

**INRS-INSTITUT ARMAND-FRAPPIER**

**RÔLE DE LA GALECTINE-7  
DANS LE  
DÉVELOPPEMENT DU LYMPHOME.**

PAR  
**MÉLANIE DEMERS**

THÈSE PRÉSENTÉE POUR L' OBTENTION DU GRADE DE  
PHILOSOPHIAE DOCTOR (PH.D.)

**JURY D'ÉVALUATION**

PRÉSIDENT DU JURY : FRANÇOIS DENIS  
EXAMINATEURS EXTERNES : SACHIKO SATO, MARIE AUDETTE  
DIRECTEUR DE RECHERCHE : DR. YVES ST-PIERRE

® DROITS RÉSERVÉS DE MÉLANIE DEMERS, 2007

## RÉSUMÉ GÉNÉRAL

Le lymphome non-Hodgkinien est un des cancers les plus difficilement traitables car il est caractérisé par une croissance anarchique et démesurée. C'est par le biais de métastases que le lymphome progresse vers un phénotype agressif et déjoue toutes nos tentatives de répression par les thérapies. Pour étudier les mécanismes fondamentaux qui contrôlent la dissémination des cellules cancéreuses, notre laboratoire fait appel à un modèle expérimental de lymphomagenèse permettant d'étudier les différents stades du processus métastatique. L'analyse comparative de variants hautement métastatiques et des cellules parentales non-agressives par matrices différentielles d'ADN complémentaire nous a permis d'identifier une forte augmentation de l'expression du gène de la galectine-7 dans les lymphomes agressifs. Cette protéine est surtout reconnue comme marqueur d'épithélium stratifiés et de kératinocytes. Dans cette thèse, nous avons déterminé que la transfection de la galectine-7 dans les cellules lymphomateuses favorisait la croissance et la dissémination du lymphome, et ce en induisant l'expression de gènes pro-métastatiques comme MMP-9, un gène associé à un mauvais pronostic des lymphomes non-Hodgkiniens. Pour la première fois, une fonction pro-métastatique était associée à la galectine-7.

Dans un deuxième temps, nous avons démontré que l'inhibition de la galectine-7, par la transfection d'un antisense du gène dans les variants agressifs réduisait significativement leur potentiel métastatique. De plus, l'analyse par PCR en temps réel de l'ARN de 50 échantillons provenant de patients atteints de néoplasmes lymphoïdes ont révélé qu'une grande proportion exprimait de forts niveaux de galectine-7. En revanche, aucune expression significative de la galectine-7 n'a été détectée dans les lymphocytes normaux.

Finalement, nous avons établi que l'induction de la galectine-7 lors de la progression vers le phénotype agressif n'est pas associée à p53 dans les cellules lymphomateuses. L'analyse du promoteur des variants agressifs en comparaison avec celui des cellules parentales nous a permis de constater que son expression est contrôlée, du moins en partie, via la méthylation de l'ADN. De plus, le clonage fonctionnel du promoteur de la galectine-7 nous a permis de démontrer que son expression semblait également être reliée à l'activation de la voie de l'AMP cyclique. Dans l'ensemble, nos travaux suggèrent que lors de la progression vers le phénotype agressif, les cellules cancéreuses subiraient une pression sélective qui entraînerait des changements intrinsèques favorisant l'activation transcriptionnelle du gène codant pour la galectine-7, entraînant le développement d'un phénotype agressif des lymphomes.

---

Étudiant

---

Directeur de recherche

## REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de recherche le Dr. Yves St-Pierre sans qui cette aventure n'aurait pas été possible. Après m'avoir « sorti de mon dépanneur », il a su me transmettre une véritable passion. Je le remercie, entre autres, pour sa confiance, sa patience, sa disponibilité, sa générosité et sa très grande ouverture d'esprit. De plus, sa direction scientifique m'a permis d'explorer, avec une très grande liberté, une multitude de sujets et d'expériences qui ont approfondi mon expertise. Yves, du plus profond de mon cœur, merci!

Je remercie le Dr. François Denis pour son expertise et ses précieux conseils qui m'ont permis de surmonter certaines embûches expérimentales.

Je remercie aussi le Dr. Édouard Potworowski pour ses critiques constructives au niveau de la rédaction des manuscrits et des présentations orales, de même que le Dr. Thierry Magnaldo pour sa précieuse collaboration.

Je tiens également à exprimer ma gratitude à Steve Moisan, au Dr. Olivier Robledo et au Dr. Pierre-Olivier Estève qui m'ont appris, au meilleur de leurs connaissances, les bases expérimentales de la biologie moléculaire.

Un merci tout spécial aussi à Doris Legault pour son expertise en culture cellulaire et en manipulation animale, sa présence, sa patience, sa grande générosité et son amitié. Mes nombreuses années en sa compagnie au laboratoire ont été des plus agréables.

Merci à tous les gens passés ou présents au laboratoire, pour l'ambiance, les échanges et les encouragements. Un merci particulier à Nathalie, Julie et Caroline pour votre amitié.

Merci à l'ensemble de la communauté de l'INRS-Institut Armand-Frappier pour la culture scientifique offerte durant le programme de doctorat, les conférences et les séminaires.

Merci à la Fondation Armand-Frappier et les Fonds de la Recherche en Santé du Québec pour le soutien financier.

Finalement, un très grand merci à ma famille et mes amis qui m'ont soutenu et encouragé tout au long de cette belle aventure.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ GÉNÉRAL</b>	<i>ii</i>
<b>REMERCIEMENTS</b>	<i>iii</i>
<b>LISTE DES FIGURES</b>	<i>vi</i>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	<i>viii</i>
<b>LISTE DES ANNEXES</b>	<i>ix</i>
<b>LISTE DES ABBRÉVIATIONS</b>	<i>x</i>
<b>CONTRIBUTION DES AUTEURS</b>	<i>xi</i>
<b>REVUE DE LITTÉRATURE</b>	<b>1</b>
<b>1. Processus métastatique.</b>	<b>2</b>
<b>1.1. La dissémination, un processus multiséquentiel.</b>	<b>2</b>
<b>1.2. Théories d'évolution.</b>	<b>5</b>
<b>1.3. Lymphomes : Modèles d'études.</b>	<b>6</b>
1.3.1. Les lymphomes non-hodgkiniens.	7
1.3.2. Gènes associés à la métastase du lymphome.	9
1.3.3. Modèles expérimentaux murins.	9
<b>2. Galectines.</b>	<b>12</b>
<b>2.1. Structure et distribution.</b>	<b>12</b>
<b>2.2. Régulation de l'expression.</b>	<b>16</b>
2.2.1. Galectine-1 : un prototype pour les études de la régulation transcriptionnelle chez les galectines.	16
2.2.2. Éléments transcriptionnels impliqués dans l'expression de la Galectine-3.	17
2.2.3. Éléments transcriptionnels impliqués dans la régulation des autres galectines.	18
<b>2.3. Fonctions des galectines.</b>	<b>19</b>
2.3.1. Fonctions intracellulaires.	20
2.3.2. Fonctions extracellulaires.	22
<b>2.4. Implication des galectines dans le cancer.</b>	<b>31</b>
2.4.1. Progression tumorale.	31
2.4.2. Métastase.	33
<b>3. Galectine-7.</b>	<b>41</b>
<b>3.1. Structure et distribution.</b>	<b>41</b>
<b>3.2. Régulation de l'expression.</b>	<b>42</b>
<b>3.3. Fonctions.</b>	<b>45</b>
<b>3.4. Implication dans le cancer.</b>	<b>49</b>

<b>4. Métalloprotéinase de la matrice-9 (MMP-9).</b>	<b>52</b>
<b>4.1. Structure et expression.</b>	<b>54</b>
<b>4.2. Fonctions.</b>	<b>55</b>
<b>4.3. Implication dans le cancer.</b>	<b>60</b>
4.3.1. Rôle de la MMP-9 tumorale.	60
4.3.2. Rôle de la MMP-9 du stroma.	61
4.3.3. MMP-9 dans le lymphome.	62
<b>5. Méthylation de l'ADN.</b>	<b>64</b>
<b>5.1. Les méthyltransférases de l'ADN.</b>	<b>64</b>
<b>5.2. Inhibition de la transcription par la méthylation.</b>	<b>67</b>
<b>5.3. Méthylation et cancer.</b>	<b>69</b>
<b>CHAPITRE 1</b>	<b>72</b>
<b>Résumé</b>	<b>73</b>
<b>Conclusion</b>	<b>80</b>
<b>CHAPITRE 2</b>	<b>81</b>
<b>Résumé</b>	<b>82</b>
<b>Conclusion</b>	<b>89</b>
<b>CHAPITRE 3</b>	<b>90</b>
<b>Résumé</b>	<b>91</b>
<b>Conclusion</b>	<b>121</b>
<b>DISCUSSION GÉNÉRALE</b>	<b>122</b>
<b>1. Importance de la découverte de la galectine-7 dans la progression tumorale.</b>	<b>123</b>
<b>2. La galectine-7 : un point de départ.</b>	<b>129</b>
<b>3. Futur potentiel de la galectine-7.</b>	<b>132</b>
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE</b>	<b>136</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>138</b>
<b>RÉFÉRENCES</b>	<b>202</b>
<b>LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS</b>	<b>232</b>

## LISTE DES FIGURES

### REVUE DE LITTÉRATURE

<i>Figure 1 : Le processus métastatique.</i>	4
<i>Figure 2 : La famille des galectines.</i>	15
<i>Figure 3 : Fonctions intracellulaires et extracellulaires des galectines.</i>	29
<i>Figure 4 : Propriétés adhésives et anti-adhésives des galectines.</i>	30
<i>Figure 5 : Rôles des galectines dans le processus métastatique.</i>	39
<i>Figure 6 : Promoteurs murin et humain de la galectine-7.</i>	44
<i>Figure 7 : Fonctions associées à la galectine-7 dans les épithéliums stratifiés.</i>	48
<i>Figure 8 : Les gélatinases.</i>	53
<i>Figure 9 : Mécanismes d'inhibition de la transcription par la méthylation.</i>	68

### CHAPITRE 1

<i>Figure 1 : Expression of galectin-7 transfectants and effect on thymic lymphoma growth.</i>	76
<i>Figure 2 : Galectin-7 expression increases lymphoma dissemination.</i>	76
<i>Figure 3 : Histology of liver and kidney metastasis.</i>	77
<i>Figure 4 : Galectin-7 expression overcomes resistance of ICAM-1 deficient mice.</i>	78
<i>Figure 5 : Galectin-7 induces MMP-9 expression in lymphoma cells.</i>	78
<i>Figure 10 : Évolution du lymphome vers un phénotype agressif.</i>	80

### CHAPITRE 2

<i>Figure 1 : Inhibition of galectin-7 expression in antisense transfectants.</i>	84
<i>Figure 2 : Inhibition of mmp-9 gene expression in lymphoma cells transfected with the antisense specific for galectin-7.</i>	84
<i>Figure 3 : Decreased dissemination of lymphoma expressing galectin-7 antisense.</i>	85
<i>Figure 4 : Expression of galectin-7 in lymphoid tumors collected from mice at necropsy.</i>	85
<i>Figure 5 : Quantitative expression of galectin-7 in human lymphoid malignancies.</i>	86
<i>Figure 11 : La galectine-7 une cible thérapeutique potentielle.</i>	89

### CHAPITRE 3

<i>Figure 1 : Analysis of galectin-7 expression in lymphoma cells.</i>	115
<i>Figure 2 : p53 does not correlate with galectin-7 expression in lymphoma cells.</i>	116
<i>Figure 3 : Methylation status of galectin-7 promoter in lymphoma cells.</i>	117
<i>Figure 4 : Galectin-7 is expressed in human cancer cells with impaired methylation.</i>	118
<i>Figure 5 : Mutation of CRE-BP binding site repressed galectin-7 gene activation.</i>	119
<i>Figure 6 : Induction of galectin-7 expression following dibutyryl cAMP treatment.</i>	120
<i>Figure 12 : L'expression de la galectine-7 est induite par l'hypométhylation de l'ADN et l'AMP cyclique.</i>	121

## **LISTE DES TABLEAUX**

### **REVUE DE LITTÉRATURE**

<i>Tableau I : Utilisation de transfectants dans l'étude des galectines dans le cancer.</i>	40
<i>Tableau II : Associations pro- et anti-tumorales de la galectine-7.</i>	51
<i>Tableau III : Inducteurs, supprimeurs et substrats de MMP-9.</i>	59

## LISTE DES ANNEXES

<i>Annexe A : Upregulation of galectin-7 in murine lymphoma cells is associated with progression toward an aggressive phenotype.</i>	139
<i>Annexe B : New roles for matrix metalloproteinases in metastasis.</i>	149
<i>Annexe C : Expression de la galectine-7 par les transfectants 4T1.</i>	181
<i>Annexe D : La galectine-7 diminue la survie des souris.</i>	182
<i>Annexe E : La galectine-7 favorise la dissémination aux poumons.</i>	183
<i>Annexe F : Les carcinomes mammaires humains expriment la galectine-7.</i>	184
<i>Annexe G : The role of DNA hypomethylation in the control of stromelysin gene expression.</i>	185
<i>Annexe H : Triggering of T cell leukemia and dissemination of T cell lymphoma in MMP-9 deficient mice.</i>	193
<i>Annexe I : L'absence de MMP-9 chez l'hôte diminue le potentiel agressif des cellules surexprimant la galectine-7.</i>	200
<i>Annexe J : La galectine-7 inhibe la croissance sous-cutanée du lymphome.</i>	201

## LISTE DES ABBRÉVIATIONS

- ADN** : Acide déoxyribonucléique  
**ADNc** : Acide déoxyribonucléique complémentaire  
**ARN** : Acide ribonucléique  
**5-aza-Cdr** : 5-aza-2-déoxycytidine  
**CRD** : Domaine de reconnaissance des hydrates de ca bone  
**Cre** : *Cyclic AMP response element*  
**DNMT** : *DNA methyltransferase*  
**ICAM** : *Intercellular adhesion molecule*  
**LNH** : Lymphome non-hodgkinien  
**5-mC** : 5-méthyl-cytosine  
**MEC** : Matrice extracellulaire  
**ml** : millilitre  
**mM** : millimolaire  
**MMP** : Métalloprotéinase de la matrice  
**rGal1** : Galectine-1 recombinante  
**rhGal7** : Galectine-7 recombinante humaine  
**rmGal7** : Galectine-7 recombinante murine  
**µg** : microgramme  
**µl** : microlitre  
**µM** : micromolaire

## CONTRIBUTION DES AUTEURS

J'ai effectué tous mes travaux de thèse sous la direction du Dr. Yves St-Pierre, réalisé la majorité des expériences et rédigé les manuscrits décrits dans les trois chapitres. J'ai aussi effectué les expériences faisant partie des annexes de ma thèse.

Dans le premier chapitre traitant d'une nouvelle fonction de la galectine-7, j'ai effectué toutes les expériences et la rédaction du manuscrit sous la supervision du Dr. Yves St-Pierre.

Dans le deuxième chapitre concernant le potentiel thérapeutique de la galectine-7, j'ai proposé et réalisé la stratégie antisense ainsi que les expériences subséquentes avec le modèle expérimental murin. Les échantillons de néoplasmes lymphoïdes proviennent de la Banque de cellules leucémiques du Québec gracieusement offerts par le Dr. Josée Hébert. La quantification de l'expression de la galectine-7 dans les néoplasmes lymphoïdes par PCR en temps réel a été effectuée par Katherine Biron-Pain, étudiante aux études supérieures dans le laboratoire du Dr. Yves St-Pierre. Ces expériences ont été réalisées sous la supervision du Dr St-Pierre et de moi-même. La rédaction du manuscrit s'est faite conjointement avec le Dr. Josée Hébert et par la lecture critique de tous les auteurs.

Finalement, dans le troisième chapitre concernant les mécanismes de régulation transcriptionnelle de la galectine-7, j'ai réalisé toutes les expériences à l'exception de la stimulation des cellules de cancer du sein avec l'agent déméthylant qui a été effectuée par Katherine Biron-Pain. Plusieurs expériences dans la recherche de modèle de transfections transitoires ont aussi été réalisées par Julie Couillard, étudiante aux études supérieures dans le laboratoire du Dr St-Pierre. Le séquençage de p53 de nos cellules de lymphomes a été effectué par Ambra Mari-Giglia sous la supervision du Dr. Thierry Magnaldo à l'Institut Gustave-Roussy en France.

