissue barriers* 2:e29103.
- Vinik Y, Shatz-Azoulay H, Hiram-Bab S, Kandel L, Gabet Y, Rivkin G & Zick Y (2018) Ablation of the mammalian lectin galectin-8 induces bone defects in mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 32(5):2366-2380.
- Vinik Y, Shatz-Azoulay H, Vivanti A, Hever N, Levy Y, Karmona R, Brumfeld V, Baraghithy S, Attar-Lamdar M, Boura-Halfon S, Bab I & Zick Y (2015) The mammalian lectin galectin-8 induces RANKL expression, osteoclastogenesis, and bone mass reduction in mice. *eLife* 4:e05914.
- Vladoiu MC, Labrie M & St-Pierre Y (2014) Intracellular galectins in cancer cells: potential new targets for therapy (Review). *International journal of oncology* 44(4):1001-1014.
- Wada J & Makino H (2001) Galectins, galactoside-binding mammalian lectins: clinical application of multi-functional proteins. *Acta medica Okayama* 55(1):11-17.
- Wada S & Kitagawa M (2004) Method of separation and concentration of fetal nucleated red blood cells in maternal blood and its application to fetal diagnosis. *Congenital anomalies* 44(2):72-78.
- Wang Y, Liu J, Huang BO, Xu YM, Li J, Huang LF, Lin J, Zhang J, Min QH, Yang WM & Wang XZ (2015) Mechanism of alternative splicing and its regulation. *Biomedical reports* 3(2):152-158.
- Watanabe T, Nakagawa K, Ohata S, Kitagawa D, Nishitai G, Seo J, Tanemura S, Shimizu N, Kishimoto H, Wada T, Aoki J, Arai H, Iwatsubo T, Mochita M, Watanabe T, Satake M, Ito Y, Matsuyama T, Mak TW, Penninger JM, Nishina H & Katada T (2002) SEK1/MKK4-mediated SAPK/JNK signaling participates in embryonic hepatoblast proliferation via a pathway different from NF-kappaB-induced anti-apoptosis. *Developmental biology* 250(2):332-347.
- Wollina U, Graefe T, Feldrappe S, Andre S, Wasano K, Kaltner H, Zick Y & Gabius HJ (2002) Galectin fingerprinting by immuno- and lectin histochemistry in cutaneous lymphoma. *Journal of cancer research and clinical oncology* 128(2):103-110.

- Wolowiec D & Ffrench M (1996) Kinases dépendantes des cyclines : rôle biologique et implications dans la pathologie humaine. *médecine/sciences* 12(2):165-173.
- Wu S, Liu H, Zhang H, Lin C, Li R, Cao Y, He H, Li H, Shen Z, Qin J & Xu J (2016) Galectin-8 is associated with recurrence and survival of patients with non-metastatic gastric cancer after surgery. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 37(9):12635-12642.
- Yamamoto H, Nishi N, Shoji H, Itoh A, Lu LH, Hirashima M & Nakamura T (2008) Induction of cell adhesion by galectin-8 and its target molecules in Jurkat T-cells. *Journal of biochemistry* 143(3):311-324.
- Yang H, Taylor HS, Lei C, Cheng C & Zhang W (2011) Hormonal regulation of galectin 3 in trophoblasts and its effects on endometrium. *Reprod Sci* 18(11):1118-1127.
- Yang RY, Rabinovich GA & Liu FT (2008) Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert reviews in molecular medicine* 10:e17.
- Yu Q, Shen W, Zhou H, Dong W & Gao D (2016) Knockdown of LI-cadherin alters expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 and galectin-3. *Mol Med Rep* 13(5):4469-4474.
- Zappelli C, van der Zwaan C, Thijssen-Timmer DC, Mertens K & Meijer AB (2012) Novel role for galectin-8 protein as mediator of coagulation factor V endocytosis by megakaryocytes. *The Journal of biological chemistry* 287(11):8327-8335.
- Zhang F, Zheng M, Qu Y, Li J, Ji J, Feng B, Lu A, Li J, Wang M & Liu B (2009) Different roles of galectin-9 isoforms in modulating E-selectin expression and adhesion function in LoVo colon carcinoma cells. *Molecular biology reports* 36(5):823-830.
- Zhang S, Moussodia RO, Vertesy S, Andre S, Klein ML, Gabius HJ & Percec V (2015) Unraveling functional significance of natural variations of a human galectin by glycodendrimersomes with programmable glycan surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(18):5585-5590.
- Zhao C, Wang M, Cheng A, Yang Q, Wu Y, Zhu D, Chen S, Liu M, Zhao X, Jia R, Sun K & Chen X (2018) Programmed cell death: the battlefield between the host and alpha-herpesviruses and a potential avenue for cancer treatment. *Oncotarget* 9(55):30704-30719.
- Zhu WQ & Ochieng J (2001) Rapid release of intracellular galectin-3 from breast carcinoma cells by fetuin. *Cancer research* 61(5):1869-1873.