## **REVUE DE LITTÉRATURE**

## **1. Processus métastatique.**

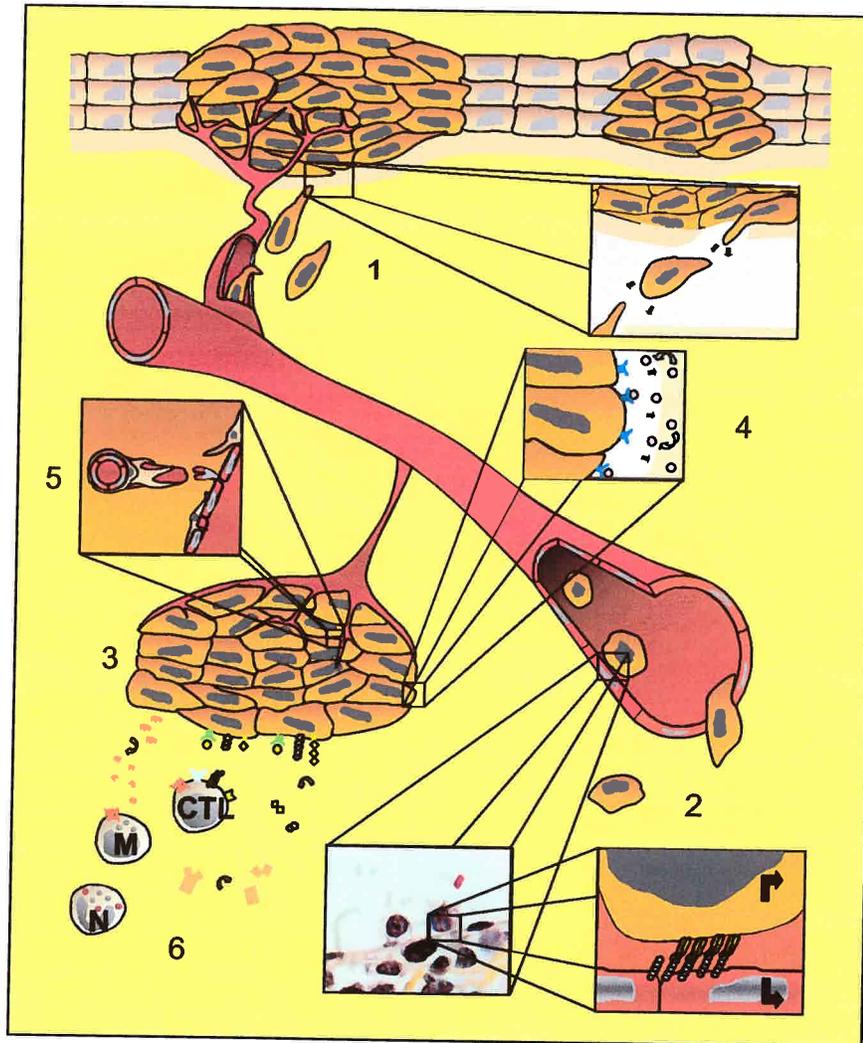
La métastase est un processus multiséquentiel se déroulant en plusieurs étapes où les cellules cancéreuses vont subir des changements dans l'expression de leurs gènes suite, entre autres, aux interactions avec la matrice extracellulaire (MEC), les cellules endothéliales, les cellules péri-tumorales et les facteurs microenvironnementaux (Figure 1). Ces interactions influencent la modulation de l'expression de certains gènes qui peuvent être impliqués dans la migration cellulaire, la prolifération cellulaire, la survie de la cellule, les interactions cellule-cellule ou cellule-matrice, l'angiogenèse (formation de nouveaux vaisseaux sanguins) ou encore dans les mécanismes d'évasion permettant d'échapper au système immunitaire.

### ***1.1. La dissémination, un processus multiséquentiel.***

Lors de dissémination, la cellule cancéreuse doit se détacher de la tumeur primaire puis migrer au travers la MEC. Cette étape nécessite la modulation des interactions cellule-cellule et de l'adhésion cellule-matrice, en plus de la dégradation de la MEC permettant la migration et l'invasion. La cellule cancéreuse doit ensuite migrer au travers des cellules endothéliales et pénétrer les vaisseaux sanguins et/ou lymphatiques. La cellule cancéreuse échappe à la circulation (extravasation) et migre en direction d'un site secondaire afin de s'y établir. Durant l'extravasation, elle rencontre un microenvironnement différent de celui de la tumeur primaire et doit donc s'adapter afin de survivre et de coloniser le tissu secondaire. Plusieurs travaux ont démontré que l'étape limitante dans la formation de métastases se déroule lors des étapes post-extravasation [1-4]. Plusieurs gènes ont été impliqués à chacune des étapes du processus métastatique, mais les diverses études démontrent que l'expression d'un gène donné bien qu'il soit nécessaire est souvent insuffisant pour soutenir le processus métastatique dans son ensemble. Parmi ceux-ci, une variété d'oncogènes ont été impliqués dans le processus métastatique. Par exemple, des mutations des petites protéines de liaison au GTP de la famille Ras sont fréquemment observées dans une variété de tumeurs humaines et leur expression dans divers types cellulaires leur confère un phénotype métastatique [5, 6]. La perte du gène suppresseur de tumeur Nf2 a été impliquée dans le processus métastatique, entre autres, suite à la génération de souris déficientes Nf2<sup>-/-</sup> qui développent des métastases [7]. Des molécules d'adhésion, dont celles de la famille des cadhérines, qui

constituent les jonctions adhérentes et permettent l'adhésion cellule-cellule, sont aussi impliquées dans la métastase [8]. C'est le cas de la E-cadhérine, dont la perte d'expression provoque une diminution de l'adhésion cellule-cellule et qui est fortement associée à la progression du phénotype invasif/métastatique [9]. Une expression aberrante de plusieurs membres de la famille des MMP (metalloprotéinases de la matrice) a également été observée dans une variété de cancers, souvent en association avec des caractéristiques invasives et métastatiques [10-12]. L'adhésion à la MEC est une étape fondamentale à l'invasion et à la migration cellulaire. Les intégrines sont une des familles de molécules d'adhésion qui permettent l'adhésion à la matrice et à la membrane basale lors du processus métastatique. Plusieurs intégrines ont été impliquées dans le processus métastatique [13]. Dépendamment de la composition de la MEC des différents tissus et de l'expression de diverses intégrines par les cellules cancéreuses, plusieurs d'entre elles peuvent être utilisées lors de l'invasion et la migration cellulaire. Par exemple, dans les mélanomes humains, il a été démontré que l'augmentation de l'expression des intégrines  $\alpha_3\beta_1$  est corrélée au potentiel métastatique et à l'invasion tumorale [14]. De plus, afin d'échapper au flux sanguin et d'extravaser hors des capillaires vers l'organe cible, les cellules tumorales doivent adhérer à l'endothélium. Les sélectines exprimées à la surface de l'endothélium entraînent une adhésion hétérophilique faible avec les oligosaccharides en surface de la cellule tumorale ce qui permet un ralentissement. Ce dernier favorise une interaction subséquente plus forte entre d'autres molécules d'adhésion (intégrines, ICAMs) et les signaux engendrés par ces interactions permettent l'extravasation des cellules cancéreuses et leurs confèrent des propriétés invasives [15]. L'extravasation des cellules cancéreuses est aussi influencée par le microenvironnement de certains tissus secondaires, qui semble régir la nidification des cellules tumorales à des sites spécifiques [16].

**Figure 1: Le processus métastatique.** Lorsqu'une tumeur primaire atteint environ un million de cellules, un apport insuffisant en oxygène et nutriments provoque la mort des cellules cancéreuses situées à l'intérieur de la masse tumorale. Dans les tumeurs malignes, les cellules sécrètent des facteurs favorisant l'angiogenèse et leur migration à travers la matrice et à l'intérieur des vaisseaux sanguins ou encore des vaisseaux lymphatiques (1). En général, un peu moins de 1/10 000 cellules s'échappant de la tumeur primaire survivent et acquièrent le potentiel de s'établir à un organe distant pour former une tumeur secondaire. Dans les vaisseaux sanguins les cellules doivent adhérer aux cellules endothéliales ce qui entraîne une activation bidirectionnelle, stimulant l'expression de gènes nécessaire pour l'extravasation (2). Les interactions entre les cellules cancéreuses avec la matrice extracellulaire, les cellules endothéliales et péritumorales et les facteurs microenvironnementaux exercent une pression sélective qui favorise l'émergence de cellules qui ont la capacité de survivre et s'établir dans un nouvel endroit (3). La cellule doit donc exprimer des gènes qui lui permettent, non seulement de proliférer en générant des facteurs de croissance solubles à partir de la matrice extracellulaire (4), et en stimulant l'angiogenèse (5), mais de survivre et d'échapper au système immunitaire (6) [299].



## ***1.2. Théories d'évolution.***

Une tumeur peut être décrite comme une population de cellules individuelles génétiquement et épigénétiquement hétérogènes, progressant dans un environnement particulier. En 1976, Nowell définissait le cancer en tant que processus évolutif [17]. L'évolution clonale sélectionne généralement les cellules qui seront capables de proliférer et survivre, et par le fait même, qui possède des capacités de dissémination. Les altérations génétiques et épigénétiques bénéfiques des cellules tumorales, qui leur permettent de croître, sont donc attribuées suite à leurs interactions avec les cellules et les facteurs microenvironnementaux qui les entourent. Il a été estimé que l'ADN de cellules de carcinomes du côlon possédait environ 11000 altérations génétiques comparativement à l'ADN normal [18]. Le grand nombre de modifications génétiques suggère que la majorité des altérations n'a aucune influence sur la progression tumorale alors que plusieurs sont bénéfiques [19]. À ce jour, seulement 1% de nos gènes codants, plus de 350 gènes, sont connus, en tant que mutants, pour contribuer à l'évolution clonale [20]. De plus, il existe des évidences que plusieurs clones peuvent coexister dans la même tumeur [21], ce qui corrobore le fait que la majorité des modifications n'influence pas la progression. Des changements dans les motifs de méthylation peuvent aussi altérer l'expression des gènes. Comme le taux de méthylation paraît être plus rapide que celui des mutations génétiques, il semble que les phénomènes épigénétiques, plutôt que génétiques, pourraient être impliqués dans l'initiation de la progression tumorale [22, 23].

Les altérations génétiques et épigénétiques génèrent des variations clonales héréditaires et sont responsables de la sélection naturelle qui confère à certains clones un avantage sélectif. Les mutations vont donc lui permettre de proliférer, survivre et générer une population de cellules à son image, possiblement de façon plus rapide [19]. Les mutations peuvent aussi apparaître lors de l'invasion des cellules tumorales suite à des réponses aux facteurs environnementaux. Le processus métastatique requiert que les cellules quittent la tumeur primaire, mais comme seulement quelques cellules ont la capacité de s'établir dans un organe distant, il est possible de croire que les cellules émigrantes de la tumeur primaire n'ont pas obligatoirement un phénotype métastatique pré-établi et que les modifications génétiques et/ou épigénétiques peuvent survenir lors de la dissémination. De plus, la formation de métastases dépend des multiples

interactions entre les cellules métastatiques et les cellules de l'hôte. Selon l'hypothèse du *Seed and Soil*, l'habileté d'une cellule tumorale à croître en un organe spécifique est influencée par les facteurs microenvironnementaux [24]. Certains groupes de gènes impliqués dans la modulation de l'angiogenèse, de la prolifération et du phénotype invasif/métastatique ont été identifiés comme étant régulés par les facteurs microenvironnementaux spécifiques à l'organe [16]. Par exemple, lorsque des cellules de carcinome du côlon sont implantées en des sites ectopiques ou orthotopiques du côlon, il y a croissance tumorale. Par contre, la présence de métastases n'est observée que lors de l'implantation orthotopique. Dans certains types de tumeurs, il a été démontré que la différence dans la formation de métastases est directement corrélée à la production d'enzymes de dégradation de la MEC, comme la MMP-9, par la cellule tumorale suite à l'interaction avec l'environnement orthotopique [25]. Les facteurs présents dans ce microenvironnement favorisent la capacité d'invasion et ainsi la formation de métastases par les cellules de carcinome du côlon alors que les facteurs ectopiques en sont incapables. De plus, des cellules épithéliales mammaires peuvent se développer en carcinome invasif dans un environnement qui mimique un stroma activé par la surexpression de HGF (*hepatocyte growth factor*) et/ou TGF- $\beta$ 1 (*transforming growth factor- $\beta$ 1*) [26]. L'environnement péri-tumoral peut donc favoriser la progression du phénotype agressif des cellules tumorales.

### ***1.3. Lymphomes : Modèles d'études***

Les lymphomes sont des cancers provenant du système lymphatique. Ils résultent de la transformation maligne des lymphocytes. Son développement débute généralement dans les nœuds lymphatiques ou autres parties du système immunitaire et peut se propager d'un organe à l'autre. Les leucémies lymphocytiques, quant à elle, proviennent de la moelle et envahissent le système sanguin. Les lymphomes sont divisés en deux catégories majeures soit les lymphomes de Hodgkin et les lymphomes non-hodgkiniens (LNH). Les lymphomes de Hodgkin se distinguent des autres lymphomes par la présence d'un type cellulaire particulier, les cellules de Reed-Sternberg. Ils ont aussi un motif d'invasion distinct, ils se développent dans des nœuds lymphatiques d'une partie du corps et lorsque la maladie progresse, ils tendent à migrer au niveau du système lymphatique le

plus près, suivant lentement leur chemin jusqu'à l'invasion des poumons, du foie, des os et de la moelle osseuse. Le lymphome de Hodgkin fut un des premiers néoplasmes à être traité par chimiothérapie et radiothérapie. Actuellement, les chances de rémission et de survie suite aux traitements sont excellentes [27, 28]. Au contraire, les LNH sont caractérisés par une croissance anarchique et démesurée provoquant une dissémination systémique précoce [29]. Au Canada, il a été estimé qu'environ 6100 nouveaux cas de LNH allaient être diagnostiqués cette année et 3100 individus allaient en décéder ([www.cancer.ca](http://www.cancer.ca)). Depuis quelques années, les recherches tendent à identifier les mécanismes moléculaires qui régulent la transformation des leucocytes normaux en cellules cancéreuses. Le développement de modèles expérimentaux reproduisant la progression tumorale en contexte physiologique sont en fait des outils très efficaces pour l'identification de nouvelles cibles et marqueurs thérapeutiques.

### ***1.3.1. Les lymphomes non-hodgkiniens.***

Les LNH regroupent plusieurs entités distinctes de maladies provenant de différents types cellulaires. Ils ont chacun des caractéristiques particulières, notamment au point de vue de leur épidémiologie, étiologie, leurs particularités cliniques, réponses aux traitements et valeurs pronostiques. Selon le *World health organisation* (WHO), les LNH ont été classés en 3 sous-groupes soit; les néoplasmes des cellules B, des cellules T et des cellules NK, et ce selon leurs caractéristiques morphologiques, immunophénotypiques et moléculaires [29].

#### *Lymphomes de cellules B.*

Les lymphomes de cellules B représentent plus de 80% des LNH. La diversité des sous-types reflète la lymphomagenèse aux différents stades de maturation des cellules B. Les néoplasmes possèdent donc les caractéristiques phénotypiques et génotypiques du stade de maturation de la cellule B de laquelle ils émergent [30]. Les lymphomes lymphocytiques de cellules B et les lymphome de cellules du manteau sont considérés comme étant dérivés de cellules CD5+ B naïves résidant dans les follicules lymphoïdes. Les lymphomes provenant de cellules du centre germinal sont les lymphomes à cellules B larges et diffuses et les lymphomes de Burkitt. Les lymphomes folliculaires seraient issus

des centroblastes et centrocytes ayant échappé à l'apoptose et surexprimant BCL2 et les lymphomes de cellules B de zone marginale proviendraient de la transformation de cellules B mémoires [29].

#### *Lymphomes de cellules T et NK.*

Les lymphomes originaires de cellules T et NK constituent environ 10-15% des LNH en Amérique. Les lymphomes T à large cellule anaplasique ont des particularités cytologiques et immunophénotypiques spécifiques alors que les lymphome T périphériques regroupent une collection hétérogène de lymphome ne pouvant être jumelés en des sous-types mieux définis [29]. On distingue aussi les lymphomes T cutanés. Pour ce qui est des lymphomes provenant de cellules NK, ils sont classés en 3 types cliniques, soit le type nasal, non-nasal et les leucémies agressives de cellules NK [31].

#### *Stade d'évolution.*

Le stade d'évolution des LNH a d'abord été déterminé par l'utilisation de la classification des lymphomes Hodgkiniens selon la classification d'Ann Arbor [32]. Le système est basé sur la distribution et le nombre de sites atteints. Le stade I implique l'atteinte d'une seule région de nœuds lymphatiques, le stade II se réfère à l'atteinte d'au moins deux régions en un même côté du diaphragme, le stade III est caractérisé par l'atteinte de plusieurs régions des deux côtés du diaphragme alors que le stade IV représente une dissémination aux organes extra-lymphatiques [33]. Comme la classification d'Ann Arbor a été établie en fonction de la progression de lymphomes de Hodgkin, caractérisée par une progression relativement lente contrairement à la dissémination anarchique des LNH, un index international de pronostic a été proposé. L'index est basé sur des facteurs concernant le patient et la maladie, tel l'âge, un stade avancé de la maladie (III ou IV), une concentration sérique de lactate déshydrogénase supérieure à la moyenne et l'atteinte d'au moins deux sites extranodulaires [33].

### **1.3.2. Gènes associés à la métastase du lymphome.**

Depuis quelques années, la recherche sur les mécanismes moléculaires régulant la transformation de leucocytes normaux en cellules cancéreuses a permis d'identifier plusieurs gènes dont l'expression est modifiée lors de la transformation maligne. Parmi ceux-ci, on retrouve des gènes de régulation, comme *p53*, *bcl-2* et *bcl-6*, *cyclin D2*, et *myc*, qui contrôlent les voies cellulaires reliées à l'apoptose, la réparation de l'ADN, et le cycle cellulaire [34-38]. Parmi les gènes ayant été associés avec le phénotype agressif des cellules lymphomateuses, on retrouve *Tiam-1* [39], des gènes codant pour des molécules d'adhésion [40-43], des protéases de la MEC et leurs inhibiteurs [44, 45], et des facteurs de croissance et leur récepteurs [46, 47].

### **1.3.3. Modèles expérimentaux murins.**

Les caractéristiques physiologiques des souris et des humains sont très semblables. En 1937, le magazine Life proclama que le cycle de vie de la souris était le même que celui de l'homme en miniature [48]. Depuis, le décryptage et l'analyse des génomes humains et murins ont permis d'identifier qu'environ 99% des gènes sont semblables [49]. De plus, nous partageons avec les souris des maladies communes, tel le diabète, l'artériosclérose, l'hypertension, l'obésité en plus du cancer et bien d'autres. Leur petite taille, leur courte période de gestation et les informations génétiques disponibles font de la souris un modèle de prédilection pour l'étude génétique, moléculaire et cellulaire des maladies humaines. Au niveau du cancer, plusieurs modèles ont été développés et permettent d'élucider non seulement les mécanismes moléculaires associés à la progression de la maladie, mais aussi l'identification de cibles thérapeutiques potentielles ainsi que les effets engendrés par différents traitements. Parmi les modèles expérimentaux de lymphome on retrouve, entre autres, des cellules provenant de modèles de souris transgéniques ou générées suite à l'induction d'un lymphome thymique.

#### *Souris transgéniques.*

L'utilisation de plusieurs lignées transgéniques par le groupe de Paul Jolicoeur a récemment permis de définir quelques mécanismes moléculaires responsables de la

progression du lymphome. D'abord, la génération de souris surexprimant *c-myc* sous le contrôle du LTR (*long terminal repeat*) de MMTV (*mouse mammary tumor virus*) a démontré que cela représentait un bon modèle d'étude pour le développement spontané de lymphome thymique chez 100% des animaux, et ce en 90-130 jours [50]. La longueur du temps de latence avant le développement tumoral fit cependant croire que le proto-oncogène *c-myc* n'était pas suffisant pour l'initiation de la transformation et que d'autres évènements génétiques devaient collaborer. Par insertion de mutations provirales, suite à l'infection des souris transgéniques avec un rétrovirus, ils identifièrent *Notch1* comme étant un gène cible pouvant être impliqué dans le développement de tumeurs [51]. La génération de souris transgéniques surexprimant la forme sauvage et plusieurs formes mutées de *Notch1* sous le contrôle du gène *cd4* chimérique, contenant un fragment du gène *cd4* humain et le *enhancer* du gène *cd4* murin, a permis l'expression constitutive de *Notch1* ou ses mutants dans les cellules CD4+ [52, 53]. L'analyse comparative de ces souris transgéniques surexprimant a permis d'identifier que certaines mutations provoquaient un dérèglement de la prolifération des lymphocytes et pouvaient à elles seules induire le développement spontané d'un lymphome thymique [53].

#### *Induction d'un lymphome thymique.*

La lignée cellulaire L5178Y est à l'origine du modèle présentement utilisé par le groupe d'Achim Kruger. Cette lignée dérive d'un lymphome thymique induit dans une souris DBA/2 par le méthylcholanthrène [54]. L'établissement de variants métastatiques spontanés leur permis de générer la lignée ESb provenant de la fusion cellulaire avec un macrophage [55]. L'injection intradermique des cellules ESb dans des souris syngéniques entraîne la formation de métastases aux poumons, ce qui leur a permis d'obtenir une lignée encore plus agressive, la lignée ESb-L [55]. De façon à pouvoir détecter leurs cellules et quantifier les métastases spontanées au foie et à la rate, ils ont introduit le gène bactérien *LacZ* dans leurs cellules [56]. Ils ont pu démontrer que l'injection intraveineuse des cellules entraînait la formation de plusieurs colonies métastatiques au foie et que ce processus corrélait avec une augmentation de l'expression de *mmp-9* [57], un gène préalablement associé avec les LNH [58]. L'injection des cellules dans des souris déficientes pour *Timp-1*, l'inhibiteur naturel de MMP-9, exprimé

dans les cellules stromales dans les cas de LNH avancés, leur permis d'observer que les niveaux de Timp-1 dans les tissus prédéterminaient le développement et la progression des lymphomes T [44, 59]. De plus, leur modèle a permis d'identifier des inhibiteurs pouvant réduire la progression du cancer chez la souris [57, 60, 61]. L'utilisation d'un modèle de lymphome très agressif, et causant 100% de mortalité chez les souris inoculées, leur a aussi permis d'établir des mécanismes moléculaires apparentés aux cancers humains et d'évaluer plusieurs inhibiteurs anti-cancéreux ayant un fort potentiel thérapeutique.

#### *Le modèle de Kaplan.*

Suite aux bombardements d'Hiroshima et de Nagasaki, on retrouva chez la population exposée aux radiations une prévalence anormalement élevée de lymphome thymique. Dans le but d'étudier les mécanismes impliqués dans la maladie, Kaplan et ses collaborateurs ont développé un modèle de lymphome en irradiant des souris avec de faibles doses de rayons X [62]. Le traitement induit le développement d'un lymphome thymique en quelques semaines et il est possible de récupérer les cellules cancéreuses et de les maintenir en culture [62]. Ce modèle a mené, entre autres, à l'identification des rétrovirus en tant qu'agent causal lors du développement de certains lymphomes et à mieux définir et caractériser les stades préleucémiques de la progression du lymphome [63, 64].

Notre laboratoire s'est basé sur le modèle de Kaplan afin de générer des lignées cellulaires de lymphome T, notamment à partir de souris transgéniques et pour le développement de variants agressifs. Lorsque ces cellules sont injectées dans le thymus de jeunes souris syngéniques, elles provoquent le développement d'un lymphome thymique habituellement sans métastases en d'autres organes [15]. Les cellules peuvent aussi être injectées par voie intraveineuse, une injection suite à laquelle on retrouve généralement la présence de métastases au foie, à la rate et aux reins [15]. Les lignées cellulaires 164T2 et 267 ont donc été générées par culture *in vitro* d'un lymphome thymique induit suite à l'irradiation de souris C57BL/Ka [65]. Des variants agressifs de ces cellules ont aussi été établis suite à plusieurs passages *in vivo* [66]

## **2. Galectines.**

Plusieurs évidences suggèrent un rôle central des galectines dans le cancer, l'immunité, l'inflammation et le développement, mais aucune représentation globale de leur activité biologique spécifique n'a encore été démontrée. En fait, les galectines sont fonctionnellement bi- ou multivalentes gérant ainsi une multitude de processus biologiques qu'elles soient exprimées à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule. De plus, comme leur nom l'indique, les galectines font parties de la classe des lectines, i.e. des protéines se liant avec plus ou moins de spécificité à des hydrate de carbone fixés sur leurs ligands via la présence de domaine CRD (*carbohydrate recognition domain*). Les galectines sont classées parmi les lectines de type S à cause de la présence d'un groupement thiol libre, ce qui les distingue des sélectines, une famille de lectines de type C et dont la liaison à leurs ligands est dépendante de la présence de calcium. Les galectines sont donc des protéines qui lient des structures d'hydrates de carbone spécifiques, et peuvent ainsi reconnaître des glycoconjugués particuliers parmi le vaste éventail exprimés par les tissus animaux. Néanmoins, les questions concernant la spécificité des récepteurs, leurs nombres sur un type de cellule spécifique, de même que les implications biologiques demeurent largement méconnues.

### **2.1. Structure et distribution.**

Préalablement connue sous le nom de *β-galactoside binding animal lectins*, le terme galectine a été introduit en 1994 par le groupe de Barondes *et al* [67]. Ils proposèrent de désigner les membres de la famille des galectins selon deux critères : posséder une affinité pour les β-galactosides et avoir une similarité de séquence dans le domaine de reconnaissance des hydrates de carbone ayant été identifié par cristallographie à rayon X [68]. C'est ainsi que les galectines sont maintenant définies comme des protéines possédant au moins un domaine de reconnaissance des hydrates de carbone et ayant une affinité pour les β-galactosides [69, 70]. Le CRD des galectines forme un β-sandwich d'environ 135 acides aminés dont les deux feuillets sont légèrement voûtés avec six brins formant le côté concave et cinq brins formant le côté convexe [70]. Jusqu'à ce jour, on dénombre chez les mammifères 14 membres (galectine-1 à 10 et 12 à 15). Les galectines-1, -2, -3, -4, -7, -8, -9 et -12 ont des orthologues chez l'humain, la

souris, le rat et les autres mammifères. Par contre, la galectine-5 a été identifiée seulement chez le rat et se trouve être homologue à l'extrémité C-terminal du CRD de la galectine-9 du rat. La galectine-6 a été retrouvée chez la souris et dénote une forte ressemblance à la galectine-4 murine, alors que les galectine-10 et -13 humaines n'ont trouvé aucun orthologue chez la souris ou le rat [70].

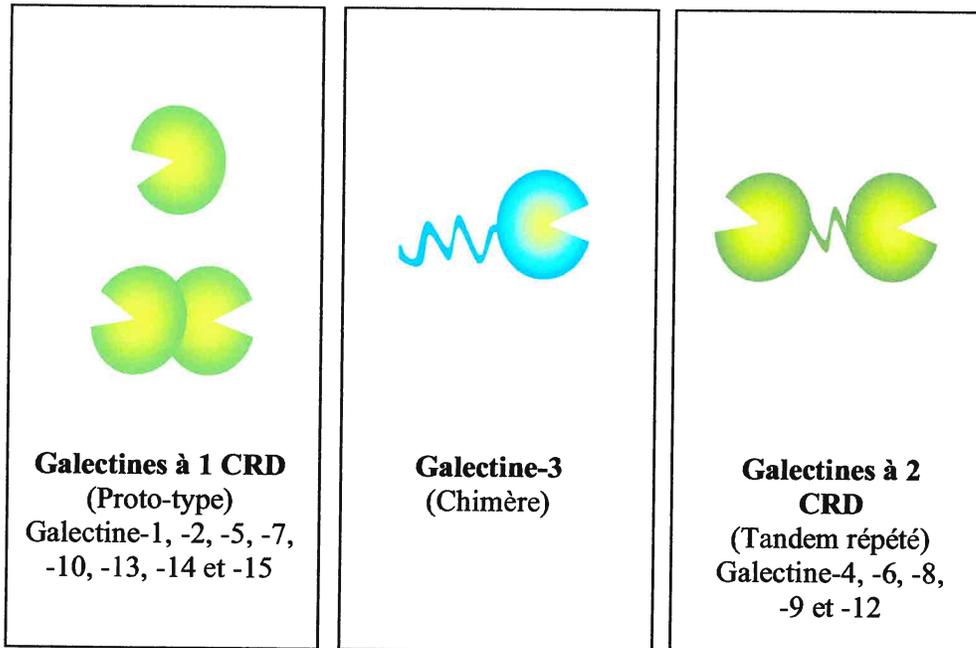
Selon le nombre et l'organisation de leurs domaines CRD, les galectines sont regroupées en 3 sous-types : proto-type, chimère ou tandem répété (Figure 2) [71]. Le domaine CRD n'est associé avec aucun autre type de domaine protéique défini, mais seulement de courts ou longs peptides relativement flexibles. Il peut agir seul ou en association avec un autre domaine CRD et donc les galectines ont la caractéristique de pouvoir être retrouvées sous forme de monomères, dimères ou encore oligomères. Par exemple, la galectine-1 peut se présenter sous forme de monomère ou d'homodimère non-covalent. En fait, elle peut être retrouvée sous forme de dimère en solution mais elle se dissocie spontanément sous forme monomérique à faible concentration [72, 73]. Peu importe la forme sous laquelle la galectine-1 se présente, elle préserve sa capacité à lier les hydrates de carbone, bien que la forme monomérique s'associe avec une plus faible affinité [74]. La galectine-3 a aussi une activité bi- ou multivalente. Il a été démontré *in vitro* que son CRD de même que son domaine N-terminal, seraient impliqués dans la formation de multimères [75]. De par leur structure, on peut donc considérer les galectines comme des protéines fonctionnellement multivalentes.

Les galectines sont localisées dans le cytosol et ont la capacité d'être sécrétées ou transloquées au noyau ou à d'autres compartiments cellulaires. Toutes les galectines ne possèdent pas de peptide signal typique et sont donc sécrétées par une voie non-classique, c'est-à-dire qu'elles ne traversent pas le réseau réticulum endoplasmique-appareil de Golgi. Le mode de sécrétion atypique est donc une caractéristique des galectines, mais le mécanisme par lequel les galectines sont sécrétées reste encore méconnu. Des évidences suggèrent que la galectine-1 pourrait être exportée de façon directe via une translocation du cytoplasme au travers de la membrane cellulaire en association avec un récepteur, alors que la galectine-3 serait transportée par des exosomes dérivés de corps multivésiculaires [76, 77].

Pour ce qui est de leur distribution tissulaire, le motif d'expression des galectines varie chez les différents tissus de l'adulte, il est modulé au niveau du développement et de la différenciation, et est dramatiquement altéré lors de transformation néoplasique et autres processus pathologiques. Il a été démontré que les galectines-1, -3, -4, -6 et -7 étaient exprimés lors du développement et chacune semble impliquée à des stades spécifiques [78]. Outre la galectine-1 qui semble exprimée tout au long du processus embryogénique, mais dont l'expression semble en majorité restreinte aux tissus d'origine mésodermiques, on retrouve spécifiquement l'expression de la galectine-3 lors du processus de formation osseuse et les galectines-4 et -6 lors de la morphogénèse intestinale [79]. Néanmoins, l'ablation génétique des galectines chez la souris ne semble pas affecter de façon significative leur développement [78].

À ce jour, les études chez l'adulte sur les galectines ont démontré que le motif d'expression de certaines d'entre elles, comme la galectine-3, peut s'observer chez les cellules du système immunitaire (cellules T activées, cellules T CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>, monocytes et macrophages, mastocytes), chez les cellules constituant les tissus du système digestif, de même qu'aux cellules de la peau (kératinocytes), des ovaires et des ostéoblastes [80-88]. Il en est de même pour la galectine-1 que l'on retrouve dans les cellules B et T activées, l'épithélium olfactif, les ostéoblastes, et les muscles lisses et squelettiques [67, 89-92]. Par contre, d'autres galectines ont un motif d'expression plus restreint comme la galectine-10 exprimée surtout dans les leucocytes (éosinophiles, basophiles et lymphocytes) [93, 94], alors que d'autres comme la galectine-12 et -14 sont spécifiquement retrouvées dans les tissus adipeux et éosinophiles, respectivement [95, 96]. Une altération de l'expression des galectines est souvent retrouvée dans des conditions pathologiques comme les désordres inflammatoires aigus et chroniques et plusieurs cancers, et sera discutée dans les sections suivantes.

**Figure 2: La famille des galectines.** Structure des 14 membres des galectines comprenant au moins 1 domaine de reconnaissance des hydrates de carbone et ayant une affinité pour les  $\beta$ -galactosides.



## **2.2. Régulation de l'expression.**

La modulation de l'expression des galectines semble hautement régulée lors du développement mais aussi lors de la différenciation. Par exemple, les galectines-1 et -3 démontrent un patron d'expression spécifique lors de la différenciation placentaire, où une diminution de l'expression de la galectine-3 corrèle avec le transit prolifératif versus migratoire [97]. Il en est de même pour la galectine-12 dont l'expression est augmentée lors de l'arrêt de croissance induite par inhibition de contact dans un modèle de différenciation adipocytaire *in vitro*, moment correspondant à l'initiation de la différenciation par les préadipocytes [98]. Dans la section suivante, nous allons aborder les mécanismes transcriptionnels impliqués dans l'expression des galectines.

### **2.2.1. Galectine-1 : un prototype pour les études de la régulation transcriptionnelle chez les galectines.**

La première caractérisation de la région régulatrice des galectines fut celle de la galectine-1. En 1995, Salvatore et *al* démontraient, par transfections transitoires, que la séquence minimale pour l'activité du promoteur murin de la galectine-1 variait de -50/+50 relativement au site d'initiation de la transcription [99]. De plus, ils identifièrent que la présence de deux sites Sp1 entourant les nucléotides -50 et -60 augmentait modérément l'activité transcriptionnelle, soulevant l'hypothèse que d'autres éléments étaient impliqués dans la transcription basale. Ils démontrèrent que l'activité basale était régulée par deux autres éléments, l'un en amont, adjacent à une boîte TATA et l'autre en aval de +10 à +50 nucléotides. D'autres études transcriptionnelles démontrèrent à l'aide plusieurs fragments du promoteur de la galectine-1 que le site Sp1 à la position -57 était responsable de l'induction de la galectine-1 par l'acide butyrique [100]. L'induction de la galectine-1 par l'acide rétinoïque impliquerait, quant à elle, une région plus éloignée localisée de -1578 à -1448 nucléotides [101]. Plus tard, un deuxième site d'initiation de la transcription situé à +31 nucléotides fut identifié, régulant la transcription d'un autre ARNm codant pour la même protéine [102]. Ce phénomène semble être régulé par le recouvrement de l'élément Inr et de la boîte TATA.

L'implication de la méthylation dans la régulation du gène de la galectine-1 fut pour la première fois démontré par la stimulation avec l'agent inhibiteur de méthylation

la 5'-azacytidine [103]. Ensuite, utilisant des enzymes sensibles à la méthylation ou le traitement au bisulfite, des corrélations ont été établies entre l'expression de la galectine-1 et le niveau de méthylation des dinucléotides CpG du gène dans plusieurs lignées cellulaires ou tissus, exprimant ou non la galectine-1 [104-106]. Salvatore et al démontrèrent que la densité des dinucléotides CpG méthylés plus que la spécificité de ceux-ci distinguait les tissus exprimant ou non la galectine-1 [104]. L'induction de la galectine-1 par des inhibiteurs d'histones déacétylases, étroitement relié à la régulation épigénétique via la méthylation de l'ADN, a aussi été démontrée [107].