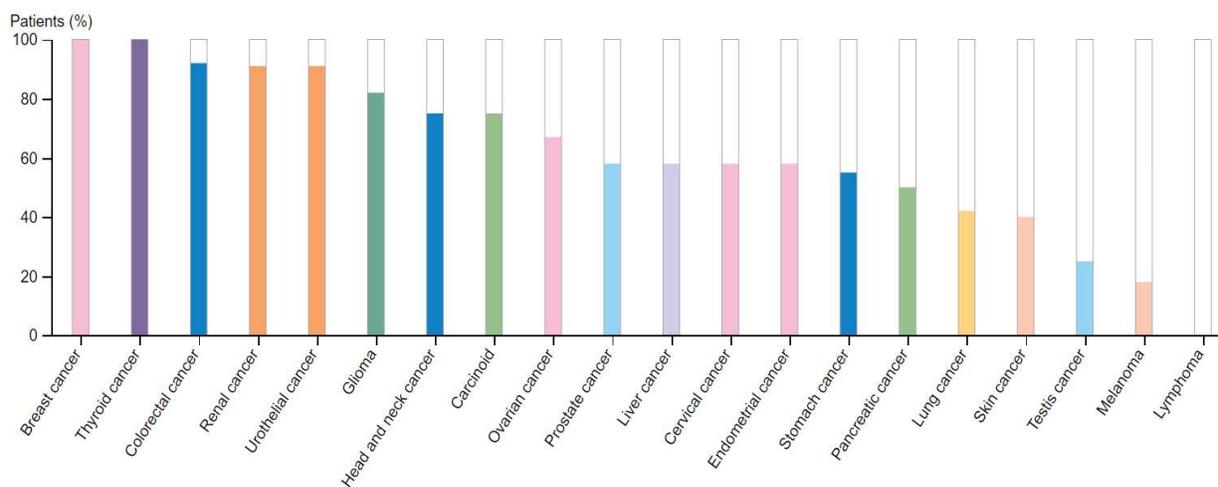
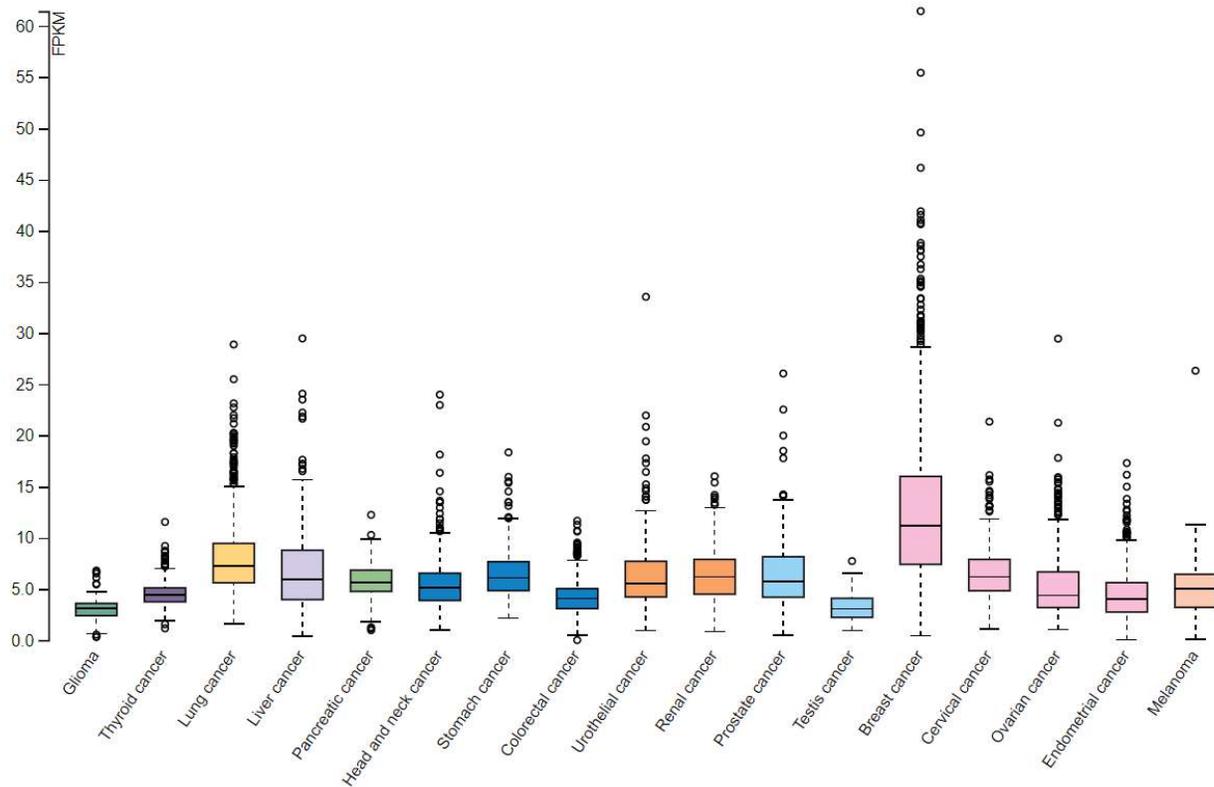
ANNEXES



Annexe 1 : Expression de *Igals8* telle que présentée sur la plateforme *Expression Atlas* (www.ebi.ac.uk/gxa/home) et basée sur les résultats de Barretina et coll. (2012).



Annexe 2 : Expression de *Igals8* telle qu'indiquée sur la plateforme *cBioPortal* (cbioportal.org) et basé sur les résultats de Curtis et coll. (2012) et Pereira et coll. (2016).



Annexe 3 : Expression transcriptionnelle et protéique de la gal-8 telle qu'indiquée sur la plateforme *The Human Protein atlas* (proteintlas.org). Panneau supérieur : Expression transcriptomique de *Igal8* (FPKM) en fonction des différents types de cancer. Panneau inférieur : Pourcentage de patient testé ayant une expression de la gal-8 forte ou moyenne.