### ***2.2.2. Éléments transcriptionnels impliqués dans l'expression de la Galectine-3.***

La structure du gène humain de la galectine-3 est similaire au gène murin sauf pour ce qui est de la présence de deux sites d'initiation de la transcription qui sont séparés d'environ 30 nucléotides chez la souris et de seulement deux nucléotides chez l'humain [108, 109]. Chez la souris, les sites d'initiation de la transcription alternatifs mènent à deux ARNm distincts et différenciellement exprimés [108, 110]. En fait, un promoteur interne situé dans le deuxième intron du gène de la galectine-3 produirait le transcrit alternatif *galig* (*galectin-3 internal gene*) [111, 112]. Le promoteur humain, comme le promoteur murin, ne contient pas de boîte TATA en amont du site d'initiation de la transcription [108, 110]. Il contient par contre plusieurs sites de liaison pour le facteur de transcription Sp1, pour les éléments de réponse à l'AMP cyclique (CRE), des sites AP-1, des sites ressemblant aux sites de liaison pour le facteur de transcription NF- $\kappa$ B, et un élément *cis*-inductible [109]. Il a été démontré que lors d'une infection par le HIV-1, la protéine Tat du virus favorise l'expression de la galectine-3, et que cette induction serait dépendante de l'activation de sites de liaison pour le facteur de transcription Sp1 [113]. La galectine-3 peut être considérée comme un gène de réponse précoce puisque son expression peut être rapidement augmentée suite à une stimulation au sérum. Deux régions de réponses à l'activation par le sérum ont été identifiées mais ne démontrent pas de motif de séquence typique [109]. Les auteurs suggèrent que la réponse à la stimulation par le sérum pourrait s'accomplir via l'élément SIE. La présence d'éléments de régulation CRE et NF- $\kappa$ B dans les régions du promoteur suggèrent aussi que l'activation de l'expression de la galectine-3 pourrait aussi être régulée par les voies impliquant

l'AMP cyclique et NF- $\kappa$ B. Bien que l'activation du gène de la galectine-3 par la protéine Tax, lors de l'infection de cellules T par HTLV-1 était indépendante de la voie impliquant les éléments CRE et NF-kB [114], l'implication de NF-kB a été confirmée dans sa régulation suite à un stress chez le macrophage, tout comme le facteur Jun. [115, 116]. Runx2, un facteur de transcription jouant un rôle clé dans le développement squelettique, a aussi été impliqué dans la régulation du gène de la galectine-3 [88]. En fait, la surexpression de Runx2 entraîne une augmentation de l'expression de la galectine-3, alors que son expression est sévèrement diminuée dans les souris déficientes pour Runx2. Récemment, Li et *al* ont démontré, chez le rat, que la région du promoteur -161/+40 était suffisant pour l'activité du gène de la galectine-3 dans le foie. Ils ont également identifié le facteur de transcription Pur $\beta$ , reconnaissant des éléments riches en purine, comme facteur de liaison [117].

Des études récentes ont aussi identifié la méthylation de l'ADN comme mécanisme de régulation de l'expression de la galectine-3. Il a été démontré que le promoteur de la galectine-3 était déméthylé chez la majorité des tumeurs de glandes pituitaires et autres tumeurs exprimant la galectine-3 et que le traitement à la 5'-aza-2'-déoxycytidine (5'-aza-Cdr) induisait l'expression de la galectine-3 dans les lignées cellulaires qui ne l'exprimaient pas constitutivement [118]. Il en est de même dans la lignée de cancer de la prostate LNCaP, n'exprimant pas la galectine-3, où le séquençage du promoteur suite à un traitement au bisulfite a identifié 50 dinucléotides CpG déméthylés après traitement à la 5'-aza-Cdr [119].

### ***2.2.3. Éléments transcriptionnels impliqués dans la régulation des autres galectines.***

Quelques éléments régulateurs potentiels ont été identifiés dans le promoteur de la galectine-2. On y retrouve deux boîtes TATA consécutives, un site Sp1 et un site AP-1 situé en amont des boîtes TATA [120]. La présence de ces sites, sauf pour le site AP-1, a été confirmée [121]. Le promoteur de la galectine-4 reste à ce jour inconnu du point de vue fonctionnel, mais l'implication du facteur de transcription Runx3 dans son expression a été identifiée suite à la transfection du facteur dans une lignée humaine de cellules de cancer gastrique [122]. La séquence de la région régulatrice de la galectine-6, quant à elle, diffère des autres galectines : on y retrouve une boîte TATA, 6 boîtes E (*E box*),

ainsi qu'un élément de régulation similaire à celui de l'apolipoprotéine B ayant été impliqué dans l'expression intestinale spécifique de cette dernière [123]. Les régions régulatrices de la galectine-8 et -9 n'ont pas non plus été caractérisées, mais il a été démontré que la galectine-8 peut être induite par le butyrate de sodium chez les cellules de carcinome du côlon humain [124], alors que la galectine-9 est induite par l'IL-1 $\beta$ , le PMA, l'interféron gamma et l'ARN double brin [125-128]. Pour la galectine-10, il a été démontré que les sites de liaison pour les éléments GATA, la boîte GC et Oct agissaient comme des éléments activateurs, alors que AML serait plutôt un élément répressif [93, 129]. Des études de liaisons par EMSA (*electromobility shift assay*) ont démontré que les éléments Sp1, Oct-1, AML-3 et YY1 se liaient à leur site de reconnaissance de la région régulatrice [93]. De plus, l'élément Sp1 serait nécessaire à l'induction de la galectine-10 par l'acide butyrique. Deux sites de reconnaissances potentiels pour le facteur Sp1 ainsi que quatre sites pour le facteur AP-2 ont été identifiés dans la région promotrice de la galectine-12 [95]. Cette dernière ne possède pas de séquence similaire à une boîte TATA, mais un site potentiel pour le facteur C/EBP. Les promoteurs des galectines-13, -14 et -15 n'ont pas encore été caractérisés.

### **2.3. Fonctions des galectines**

Les galectines sont présentes à l'extérieur comme à l'intérieur des cellules et peuvent donc agir de façon intra ou extracellulaire (Figure 3). À l'extérieur de la cellule, les galectines peuvent lier des glycoconjugués de surface et entraîner une cascade de signaux transmembranaires. De plus, par leur oligomérisation, les galectines peuvent entraîner la liaison de récepteurs à la surface d'une même cellule ou permettre la liaison cellule-cellule ou encore cellule-matrice [130]. À l'intérieur de la cellule, les galectines oscillent entre le noyau et le cytoplasme et peuvent être engagées dans des processus essentiels des fonctions cellulaires de base. Les mécanismes précis qui régissent ces fonctions sont encore méconnus, mais il semble que les galectines interagiraient avec des protéines intracellulaires par des interactions protéine-protéine plutôt que lectine-carbohydre [131, 132].

### **2.3.1. Fonctions intracellulaires.**

#### *Cycle cellulaire et régulation de la transcription de gènes.*

Les cellules épithéliales sont dépendantes d'ancrage et requièrent des interactions cellule-matrice pour leur survie et leur croissance. Afin d'étudier l'implication de la galectine-3 dans ce processus, Kim *et al* ont transfecté le gène codant pour la galectine-3 dans une lignée humaine de cancer du sein [133]. Ils ont démontré que la surexpression de la galectine-3 inhibait l'apoptose et favorisait l'arrêt en G1 du cycle cellulaire suite à la perte d'interaction cellule-matrice. En fait, la galectine-3 inhibe l'expression des cyclines D1 et augmente celle de p21 et p27. Le même groupe a aussi démontré que la galectine-3 augmentait et stabilisait la liaison du facteur de transcription liant CRE et induisait les fonctions trans-activatrice de CREB et Sp1 pour l'activation du promoteur de la cycline D1 [134]. Des études indiquent aussi que la galectine-3 interagirait avec l'homéodomaine du facteur de transcription TTF1 (*thyroid-specific transcription factor 1*) augmentant son activité transcriptionnelle et favorisant la prolifération des cellules thyroïdes [135]. De plus, il semble que la stimulation de la prolifération et de la croissance indépendante d'ancrage, ainsi que l'activité anti-apoptotique de la galectine-3, impliquent la voie K-Ras/MEK [136]. La galectine-3 interagit aussi avec le complexe de transcription dépendant du facteur de cellules T (Tcf). Selon ce modèle, la galectine-3 se lie au complexe  $\beta$ -caténine/Tcf, colocalise avec la  $\beta$ -caténine dans le noyau, induit l'activité transcriptionnelle de Tcf-4 et affecte la stimulation de la cycline D1 et l'expression de c-myc, ce qui induit la croissance et la prolifération [137]. L'interaction de la galectine-1 avec l'intégrine  $\alpha 5$  résulte aussi en une inhibition de la croissance via l'induction de p21 et p27 en stimulant la liaison et la transactivation des facteurs de transcriptions Sp1 et Sp3 [138]. L'effet antiprolifératif résulte d'une inhibition des voies de signalisations Ras/MEK/ERK et de l'induction transcriptionnelle consécutive de p27. La galectine-8 a aussi été identifiée comme inhibiteur de la croissance cellulaire par sa capacité à induire l'accumulation de l'inhibiteur dépendant des cyclines p21 [139]. L'augmentation du taux de synthèse et l'inhibition de la dégradation de p21 par la galectine-8 résulte de l'activation de JKN et PKB. Par contre, cet effet n'est observé que dans certaines lignées humaines de cancer du poumon. La stimulation par la galectine-8 chez le fibroblaste n'entraîne pas l'accumulation de p21 et accélère le processus

apoptotique. La galectine-12 a été identifiée chez les cellules Jurkat synchronisées en phase G1, G1/S mais non en phase mitotique, puis il a été démontré que sa surexpression ectopique entraînait l'arrêt du cycle cellulaire en G1, contrairement à la surexpression de la galectine-9 [140].

#### *Apoptose.*

La galectine-3 est reconnue pour déployer des activités pro et anti-apoptotique selon le type cellulaire, la nature des stimuli qui l'induit et sa localisation cellulaire. Par exemple, une surexpression de la galectine-3 dans des cellules de cancer de la prostate inhibe la sensibilité des cellules à l'apoptose induite chimiquement en diminuant l'expression de Bad et stabilisant la membrane mitochondriale, ce qui résulte en une inhibition de la libération du cytochrome c et de l'activation de la caspase 3 [141]. Il en est de même dans les lymphomes de Burkitt et dans les cellules T, où la surexpression de la galectine-3 augmente la résistance des cellules à l'apoptose induite par Fas ou induite chimiquement [142, 143]. Dans le cancer du sein, la surexpression de la galectine-3 inactive Akt et sensibilise à l'apoptose induite par TRAIL [144]. Au contraire, lorsque la galectine-3 est introduite dans des cellules de cancer de la vessie, elle active Akt et confère une résistance à l'apoptose induite par TRAIL [145]. De plus, par transfection stable de vecteurs d'expression permettant la localisation de la galectine-3 dans des compartiments cellulaires spécifiques, Califice *et al* ont démontré que la galectine-3 cytoplasmique protégeait les cellules contre l'apoptose induite, alors que la galectine-3 nucléaire augmentait la sensibilité à l'apoptose [146].

La galectine-1 a aussi été associée à une fonction pro-apoptotique. En fait, la galectine-1 induit l'apoptose des thymocytes, des cellules T activées et de lignées de cellules leucémiques humaines [147, 148]. L'expression de la galectine-1 par les cellules endothéliales induit l'apoptose des cellules T qui s'y attachent. Des cellules dendritiques surexprimant la galectine-1 entraînent aussi l'apoptose des cellules T activées [149]. De plus, la présentation de galectine-1 par la matrice extracellulaire favorise l'induction de la mort des cellules T [150]. Malgré que la galectine-1 et -3 induisent l'apoptose des cellules T, il a récemment été démontré que ces dernières utilisaient des récepteurs de surface différents pour moduler leur fonction [151]. Il a aussi été démontré que la liaison

de la galectine-2 à des lymphocytes T activés induit l'apoptose de ces derniers en favorisant l'expression des caspases 3 et 9, le clivage du facteur de fragmentation de l'ADN, la libération du cytochrome c, la déstabilisation de la membrane mitochondriale et l'augmentation du ratio bax/bcl-2 [121]. Une fonction pro-apoptotique pour les galectine-8, -9 et -12 a aussi été proposée [95, 152, 153].

#### *Les galectines : un rôle dans l'épissage alternatif?*

La galectine-3 fut la première galectine à se voir associée une fonction dans l'épissage des ARN messagers. L'équipe de Patterson avait identifié la galectine-3 comme composant d'extraits nucléaires ayant la capacité d'épisser les ARNm. Ils se rendirent vite compte que l'extraction de la galectine-3 de leur extrait ne supportait plus la formation du spliceosome et l'épissage des pré-ARNm [154]. Le même groupe démontra plus tard que la galectine-1 faisait aussi partie de leur extrait nucléaire, que l'élimination de l'une ou l'autre des galectines était suffisante pour inhiber l'activité d'épissage, et que la reconstitution de leur extrait par la galectine-1 ou -3 restaurait partiellement la fonction d'épissage [155]. Depuis, l'association de la galectine-1 et -3 avec Gemin4, un membre du complexe de survie des neurones moteurs (SMN) impliqué dans l'assemblage du spliceosome et des ribonucléoprotéines micro-ARN, et la co-immunoprécipitation de la galectine-1 avec le complexe SMN ont apporté de nouveaux éclaircissements sur le mécanisme d'action des galectines dans le phénomène d'épissage alternatif [156-158]. Tout récemment, il fut démontré par immunoprécipitation que les galectine-1 et -3 étaient directement associées avec le complexe d'épissage [159].

#### **2.3.2. Fonctions extracellulaires.**

##### *Adhésion.*

Les galectines ont des fonctions extracellulaires adhésives lorsqu'elles agissent comme ligands pour la reconnaissance de récepteurs, mais aussi anti-adhésives, lorsqu'elles sont présentées comme des protéines solubles qui peuvent bloquer l'accès aux récepteurs (Figure 4). Elles font donc partie d'une nouvelle classe de protéines modulatrices de l'adhésion connues sous le nom de protéines matricellulaires [160, 161]. Beaucoup d'études ont démontré l'adhésion des galectines à des composants de la

matrice extracellulaire et leurs confèrent des fonctions pro- et anti-adhésives. Par exemple, il a été démontré que l'ajout de galectine-1 recombinante (rGal-1) à des mélanomes humains augmentait l'attachement des cellules à la laminine de façon dépendante de la concentration et que la préincubation des cellules avec un anticorps dirigé contre la galectine-1 réduisait cet attachement [162]. Il en est de même pour des cellules de cancers ovariens où l'ajout de rGal-1 augmente l'adhérence de certaines lignées à la laminine-1 et/ou la fibronectine [163]. La fonction pro-adhésive de la galectine-1 a aussi été démontrée par la transfection du gène dans des cellules de cancer du côlon où un plus grand nombre de cellules adhèrent à la laminine, la fibronectine et le collagène [164]. La fonction anti-adhésive de la galectine-1 a aussi été documentée. Le groupe de Barondes a démontré par chromatographie d'affinité que la galectine-1 inhibait la liaison de l'intégrine  $\alpha 1\beta 7$  à la laminine mais non à la fibronectine [165]. L'addition de galectine-1 exogène inhibe, de façon dépendante de la concentration, l'adhésion des cellules T induite par l'IL-2 à la matrice extracellulaire intacte (produite par des cellules de cornée), la laminine, la fibronectine et le collagène de type IV [166]. De plus, pour ce qui est de la galectine-3, il a été démontré que la présence de cette galectine induisait l'adhésion de polymorphonucléaires humains à la laminine [167]. L'induction de l'expression de la galectine-3 par transfection dans des cellules de carcinomes du sein favorise l'adhésion à la laminine, la fibronectine et la vitronectine [168]. Par contre, l'addition de fortes concentrations de galectine-3 à des cellules de cancer du sein inhibe l'attachement au collagène de type IV [169]. Les fonctions pro- et anti-adhésives sont également associées à la galectine-2, la pré-incubation de cellules T avec cette dernière inhibe la liaison au collagène et augmente celle à la fibronectine [121]. Il en est de même pour la galectine-8 et -9 [170-172]. Il est donc permis de croire que les différences dans les fonctions adhésives des galectines aux composants de la matrice extracellulaire sont probablement reliées aux récepteurs exprimés par les divers types cellulaires, les ligands impliqués dans la liaison aux galectines, ou encore la co-expression de plusieurs galectines.

Les galectines lient les  $\beta$ -galactosides des glycoconjugués présentés par des composants de la matrice extracellulaire mais aussi des molécules d'adhésion en surface des cellules. Elles ont été impliquées dans l'adhésion homotypique et hétérotypique. En

fait, la galectine-1 et -3 induisent l'agrégation homotypique de plusieurs types cellulaires. Elles favorisent l'adhésion de cellules de mélanome par l'interaction avec la glycoprotéine 90K, et cette interaction est bloquée par l'addition de lactose et d'un anticorps monoclonal contre 90K ou contre la galectine-3 [173, 174]. Dans des cellules de cancer du sein, il a été suggéré que la galectine-1 et -3 pourraient être impliquées dans l'agrégation homotypique ainsi qu'à l'adhésion aux cellules endothéliales par interaction avec l'antigène Thomsen-Friedenreich [175]. La galectine-1 induit aussi l'adhésion de cellules lymphoblastoïdes à l'épithélium thymique, et cette interaction est bloquée par l'ajout de lactose [176]. La galectine-3, quant à elle, a été impliquée dans l'interaction de cellules de cancer du sein avec des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC) [177] et dans l'interaction de cellules de mélanome avec les poumons, où la galectine-3 sert d'encrage aux cellules tumorales [178]. De plus, dans les cellules dendritiques, l'expression de la galectine-3 serait impliquée dans l'interaction avec les lymphocytes activés exprimant la L-sélectine [179]. Pour sa part, la galectine-9 a été reconnue pour entraîner l'adhésion des éosinophiles à l'endothélium vasculaire. En fait, l'induction de la galectine-9 dans les cellules HUVEC par traitement aux poly-IC augmente l'adhésion des éosinophiles pouvant être inhibée par le lactose ou un anticorps dirigé contre la galectine-9 [128]. L'addition de galectine-9 exogène entraîne l'agrégation des éosinophiles [180] et cellules de mélanomes [181] de façon dépendante de la concentration et l'agrégation de cellules de cancer du sein suite à leur transfection avec le gène codant pour la galectine-9 [172].

### *Migration.*

La migration cellulaire est un processus qui implique l'attachement et le détachement des cellules, mais aussi la modification du cytosquelette et la dégradation de la matrice extracellulaire. Les galectines ont été impliquées dans ces processus. Par exemple, la galectine-1 a récemment été identifiée comme stimulant la migration des cellules dendritiques sur matrigel [182]. Pour ce faire, la galectine-1 favoriserait la maturation des cellules dendritiques et induirait un motif de gènes d'expression unique. Parmi ces gènes, on retrouve trois métalloprotéinases de la matrice MMP-1, MMP-10 et MMP-12, connues pour être impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire.

Il a aussi été démontré, sur des membranes contenant de la laminine ou de la fibronectine et traitées avec la galectine-1, que cette dernière induisait la migration de cellules de muscle lisse vasculaire sur la laminine mais inhibait la migration sur la fibronectine [160, 183]. L'ajout de galectine-1 induit également la migration de glioblastomes, alors que la transfection d'oligonucléotides antisens de la galectine-1 inhibe le pouvoir migratoire [184, 185]. L'utilisation d'oligonucléotides antisens de la galectine-1 et d'anticorps dirigés contre celle-ci a aussi permis de révéler son rôle dans la migration de cellules endothéliales activées [186]. De façon contradictoire, la galectine-1 a été identifiée comme inhibiteur de migration pour certains types cellulaires. Il a été démontré que la présence de galectine-1 inhibait la migration trans-endothéliale des cellules T sans affecter l'adhésion ou la mort cellulaire [187]. La galectine-1 inhiberait aussi la migration des éosinophiles et de cellules de cancer du côlon [188, 189].

La galectine-3 comme la galectine-1 stimulent la migration de plusieurs types cellulaires. En fait, l'expression de la galectine-3 par les cellules endothéliales favorise la migration de celles-ci suite à la liaison avec le protéoglycan NG2 exprimé par les péricytes [190]. Les péricytes stimuleraient ainsi la formation de nouveaux vaisseaux sanguins en stimulant la mobilité des cellules endothéliales avoisinantes. La galectine-3 est aussi responsable de la migration de monocytes et macrophages *in vitro*, et du recrutement de monocytes, neutrophiles et éosinophiles *in vivo*, dans un modèle de poche d'air murin [191]. La galectine-3 module la migration des thymocytes en agissant comme chimioattractant et la présence de laminine potentialise l'induction de la migration, alors que l'ajout d'un anticorps contre la galectine-3 ou de lactose inhibe cette dernière [192]. De façon similaire à la galectine-1, la galectine-3 dévoile des effets migratoires contradictoires. En fait, Le Marer et Hugues ont démontré que l'ajout de galectine-3 exogène en solution ou liée à du matrigel augmente la migration de cellules de carcinome mammaire primaire exprimant de faibles niveaux de galectine-3, alors que des cellules provenant de tumeurs malignes, et exprimant de hauts niveaux de galectine-3 n'étaient pas invasives et insensibles à l'ajout de galectine-3 exogène [193]. De plus, il a été démontré que la galectine-1, mais non la galectine-3, induisait la migration de péricytes spécifique du foie (*Hepatic stellate cells*) [194].

L'effet des galectines sur la migration de certains types cellulaires a aussi été démontré pour les galectines-8 et -9. La galectine-8 stimulerait la migration de cellules d'ovaires de hamster incubées en gouttelettes d'agarose de façon semblable à la fibronectine [170]. Elle augmente la migration d'astrocytes tumoraux à des taux similaires à la galectine-1 mais inférieure à la galectine-3 [195], alors qu'elle diminue la migration de cellules de cancer du côlon [160]. Pour ce qui est des fonctions migratoires de la galectine-9, elles ont été associées à sa capacité de chimioattraction sélective des éosinophiles [180, 196].

#### *Système immunitaire et inflammation.*

Les réponses immunitaires innées et adaptatives sont caractérisées par des changements dans les motifs de glycosylation des effecteurs, mais aussi des cellules du microenvironnement. Les processus d'activation des cellules immunitaires, de différenciation et de migration sont accompagnés de changements dans l'expression des glycosyltransférases et glycosidases qui modulent les motifs de glycosylation des glycoconjugués exprimés à la surface cellulaire [197]. Les galectines sont donc reconnues pour jouer plusieurs rôles dans l'homéostasie lors des réponses innées et adaptatives du système immunitaire, en modulant notamment l'apoptose des cellules T, la prolifération, l'adhésion cellulaire, la chimiotaxie et la synthèse de médiateurs de la réponse immunitaire. Alors que certaines galectines, semblables aux cytokines pro-inflammatoires, contribue à l'amplification de la réponse inflammatoire, d'autres agissent comme des cytokines anti-inflammatoires en réduisant la réponse.

La galectine-1 semble, en général, être un régulateur négatif de la réponse inflammatoire. Les propriétés anti-inflammatoires ont été évaluées dans plusieurs modèles d'inflammation chronique et de maladies auto-immunes incluant l'arthrite, les colites, maladie auto-immune de la rétine et le diabète [149, 198-201]. Les études ont démontré que la surexpression de galectine-1 par les fibroblastes, tout comme l'injection quotidienne de galectine-1 recombinante, diminuait les manifestations cliniques et histopathologiques en diminuant les niveaux d'interféron  $\gamma$  et augmentant l'interleukine-6 dans un modèle expérimental d'arthrite rhumatoïde [198]. Ainsi, la galectine-1 entraîne un changement de la réponse immunitaire Th1 vers une réponse Th2, un effet aussi

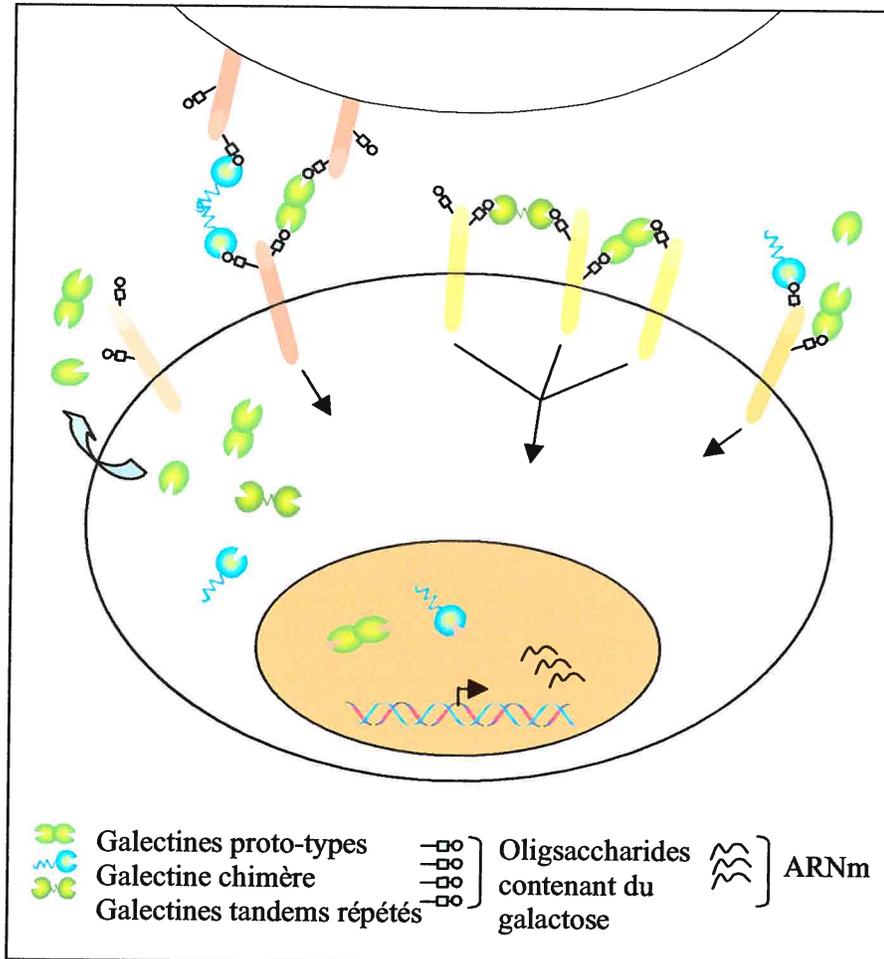
observé lors de maladie auto-immune de la rétine [201]. L'effet protecteur a aussi été démontré dans des modèles d'hépatite et de maladie auto-immune en induisant l'élimination de cellules T activées et une réduction de cytokines pro-inflammatoires [199, 200]. L'apoptose des cellules T activées, mais non les cellules T naïves [202], par la galectine-1 a été démontrée [148, 203, 204]. De plus, la galectine-1 induit l'apoptose des thymocytes immatures, ce qui lui confère un rôle possible dans le thymus durant la sélection en plus du contrôle de la réponse inflammatoire en périphérie [147]. En plus de son rôle dans la survie des cellules T, la galectine-1 favorise l'expansion des cellules T régulatrices *in vivo*, puisque le transfert de cellules régulatrices provenant de souris traitées avec la galectine-1 dans des souris naïves prévient le développement de maladie auto-immune de la rétine [201]. La galectine-1 est exprimée dans les cellules T régulatrices, mais sa surexpression dans les cellules T CD4<sup>+</sup> est insuffisante pour leur conférer une fonction suppressive [205], alors que les cellules régulatrices provenant de souris déficientes pour la galectine-1 démontrent une activité régulatrice réduite [206]. Finalement, la galectine-1 module aussi l'activation des cellules T et influence la production de cytokines [166, 207]. Par contre, dans les lignées myélomonocytiques, la galectine-1 favorise la migration des cellules dendritiques au travers la matrice cellulaire, et la sécrétion d'interleukine-6 [182, 208]. De plus, il a tout récemment été démontré que la galectine-1 modulait l'expression de FcγR1, impliqué lors de la phagocytose, et l'expression de la molécule de CMH de classe II et module ainsi la présentation d'antigène [209].

Des rôles apparemment contradictoires ont aussi été attribués à la galectine-3. En fait, la surexpression de la galectine-3 dans les cellules T protègent les cellules contre l'apoptose [210], alors que son addition exogène l'induit [143]. De plus, elle régule négativement l'activation des cellules T en restreignant le recrutement du TCR au site de présentation d'antigène [211] et réduit leur sécrétion d'interleukine-5 [212]. Bien que la sécrétion de galectine-3 semble stimuler l'apoptose des cellules T et empêche leur activation, de façon générale, les études lui confèrent plutôt un rôle pro-inflammatoire. En effet, les souris déficientes pour la galectine-3 possèdent une réponse inflammatoire atténuée et une réduction du nombre de granulocytes dans la cavité péritonéale lors d'injection de thioglycollate [213, 214]. La galectine-3 induirait également l'adhésion des

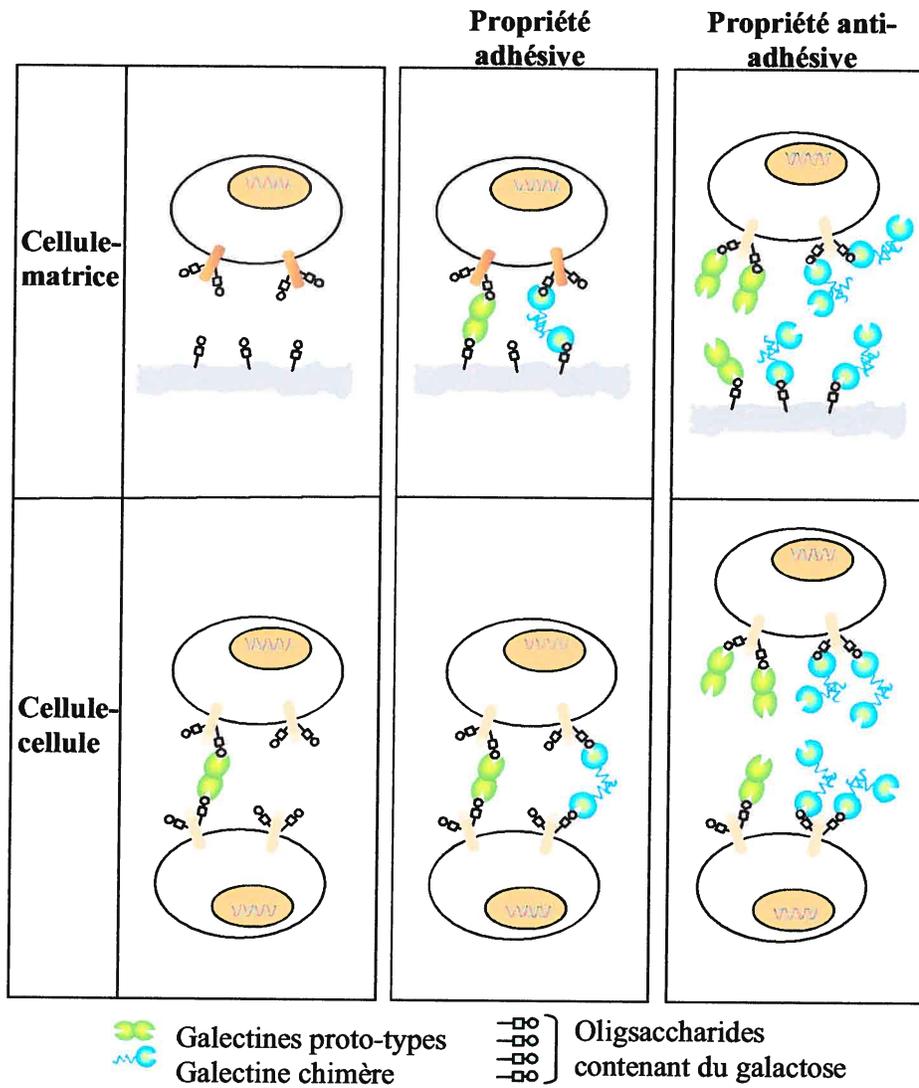
neutrophiles à l'endothélium vasculaire, stimulant leur activation et la production d'interleukine-8 [215-217]. Elle entraîne aussi la chimiotaxie des monocytes et semble impliquée dans la phagocytose des macrophages, puisque des macrophages déficients en la galectine-3 ont une capacité phagocytaire réduite [191, 218]. Dans des modèles murins de maladies inflammatoires, les traitements par la galectine-3 entraînent aussi des effets contradictoires. L'administration intranasale d'un plasmide codant pour la galectine-3 produit un effet thérapeutique significatif dans un modèle d'asthme chronique suite à une diminution d'interleukine-5 et une réduction du recrutement d'éosinophiles aux poumons [219]. De façon contradictoire, dans un modèle d'asthme induit par l'ovalbumine, des souris déficientes pour la galectine-3 démontrent une réponse Th2 et IgE réduites mais une réponse Th1 plus forte [220].

Peu d'études ont cependant associé d'autres galectines au processus inflammatoire. Dans les cas des galectine-2 et -9, elles entraînent l'apoptose des cellules T et causent une immunosuppression en favorisant une réponse Th2 [121, 221]. La galectine-9 serait aussi impliquée dans la maturation des cellules dendritiques et la chimiotaxie des éosinophiles [222, 223]. Les galectines-4 et -8, quant à elles, se sont vu attribuées des fonctions pro-inflammatoires. La galectine-4 entraîne l'activation des cellules CD4<sup>+</sup> et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, alors que la galectine-8 favorise l'activation de neutrophiles [224, 225].

**Figure 3: Fonctions intracellulaires et extracellulaires des galectines.** Les galectines peuvent être exprimées à l'intérieur de la cellule, dans le cytoplasme et le noyau, et interagissent avec les protéines intracellulaires. Elle peuvent aussi être sécrétées dans le milieu extracellulaire, où elles interagissent avec divers récepteurs glycosylés pour entraîner des signaux de transduction de façon autocrine ou paracrine.



**Figure 4: Propriétés adhésives et anti-adhésives des galectines.** Les galectines peuvent lier des glycoconjugués à la surface des cellules ou de la matrice extracellulaire. Si exprimées en grande quantité elles peuvent aussi bloquer l'accès de certains récepteurs et ainsi avoir des propriétés anti-adhésives.



#### **2.4. Implication des galectines dans le cancer.**

Une surexpression des galectines a été observée dans plusieurs types de tumeurs solides et leucémies. Bien que des altérations dans l'expression des galectines ont été associées à la progression tumorale et leurs niveaux d'expression semblent avoir une valeur pronostique [226, 227], les diverses fonctions associées aux galectines leur confèrent également un potentiel certain dans le développement tumoral en contribuant à la progression tumorale par plusieurs mécanismes (Figure 5). Les recherches effectuées jusqu'à maintenant indiquent qu'elles sont impliquées dans la transformation néoplasique, la survie de la cellule tumorale, l'angiogenèse et la métastase (Tableau I). De plus, les galectines sont maintenant reconnues pour avoir un bon potentiel thérapeutique et le développement d'inhibiteurs est présentement en cours.

##### **2.4.1. Progression tumorale.**

###### *Transformation néoplasique.*

L'initiation du développement du cancer se produit lorsqu'une cellule normale subit une transformation néoplasique, résultat d'une altération dans les mécanismes de régulation du cycle cellulaire et d'apoptose. Des études utilisant la surexpression ou l'inhibition de l'expression des galectines par transfection de l'ADN codant ou d'un ADN antisens ont démontré l'implication des galectines dans ce phénomène. C'est ainsi que Yamaoka *et al* ont démontré que la transfection du gène codant pour la galectine-1 dans des fibroblastes induisait leur transformation en rendant leur croissance indépendante d'ancrage, diminuant leur inhibition de contact, la formation de colonies en agar et la formation de tumeur dans des souris *nude* [228]. Ils démontrèrent plus tard, utilisant une stratégie antisens, que l'inhibition de la galectine-1 dans les gliomes entraînait une réversion au phénotype normal [229]. La galectine-3 a aussi été impliquée dans la transformation néoplasique de carcinome thyroïde, où son expression est nécessaire pour le maintien du phénotype transformé [230], alors que sa surexpression dans des cellules folliculaires provoque la transformation des cellules [231]. L'introduction d'un antisens spécifique contre la galectine-3 dans des cellules de cancer du sein résulte en une altération de la morphologie, une perte de croissance indépendante de sérum et d'ancrage et l'acquisition de propriétés d'inhibition de contact, renversant les

cellules à un phénotype normal [232]. Les mécanismes par lesquels les galectine-1 et -3 induisent la transformation néoplasique sont encore méconnus, mais il a été démontré que ces dernières interagissent avec l'oncogène Ras. En fait, la galectine-1 est nécessaire pour la localisation de H-Ras à la membrane, où il devient actif, et l'inhibition de la galectine-1 ou l'utilisation d'un dominant négatif de H-Ras empêche la transformation [233]. La galectine-3, quant à elle, augmente l'expression de K-Ras et sa colocalisation avec ce dernier active la transformation de cellules du cancer du sein [136]. Ainsi, la transformation néoplasique induite par les galectines semble, du moins en partie, liée à leur interaction avec les oncogènes Ras.

#### *Survie.*

Contrairement aux cellules épithéliales dont la survie dépend des interactions cellule-cellule ou cellule-matrice, les cellules cancéreuses acquièrent souvent un phénotype semblable aux fibroblastes, qui sont motiles et survivent sans ces interactions. Des études ont montrées que la galectine-3 favorisait la survie des cellules tumorales en prévenant l'apoptose de cellules dépendantes d'ancrage, comme les cellules épithéliales de cancer du sein [133]. Le même groupe démontra aussi que les transfectants étaient résistants à l'apoptose induite par la genistéine [234] et que la présence de galectine-3 protégeait les cellules tumorales de la mort induite par les radicaux libres générés lors d'une ischémie/réperfusion hépatique [235]. De plus, Matarrese *et al* ont démontré que la surexpression de la galectine-3 dans une autre lignée de cancer du sein entraînait l'apparition de caractéristiques morphologiques de cellules mobiles et induisait la résistance à l'apoptose induite par une combinaison de cytokines et les radiations UVB [168].

Dans les cas de cancers hématologiques, il a été démontré que la galectine-3 est surexprimée dans plusieurs lymphomes B diffus et que la transfection du gène dans la lignée de lymphomes B Raji, n'exprimant pas la galectine-3, la protège contre l'apoptose induite par Fas [142]. Il en est de même dans les lymphomes T Jurkat où la galectine-3 protège contre l'apoptose induite par Fas et la staurosporine [210].

D'autre part, une diminution de l'expression de la galectine-3 a été observée dans le cancer de la prostate, où l'expression cytoplasmique de la galectine-3 semble être

associée avec la progression de la maladie [236, 237]. Il en est de même pour les mélanomes où les niveaux d'expression de galectine-3 cytoplasmique plus élevés que les niveaux nucléaires corrélerent avec un mauvais pronostic [238]. Une double fonctionnalité a été associée à la galectine-3 dans le cancer de la prostate, un rôle de suppression tumorale par la galectine-3 nucléaire et un rôle de promotion de la tumeur par la galectine-3 cytoplasmique [146]. De plus, il a été démontré que l'expression de galectine-3 mutante, ne pouvant pas transloquer du noyau vers le cytoplasme, n'avait pas la capacité de protéger les cellules contre l'apoptose [239]. Les mécanismes de résistance à l'apoptose des cellules cancéreuses par la galectine-3 restent encore méconnus, mais il a récemment été démontré que la galectine-3 régulait l'expression de Bax, l'intégrité mitochondriale, l'inhibition de la libération du cytochrome c et l'activation de la caspase-3 [141].

#### **2.4.2. Métastase.**

##### *Adhésion et angiogénèse.*

Le processus métastatique implique beaucoup de changements dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice. La cellule cancéreuse doit se détacher de la tumeur primaire, puis se lier aux cellules endothéliales pour initier le processus d'extravasation qui la mènera à un endroit propice pour sa prolifération (un processus que l'on peut définir comme étant la 'nidification' de la métastase) en s'attachant aux protéines de la matrice ou autres cellules.

Les galectines, par leurs fonctions multivalentes, peuvent bloquer ou encore favoriser les diverses interactions (Figure 4). La sécrétion de galectines par les cellules cancéreuses pourrait perturber les liaisons entre les cellules adjacentes ou avec la matrice ou encore favoriser leur interaction avec le microenvironnement en formant des ponts entre la cellule cancéreuse et autres cellules ou la matrice extracellulaire. Les cellules environnantes peuvent aussi sécréter des galectines et favoriser les cellules cancéreuses. Par exemple, les cellules endothéliales expriment en surface la galectine-1 et -3, et il a été démontré que l'addition d'un anticorps contre la galectine-1 inhibait l'adhésion de cellules de lymphomes sur les cellules endothéliales [240]. De plus, l'activation des cellules endothéliales résulte en une augmentation de l'expression de galectine-1 pouvant

favoriser l'extravasation de la cellule cancéreuse [241]. Il en est de même pour la galectine-9 retrouvée dans les cellules de veines ombilicales humaines stimulées par l'interféron  $\gamma$  [127]. Le milieu conditionné de cellules de cancer de la prostate ajouté à des cellules HUVEC augmente aussi l'expression de la galectine-1 [242]. Les galectines exprimées par les cellules cancéreuses et endothéliales favorisent leurs interactions. Étudiant l'implication des galectines dans l'adhésion de cellules de cancer du sein à une monocouche de cellules HUVEC, Glinsky *et al* ont démontré que les galectine-1 et -3 réagissaient différemment sur les cellules cancéreuses et endothéliales [175]. En fait, par microscopie confocale, ils ont observé la prédominance du signal de galectine-1 sur la cellule cancéreuse aux sites de contact avec l'endothélium, suggérant l'implication de ligand sur l'endothélium et l'accumulation de la galectine-3 au site de contact, mais dans les cellules endothéliales. Le même groupe démontra ensuite que l'expression de la galectine-3 dans les cellules tumorales s'accumulait dans les sites de contacts homotypiques [177].

L'expression des galectines dans les endothéliums spécifiques à certains organes suggère que ces dernières pourraient aussi avoir un rôle dans le recrutement de cellules tumorales à un endroit propice à leur nidification. Krishnan *et al* ont démontré que les cellules endothéliales de poumon de souris exprimaient beaucoup de galectine-3 et suggèrent l'implication de LAMP-1 comme ligand lors de formation de métastases au poumons dans un modèle de mélanome [178]. En plus de la liaison de galectine-3 aux cellules endothéliales, il a été démontré que cette dernière favorisait la formation de tubes capillaires *in vitro* et l'angiogenèse *in vivo* [243]. La co-injection sous-cutanée de clones de cancer du sein surexprimant la galectine-3 et matrigel dans des souris *nude* entraîne une densité capillaire significativement plus grande que les cellules témoins. De plus, la galectine-3 a été identifiée comme ligand de NG2, un protéoglycan transmembranaire induisant la migration des cellules endothéliales, l'assemblage du réseau et stimulant l'angiogenèse [190]. Le complexe NG2/galectine-3/intégrine  $\alpha 3\beta 1$  serait important pour la migration des cellules endothéliales induite par NG2 exprimés sur les péricytes, ce qui laisse entrevoir un rôle de ce complexe dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. La galectine-3 influence aussi l'angiogenèse dans un modèle de cancer de la prostate, où l'injection de transfectants exprimant la galectine-3 cytoplasmique, dans un

modèle de xénogreffe de souris athymique, entraîne une plus forte vascularisation comparativement aux cellules témoins [146].

Récemment, la galectine-1, souvent surexprimée dans les cellules endothéliales de tumeurs, a aussi été démontrée comme essentielle à l'angiogenèse tumorale [186]. L'injection sous-cutanée de tératocarcinomes dans des souris déficientes en galectine-1 entraîne une réduction de la croissance tumorale, une diminution de la quantité de vaisseaux sanguins et une altération de l'architecture du réseau comparativement aux souris sauvages.

#### *Invasion tumorale.*

Les fonctions migratoires associées aux galectines mettent en évidence leur potentiel lors de l'invasion tumorale. Une plus forte expression des galectines-1, -3 et -8 est retrouvée dans les parties invasives de xénogreffes de glioblastomes suggérant une implication dans l'invasion des astrocytes tumoraux [195]. L'expression de la galectine-3 corrèle aussi avec la progression de cancer du côlon, la métastase au foie et un pauvre pronostic des patients atteints [244]. De plus, une surexpression de la galectine-3 dans des cellules de cancer du poumon augmente la mobilité et l'invasion *in vitro* [245] et entraîne le remodelage du cytosquelette dans des cellules de cancer du sein [168]. De plus, les galectines lient les intégrines. Par exemple, la galectine-1 lie  $\alpha 7\beta 1$  [165],  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$  et  $\alpha 4\beta 7$  [246], alors que la galectine-3 lie  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$  [169, 190], et recrute  $\alpha 5\beta 1$  [247]. La galectine-8, quant à elle, interagit avec  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$  [170],  $\alpha M/CD11b$  [225] ainsi que  $\alpha 1\beta 1$  et  $\alpha 5\beta 1$  [248]. Comme les intégrines ont d'importants rôles dans le contrôle de la migration [249] et l'invasion tumorale, il est possible que les galectines régulent la mobilité cellulaire et l'invasion par activation ou induction de l'expression des intégrines. L'association des galectines avec les MMP pourrait aussi s'avérer un mécanisme possible par lequel elles favorisent l'invasion tumorale. Certains membres des galectines ont été démontrés comme étant clivés par des membres des MMP [169, 250]. De plus, la liaison des galectine-3 et -8 à MMP-9 porte à croire que l'interaction pourrait moduler le recrutement ou l'activation de cette MMP lors de dégradation de la matrice [225, 251].

### *Échappement du système immunitaire.*

Nous avons vu auparavant que les galectines sont exprimées par plusieurs cellules du système immunitaire et modulent leurs fonctions. Elles peuvent donc théoriquement du moins affecter les réponses immunitaires et inflammatoires de l'hôte contre la tumeur. De plus, les galectines peuvent être sécrétées par la cellule tumorale, comme les cytokines et chimiokines, et moduler une variété de réponses inflammatoires [130, 252]. Par exemple, la galectine-1 inhibe l'activation des cellules T [253], induit l'arrêt et la croissance des cellules T activées [148], et supprime la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires [166], donc l'expression de galectine-1 par la cellule tumorale pourrait favoriser sa survie en diminuant sa reconnaissance par le système immunitaire. En fait, dans une étude des plus élégantes, Rubinstein *et al* ont démontré que la transfection d'un ADNc antisens de la galectine-1 dans des cellules de mélanomes diminuait, de façon dépendante de la concentration, la croissance de tumeurs suite à l'injection sous-cutanée des cellules dans des souris [254]. La déplétion des cellules CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> dans les souris rétablie partiellement la croissance tumorale, alors que la déplétion des cellules CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> abolie complètement la résistance des souris. De plus, la réinjection de cellules tumorales sauvages dans des souris ayant préalablement rejeté les transfectants antisens résulte en une inhibition de la croissance tumorale. Il a aussi été démontré que le milieu conditionné de cellules de cancer de la prostate induisait l'expression de la galectine-1 sur les cellules endothéliales, et inhibait la migration transendothéliale des cellules T, un effet inhibé par l'ajout d'un anticorps contre la galectine-1 [187]. Ainsi, l'activation de cellules endothéliales par les cellules cancéreuses peut moduler l'expression de galectines et favoriser l'échappement au système immunitaire. Les galectines peuvent aussi moduler l'infiltration ou la survie des cellules immunitaires puisqu'une corrélation inverse entre l'expression de la galectine-1 et l'expression de CD3 a été observée dans des carcinomes humains [255] et il a été établie que l'expression de la galectine-3 corrélait avec l'apoptose de lymphocytes associés à la tumeur dans des biopsies de mélanomes [256].

### *Potentiel thérapeutique.*

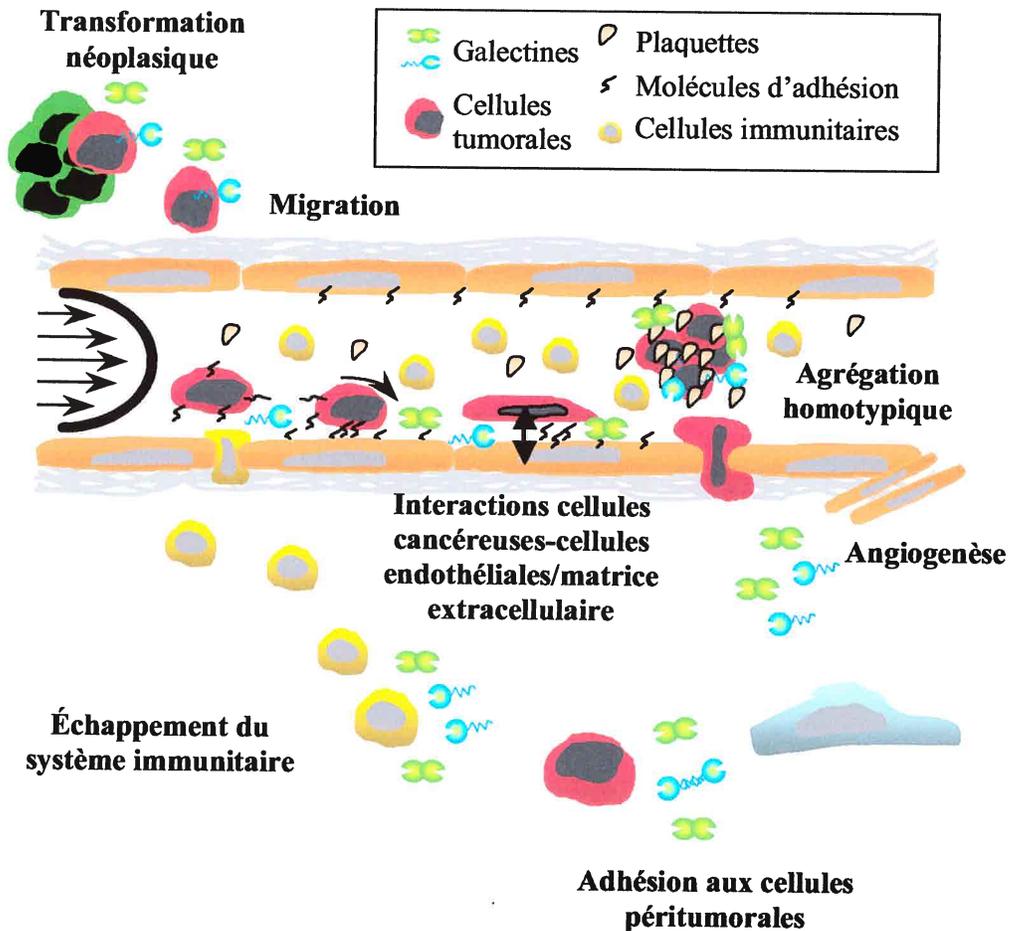
Quelques études ont démontré que l'inhibition des galectines par la transfection d'ADNc antisens altérait la progression tumorale. En fait, la transfection d'un antisens de la galectine-3 dans des cellules de cancer du côlon réduit la colonisation du foie et la formation de métastases spontanées [257] et inhibe la croissance tumorale de cancer du sein dans les souris *nude* [232]. L'utilisation d'anticorps contre la galectine-3 s'est aussi avérée bénéfique pour l'inhibition de la croissance de métastases au foie dans un modèle de cancer du côlon [258]. L'inhibition de la galectine-1, quant à elle, réduit la croissance de gliomes [229], et augmente la survie de souris *nude* après la greffe intracrâniale de glioblastomes [184]. Certains composés ont donc été évalués pour bloquer la progression tumorale due aux galectines. L'équipe de Raz a ainsi démontré qu'une pectine de citron modifiée administrée par voie orale inhibait la métastase spontanée dans un modèle de cancer de la prostate [259]. De la même façon, la pectine inhibe la croissance tumorale, l'angiogenèse et la métastase aux poumons dans un modèle de cancer du sein et de cancer du côlon [260]. Ainsi, les auteurs démontrèrent que la consommation de pectine inhiberait l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo* en bloquant l'association de la galectine-3 avec son ligand. De plus, le développement de peptides synthétiques spécifiques dirigés contre le domaine de reconnaissance des hydrates de carbone de la galectine-3 a démontré que l'utilisation de ces derniers pouvait inhiber les fonctions de la galectine [261]. La présence du peptide inhibe l'adhésion *in vitro* de cellules du cancer du sein sur monocouche de cellules endothéliales en condition de flux sanguin, bloquant ainsi l'interaction de la galectine avec son ligand. L'utilisation d'analogues de glycoamines diminue aussi la formation de métastases aux poumons dans un modèle de cancer du sein, ce qui suggère un effet bénéfique contre les galectines [262].

De nouveaux composés ont récemment été utilisés, les amines lactuloses synthétiques. Ces dernières ont été identifiées comme des inhibiteurs spécifiques de la liaison des galectine-1 et -3 à la protéine 90K [263]. Par contre, des études plus approfondies devront être effectuées car les composés utilisés provoquent des effets différents, certains entraînent l'agrégation de cellules tumorales alors que d'autres induisent plutôt l'apoptose ou encore les deux. Il est donc primordial de déterminer les

sites spécifiques de liaisons de ces derniers sur le CRD des galectines et d'évaluer leurs effets.

Quoique les inhibiteurs de galectines semblent être des candidats potentiels dans le traitement du cancer, il est critique de souligner que l'inhibition de l'expression des galectines peut ne pas être bénéfique pour certains types de cancers, notamment les cancers où l'expression de certaines galectines est inhibée, par exemple la galectine-3 qui est inhibée dans le cancer de la prostate [236]. Dans ces cas, l'introduction de galectines par thérapie génique ou l'induction de l'expression de certaines galectines par des agents chimiques, comme l'acide rétinoïque [101] pour la galectine-1, pourrait être efficace.

**Figure 5: Rôles des galectines dans le processus métastatique.** Les galectines ont été impliquées dans la transformation néoplasique, la migration des cellules tumorales, l'agrégation homotypique, l'interaction des cellules tumorales avec les cellules endothéliales, la matrice extracellulaire et les cellules péri-tumorales, ainsi que dans l'angiogénèse et l'échappement au système immunitaire.



**Tableau I : Utilisation de transfectants dans l'étude des galectines dans le cancer.**

<b>Galectines</b>	<b>Type de cellules</b>	<b>Surexpression/ inhibition</b>	<b>Effet</b>
<b>Galectine-1</b>	Fibroblastes	Surexpression	Transformation néoplasique [228]
	Gliomes	Inhibition	Réversion au phénotype normal [229] ↓ croissance tumorale [229]
	Glioblastomes	Inhibition	↑ survie [184]
	Mélanome	Inhibition	↓ croissance tumorale [254]
<b>Galectine-3</b>	Carcinome thyroïde	Inhibition	Réversion au phénotype normal [230]
		Surexpression	Transformation néoplasique [231]
	Cancer du sein	Inhibition	Réversion au phénotype normal [232] ↓ croissance tumorale [232]
		Surexpression	Arrêt cycle cellulaire en G1 [133] Résistance apoptose [168, 234] ↑ mobilité [168] ↑ densité vasculaire in vivo [168] Remodelage du cytosquelette [243]
		Surexpression	Résistance apoptose [142, 210]
	Cancer de la prostate	Surexpression	Suppression tumorale (nucléaire) [146] Promotion tumorale (cytoplasmique) [146] ↑ angiogenèse [146]
	Cancer du poumon	Surexpression	↑ mobilité et invasion [245]
	Cancer du côlon	Inhibition	↓ métastases [252]
<b>Galectine-4</b>	MDCK	Surexpression	Transformation néoplasique [264]
<b>Galectine-9</b>	Cancer du sein	Surexpression	Agrégation cellulaire [172]

### 3. Galectine-7.

La galectine-7 a été découverte en 1995 par Madsen *et al.* [265] suite à des recherches chez des kératinocytes de protéines dont les niveaux d'expression étaient modulés dans les cellules transformées et qui pourraient donc avoir un rôle dans le maintien du phénotype normal. La comparaison entre le protéome de kératinocytes transformés par le virus SV40 et celui de kératinocytes primaires leur permit de mettre en évidence que l'expression de cette protéine était fortement réduite dans les cellules cancéreuses. Le séquençage, la comparaison de séquence et des études de liaisons aux  $\beta$ -galactosides identifièrent cette protéine comme étant un nouveau membre de la famille des galectines. La même année, le groupe de Magnaldo *et al.* identifia que la galectine-7 était une protéine fortement exprimée par les kératinocytes normaux [266].

#### 3.1. Structure et distribution.

La galectine-7 est une protéine de 136 acides aminés avec une masse moléculaire d'environ 15 kDa liant le  $\beta$ -lactose [265, 266]. C'est une protéine non glycosylée pouvant former un complexe avec le galactose, la galactosamine, le lactose et la N-acétyl-lactosamine [267-269]. C'est une galectine de type proto-type, et elle peut être retrouvée sous forme de monomères ou d'homodimères (Figure 2) [265, 268-270]. La topologie de la molécule de galectine-7 humaine consiste en un motif de « *jelly roll* » semblable aux galectine-1, -2 et -10 [269]. Sa structure cristalline dévoile la formation d'homodimères et l'alignement de séquence avec les galectine-1, -2, et -10 démontre la présence de quelques boucles différemment localisées entre les brins concaves et convexes des feuillets du  $\beta$ -sandwich. Comme les autres galectines, la galectine-7 peut être sécrétée, mais ne possède pas de peptide signal de sécrétion. En fait, la galectine-7 est sécrétée par les kératinocytes, mais non par les cellules COS ou Hela transfectées avec le gène codant de la galectine-7 [265, 271]. La distribution cellulaire nucléaire de la galectine-7 prédomine sur l'expression cytoplasmique qui se situe autour du noyau dans les cellules HaCat et les transfectants Hela et DLD-1 surexprimant la galectine-7 [271].

Pour ce qui est de sa distribution tissulaire, elle a originellement été attribuée aux épithéliums squameux stratifiés de la peau [265, 266], où elle est exprimée dans toutes les couches de l'épiderme avec une plus forte concentration dans la couche basale chez le

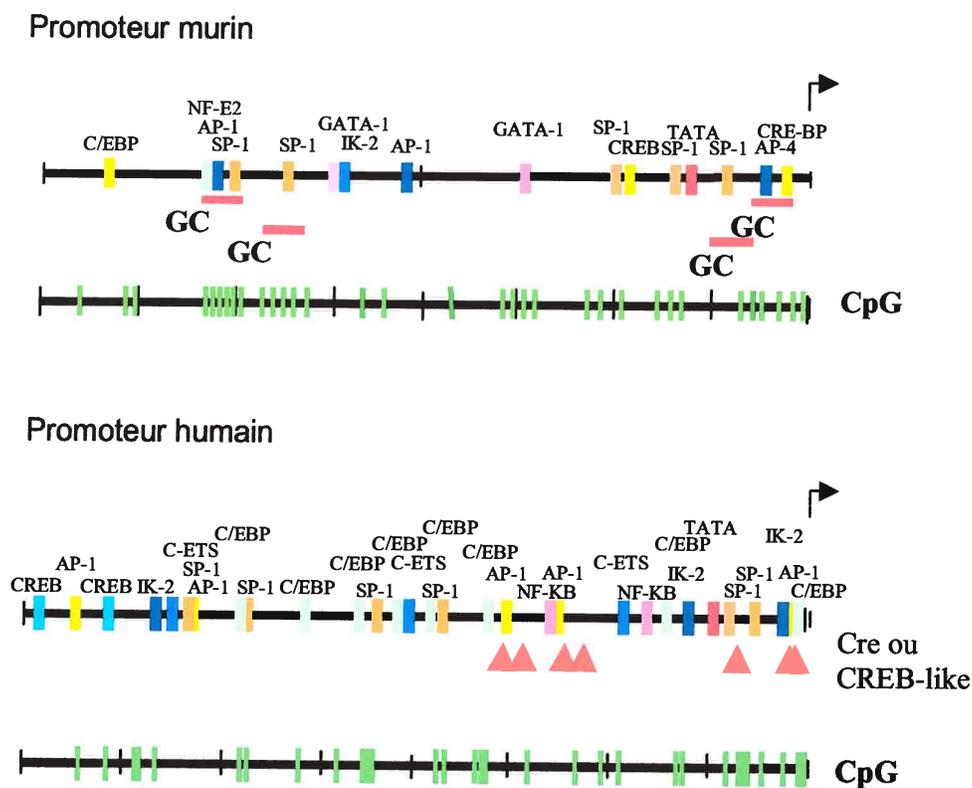
foetus [265]. Chez l'adulte, une forte expression est retrouvée dans la couche basale, mais aussi dans la couche suprabasale, concentrée à des sites de contact cellule-cellule. Lors du développement, la galectine-7 est exprimée que lors de la deuxième moitié de la gestation où le site majeur d'expression est l'épiderme de la peau en développement [272]. Chez l'embryon, les études ont démontré que l'expression de la galectine-7 est également restreinte aux épithéliums stratifiés ou destinés à être stratifiés, et aucune expression significative d'ARNm n'a été détectée dans les épithéliums simples, transitifs ou pseudostratifiés [272]. Chez l'adulte, Magnaldo *et al.* ont démontré par hybridation *in situ* et immunomarquages que la galectine-7 ne semblait pas exprimée dans les épithéliums simples, mais se retrouvait surtout dans les épithéliums stratifiés tels que la peau, l'œsophage, la cornée, la langue, les lèvres et les corpuscules de Hassal du thymus, et ce chez l'humain, la souris et le rat [273]. L'expression de la galectine-7 murine a aussi été observée dans les cellules épithéliales de la trachée et des ovaires, des épithéliums pseudostratifiés et simples, respectivement [270]. Récemment, la galectine-7 fut identifiée dans l'*intima* aortique mais non dans les veines [274].

### **3.2. Régulation de l'expression.**

L'expression de la galectine-7 étant surtout restreinte aux épithéliums stratifiés en condition normale, on doit supposer que son mécanisme de régulation transcriptionnel est hautement régulé. À ce jour, les mécanismes qui régulent son expression demeurent encore très peu connus. En fait, aucune étude fonctionnelle effectuée sur le promoteur de la galectine-7 n'a encore été rapportées. Par contre, nous savons que l'expression de la galectine-7 est réduite dans un modèle de reconstruction d'épiderme *in vitro* suite à la stimulation par l'acide rétinoïque, un modulateur de la croissance cellulaire et de la différenciation des kératinocytes [266]. L'induction de la galectine-7 par la budésonide, un stéroïde glucocorticoïde, a aussi été décrite dans un modèle de réponse inflammatoire [275]. Dans le lymphome, notre laboratoire a identifié la galectine-7 comme une cible induite par la 5-Aza-Cdr, suggérant que l'expression de la galectine-7 est régulée par le mécanisme épigénétique de méthylation [276]. Dans le cancer de la vessie la galectine-7 est induite par l'agent chimiothérapeutique, la *cis*-diamminedichloroplatinum (CDDP) [277]. L'expression de la galectine-7 est aussi augmentée dans l'épiderme de souris

transgénique surexprimant IGF-1 sous le contrôle du promoteur bovin de la kératine 5, résultant en une hyperplasie et une hyperkératose s'atténuant avec l'âge [278]. L'infection par un adénovirus exprimant la protéine p53 sauvage dans des cellules de carcinome du côlon induit l'expression de la galectine-7 après 12 heures, et cette induction n'est pas reliée à l'apoptose cellulaire puisque le traitement avec des inducteurs apoptotiques n'induit pas son expression [279]. De plus, le traitement de kératinocytes par irradiation UVB induit la galectine-7 à des doses stabilisant p53 [280]. L'analyse du transcriptome de cornée en cicatrisation, par matrice différentielle d'ADN complémentaire, a mené à l'identification de la galectine-7 comme gène positivement modulé, et cette induction est accompagnée par une augmentation des facteurs de transcriptions EZH2 (*enhancer of zest homolog-2*), B-myb (*Myb-related protein B*) et le facteur de transcription relB, ce dernier ayant été confirmé par PCR semi-quantitatif [281]. Récemment, il a été démontré que la galectine-7 était augmentée dans l'épiderme de souris transgéniques surexprimant COX-2 dans l'épiderme [282]. Cependant, les données actuellement disponibles ne dévoilent que très partiellement les mécanismes de régulation possiblement impliqués dans le contrôle de l'expression de la galectine-7. Nous avons analysés les promoteurs murin et humain du gène de la *galectine-7* en se basant sur les séquences disponibles pour les génomes dans GenBank (Figure 6). Nous pouvons constater que les promoteurs murin et humain de la galectine-7 contiennent plusieurs dinucléotides CpG, qui peuvent jouer un rôle important dans les mécanismes de régulation épigénétiques, tel que via la méthylation de l'ADN. De plus, les promoteurs murins et humains possèdent tous deux une boîte TATA situés à proximité d'au moins deux sites de reconnaissance du facteur de transcription Sp1, plusieurs sites de reconnaissance pour les éléments Cre (*cyclic AMP-response element*) de même que pour des sites de liaison pour AP-1.

**Figure 6: Promoteur humain et murin de la galectine-7.** Analyse fonctionnelle de -2000 nucléotides en aval des sites théoriques d'initiation de la transcription (flèche) des promoteurs murin et humain de la galectine-7 établie à partir du programme informatique TFSEARCH: Searching Transcription Factor Binding Site ([www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html](http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html)) écrit par Yutaka Akiyama en 1995. L'identification des facteurs de transcription est basé sur la banque de données TRANSFAC. Les principaux sites de liaisons des facteurs de transcription représentés par les larges lignes de couleurs ont une similitude de séquence supérieure à 85% des sites consensus. Les triangles représentent les sites de liaison de facteurs de transcription ayant une similitude de séquence de 70-80%. Les lignes vertes désignent les dinucléotides CpG.



### **3.3. Fonctions.**

En condition normale, la galectine-7 est considérée par plusieurs comme marqueur de tous les types d'épithéliums stratifiés. Ces épithéliums sont reconnus pour être en constant renouvellement cellulaires tout en nécessitant des interactions intercellulaires et cellule-matrice [283, 284]. Les récentes recherches ont suggéré à la galectine-7 plusieurs fonctions pouvant être impliquées dans ce processus. (Figure 7).

#### *Prolifération et apoptose.*

L'étude de l'expression de la galectine-7 lors du développement fut la première à identifier une relation inverse entre son niveau d'expression et le taux de prolifération [272]. Les auteurs ont observé que lors du développement embryonnaire, l'expression de la galectine-7 augmente progressivement lorsque les kératinocytes s'éloignent de la couche basale, cessent de proliférer et se différencient. Cette relation entre les niveaux de la galectine-7 et le taux de prolifération chez les kératinocytes est supportée par au moins trois autres observations. Premièrement, l'expression de la galectine-7 est inhibée dans des cellules de carcinomes squameux et kératinocytes transformés, ayant échappés aux mécanismes de contrôle de la prolifération [265, 273]. Deuxièmement, les cellules basales et suprabasales de carcinomes squameux et les cellules basales de carcinomes expriment très faiblement la galectine-7 [273]. Troisièmement, son expression est diminuée dans les cas de psoriasis, une maladie cutanée caractérisée par une hyperprolifération des kératinocytes [266, 273, 285] alors qu'elle est augmentée lors de culture confluentes ou post-confluentes de kératinocytes en arrêt de croissance [86]. La transfection du gène codant pour la galectine-7 dans des cellules Hela diminue légèrement le taux de croissance des cellules, mais aucune différence n'est observée dans la distribution du cycle cellulaire comparativement aux cellules contrôles [271]. De la même façon, la transfection du gène de la *galectine-7* dans des cellules de carcinome du côlon diminue significativement la croissance des cellules *in vitro* et *in vivo* [286].

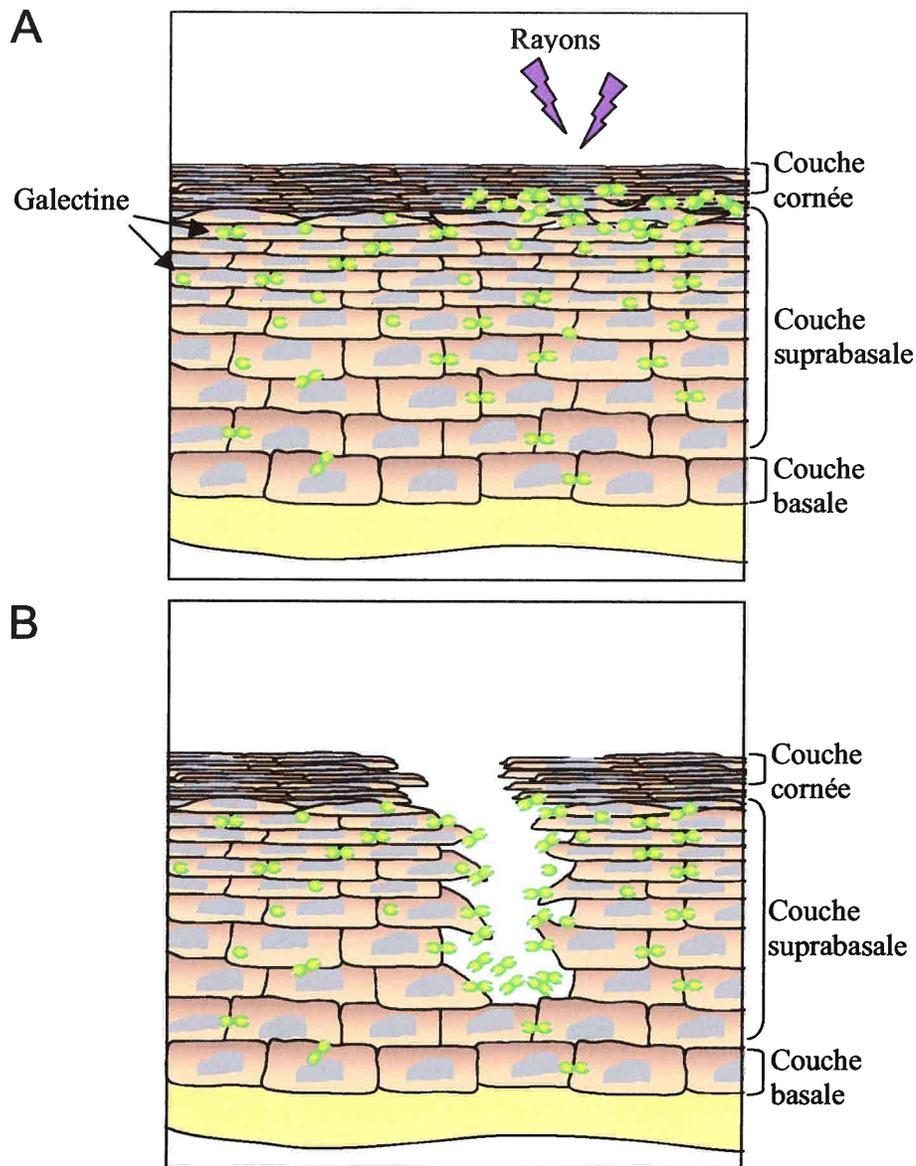
Récemment, il a aussi été démontré que l'addition exogène de galectine-7 inhibait la prolifération de neuroblastomes et cette inhibition est bloquée par l'ajout de lactose [268]. De plus, il a été démontré que la galectine-7 est un des 14 gènes identifiés comme étant sous le contrôle de p53 [279], une protéine très importante dans le contrôle du cycle

cellulaire. Cette étude a laissé présager un rôle pro-apoptotique à la galectine-7. Depuis, plusieurs études proposent donc l'hypothèse définissant la galectine-7 comme une protéine pro-apoptotique, du moins dans certains types cellulaires, et ce suite à l'action de p53. En fait, Bernerd *et al.* démontrèrent que l'exposition d'épiderme humain à des irradiations UVB, menant à la stabilisation de p53, induisait significativement l'expression de la galectine-7 et que cette surexpression était associée à l'apoptose des kératinocytes [280]. Par contre, l'irradiation de cellules de carcinomes squameux ayant des mutations dans les deux allèles de p53 n'induit pas l'expression de la galectine-7 [280]. La même observation a été démontrée dans des cellules de cancer de la vessie arborant une protéine p53 sauvage, où le traitement au CDDP induit l'expression de la galectine-7, alors qu'elle n'est pas induite dans les cellules possédant des mutations dans le gène de p53 [277]. De plus, la transfection de dominants négatifs de p53 bloque totalement l'induction de la galectine-7. Cette étude a aussi clairement indiqué que l'introduction de l'ADNc de la galectine-7 dans des cellules exprimant une protéine p53 mutante rendait les cellules plus sensibles au traitement au CDDP et que l'apoptose induite se produisait via la génération d'oxygène réactif menant à l'activation de la voie JNK. La surexpression de galectine-7 dans des cellules de carcinomes squameux augmente aussi la sensibilité à l'apoptose induite par l'exposition aux UVB [280]. Il en est de même dans les cellules Hela, où la transfection de l'ADNc de la galectine-7 sensibilisent les cellules à l'apoptose induite par irradiation UV, l'actinomycine, l'étoposide, la camptothécine et une combinaison de TNF- $\alpha$  et de cycloheximide [271]. L'apoptose induite par l'actinomycine D accélère l'activation de la caspase-3 et le clivage de PARP, l'activation de la voie JNK et une augmentation de la libération du cytochrome c. Une augmentation de la sensibilité à l'apoptose induite par les différents agents et en condition d'hypoxie est aussi observée pour les cellules de carcinomes du côlon suite à la transfection de la galectine-7 [271, 286]. L'ensemble de ses résultats suggèrent que la galectine-7, du moins dans certains types de cellules, pourraient être associées avec l'apoptose, et ce possiblement en association avec p53.

*Interaction cellule-cellule ou cellule-matrice.*

Par leur potentiel de liaison aux  $\beta$ -galactosides les galectines sont reconnues pour moduler les interactions cellule-cellule ou cellule-matrice [287, 288]. Il a été suggéré que la galectine-7 pouvait aussi être impliquée dans ces processus. En fait, l'expression de la galectine-7 est localisée dans les aires de contact cellule-cellule et elle est diminuée dans des kératinocytes transformés, rendus indépendant d'ancrage [265]. Par exemple, dans la cornée, l'expression de la galectine-7 est plus prononcée aux sites d'interaction cellule-matrice [289]. De plus, Bernerd *et al.* ont démontré que la transfection du gène de la galectine-7 dans des cellules adhérentes de carcinomes squameux entraînait une augmentation de cellules flottantes, suggérant que la surexpression de la galectine-7 favorise le détachement cellulaire [280]. L'utilisation de matrice différentielle d'ADNc a également permis d'observer que la galectine-7 était plus exprimée dans la cornée en cicatrisation que dans la cornée intacte et que l'ajout de galectine-7 exogène accélérerait la ré-épithélialisation [281, 289, 290]. Les auteurs ont suggéré que la galectine-7 influence la migration des cellules épithéliales par son potentiel à interagir avec les glycoprotéines et glycolipides de surfaces et de la matrice extracellulaire. Puisque la migration implique l'attachement et le détachement des cellules avec les cellules adjacentes et la matrice, il est probable que la galectine-7 pourrait servir de 'pont' pour faciliter la cicatrisation. Aucune étude fonctionnelle n'a pu démontré de façon non équivoque un rôle prédominant ou essentiel de la galectine-7 lors d'interactions cellule-cellule ou cellule-matrice bien que sa distribution et ses caractéristiques fonctionnelles, semblables à celles des autres membres de la familles des galectines, semblent lui conférer un fort potentiel à moduler ce type d'interactions.

**Figure 7: Fonctions associées à la galectine-7 dans les épithéliums stratifiés.** La galectine-7 est exprimée dans les couches basales et suprabasales où elle pourrait avoir un rôle dans les interactions cellules-cellules [265,266]. A) Une augmentation de l'expression de la galectine-7 est associée à la protection contre les radiations UV [280]. Cette induction dans les kératinocytes corrèle avec l'apoptose des kératinocytes endommagés par les UV. B) L'expression de la galectine-7 est aussi induite lors de cicatrisation dans la cornée et pourrait être impliquée dans la migration des cellules lors de la ré-épithélialisation [281, 289, 290].



### **3.4. Implication dans le cancer.**

Tous comme les autres galectines, les fonctions associées à la galectine-7 lui confèrent des rôles qui peuvent être avantageux pour la cellule, mais aussi défavorables. Elle lui permet d'interagir avec l'environnement adjacent et contrôle sa prolifération, mais elle peut aussi entraîner sa mort en la rendant plus sensible à l'apoptose. Dans le cas de cancer, le même phénomène est observé. Pour certains types de tumeurs, la galectine-7 semble avoir un rôle anti-tumoral alors que dans d'autres types elle semble favoriser le développement du cancer (Tableau II).

La première observation de l'expression de la galectine-7 dans le cancer fut attribuée à Madsen *et al.* qui identifièrent que l'expression de cette dernière était diminuée dans les kératinocytes transformés [265]. Ensuite, la galectine-7 a été identifiée comme marqueur potentiel de carcinome squameux différenciés et buccaux [291, 292], puis comme gène dont l'expression est augmentée dans des carcinomes mammaires chimiquement induit reconnu pour activer H-Ras, mais non lors d'induction de tumeurs du côlon par l'azoxyméthane [293]. En fait, la galectine-7 fut identifiée comme étant un des 16 transcrits différemment exprimés lors de la comparaison de produits PCR différentiels à partir d'ARN de carcinomes induit par le 1-méthyl-1-nitrosourea (MNU) et de glande mammaire d'un même rat. Son expression fut confirmée par buvardage de type Northern suite à de nouvelles inductions par le MNU ou le 7-12-dimethylbenz[a]anthracene, et il a été déterminé qu'elle n'était pas associée avec la prolifération épithéliale due à la gravité des rongeurs. La détermination du motif d'expression des diverses galectines dans diverses lignées cellulaires, a permis à Lahm *et al.* d'associer l'expression de la galectine-7 à plusieurs lignées [294]. L'analyse de 61 lignées cellulaires par RT-PCR révéla que la galectine-7 était exprimée dans 5/9 lignées de cancer du sein, 17/23 lignées de cancer du côlon, 2/10 lignées de cancer du poumon et 1 lignée de fibroblaste transformé, alors qu'aucune expression n'a été observée dans 8 lignées de cancer du cerveau, 1 mélanome, 7 carcinomes et 3 leucémies. Une forte expression de la galectine-7 a aussi été identifiée dans des carcinomes thyroïdiens en comparaison aux adénomes [295]. L'association de l'expression de la galectine-7 avec l'agressivité tumorale fut démontrée pour la première fois par notre équipe. En fait, nous avons démontré, dans un modèle expérimental de lymphome, que l'expression de la

galectine-7 était induite lors de la progression des cellules vers un phénotype métastatique [276]. Le potentiel pro-tumorale de la galectine-7 a ensuite été corroboré par Saussez *et al.* qui démontrèrent, par immunohistochimie, que l'expression de la galectine-7 dans les carcinomes squameux de l'hypopharynx corrélait avec un fort taux de récurrence tumorale et un mauvais pronostic [296]. Par contre, la galectine-7 n'a pu être détectée dans le sang des patients suite à l'élaboration d'un test ELISA [297]. Seulement quelques études, utilisant une expression ectopique par stimulation ou transfection, confèrent à la galectine-7 un rôle anti-tumoral. En fait, Kopitz *et al.* ont démontré *in vitro* que la liaison de la galectine-7 au gangliosides GM1 à la surface des neuroblastomes inhibait leur prolifération et que cette interaction était bloquée par l'ajout de glycoinhibiteurs ou de galectine-3 de façon dépendante de la concentration, suggérant une compétition des galectines pour un même ligand [268]. L'inhibition de la prolifération par l'ajout de 125 µg/ml de galectine-7 fut observée par microscopie puis quantifiée et s'avéra comparable à celle reconnue pour la galectine-1 alors que l'ajout de la galectine-3, à la même concentration, n'avait aucun effet [268]. La surexpression de la galectine-7 diminue aussi la division cellulaire de transfectants de cellules de carcinomes du côlon d'environ 50% après 6 jours de culture et réduit significativement la croissance indépendante d'encrage après 3 semaine de culture en agar mou, ce dernier étant reconnu comme un modèle de tumorigenèse *in vitro* [286]. L'inhibition de la prolifération *in vivo* a aussi été démontré suite à l'injection sous-cutanée des transfectants dans des souris immunodéficientes [286]. Cette surexpression de la galectine-7 résulte en une réduction de la croissance tumorale sans modulation de l'activité apoptotique de la caspase-3 et une diminution de la quantité de vaisseaux sanguins, suggérant pour la première fois un rôle anti-angiogénique à la galectine-7. Ainsi, dépendamment des types cellulaires dans lesquels la galectine-7 est exprimée, elle peut, comme les autres membres de sa famille, favoriser ou non le développement de tumeurs, et il est donc primordiale de mieux définir son rôle dans le cancer.

**Tableau II: Associations pro- et anti-tumorigénique de la galectine-7.**

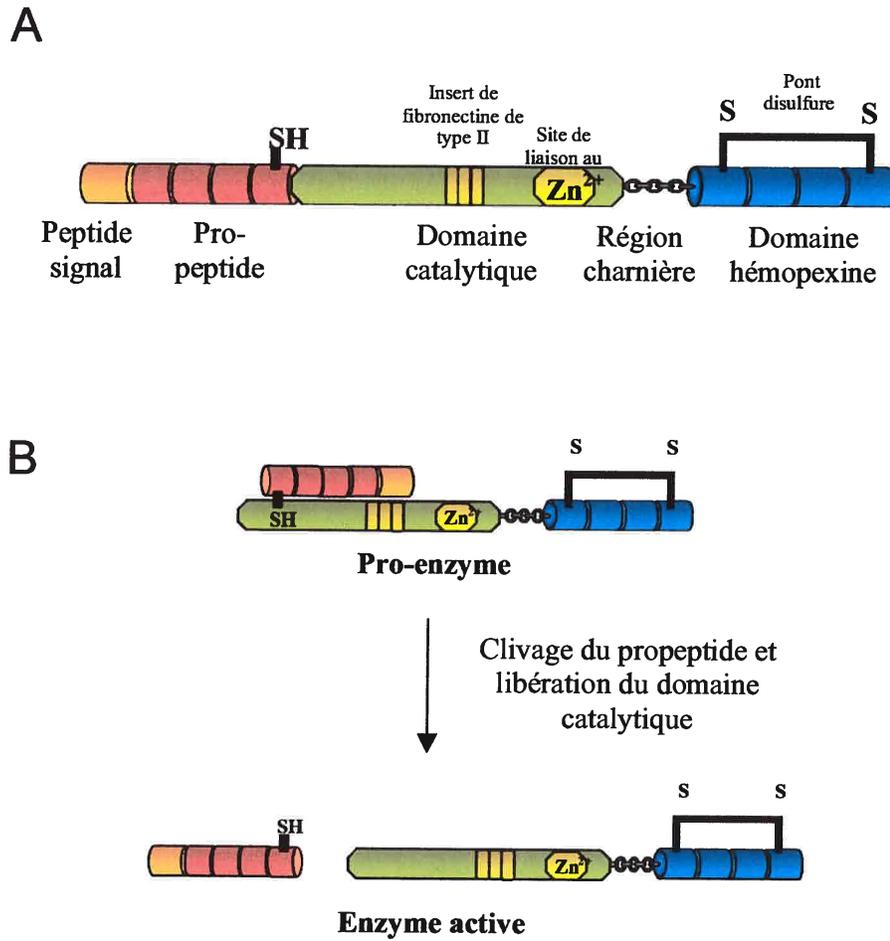
Pro-tumorigénique	Anti-tumorigénique
<p>Carcinome squameux différenciés</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Marqueur [291]</li> </ul> <p>Carcinome squameux buccaux</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Marqueur [292]</li> </ul> <p>Carcinome mammaire chimiquement induit</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Expression [293]</li> </ul> <p>Carcinome thyroïdiens</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Forte expression en comparaison avec les adénomes [295]</li> </ul> <p>Lymphome T</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Expression corrèle avec l'agressivité [276]</li> </ul> <p>Carcinome de l'hypopharinx</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Expression associée à un fort taux de récurrence [296]</li> </ul>	<p>Kératinocytes transformés</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Diminution de l'expression [265]</li> </ul> <p>Neuroblastome</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Stimulation par la galectine-7 diminue la prolifération <i>in vitro</i> [268]</li> </ul> <p>Carcinome du côlon</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Surexpression diminue la croissance tumorale [286]</li> <li>• Surexpression diminue l'angiogenèse [286]</li> </ul>

#### 4. Métalloprotéinase de la matrice-9 (MMP-9).

La métalloprotéinase de la matrice-9 (MMP-9) fait partie de la famille des MMP qui représente une famille d'au moins 25 endopeptidases dont l'activité enzymatique est dépendante de la présence de zinc et qui sont caractérisées par leur habilité à pouvoir dégrader pratiquement tous les composants de la matrice extracellulaire (MEC). Les membres de cette famille d'enzymes possèdent tous une structure de base relativement commune contenant un pro-domaine replié sur le domaine de liaison au zinc dont le clivage protéolytique rend le domaine catalytique accessible. Les MMP possèdent également un domaine hémapexine qui leur confère la spécificité de leurs substrats (Figure 8). Cette spécificité est distincte pour chacune des MMP, mais s'entrecoupe souvent [298]. De par leur structure et leur spécificité, les MMP ont été classées en 6 sous-groupes : les collagénases, les gélatinases, les stromélysines, les matrilysines, les MMP de type membranaires et les autres MMP [299].

Les MMP sont impliquées dans plusieurs mécanismes physiologiques impliquant le remodelage de la matrice, soit le développement, l'angiogenèse, l'immunité adaptative et innée, le remodelage osseux, la croissance neurale, etc. [300, 301]. Elles sont généralement faiblement exprimées et leur transcription est précisément contrôlée positivement ou négativement par des cytokines, des facteurs de croissance et des contacts cellulaires [298]. Les MMP peuvent aussi protéolytiquement activer ou inactiver ces molécules. Les MMP sont régulées par la transcription, mais aussi l'activation du pro-enzyme et leur inhibition généralement produite par les TIMP (*Tissue inhibitor of metalloproteinases*) [302]. La famille des inhibiteurs de MMP comprend quatre membres (Timp-1 à -4) et la plupart du temps, leur concentration dans les tissus et fluides extracellulaires excède de beaucoup la concentration des MMP, ce qui limite l'action protéolytique des MMP au site péricellulaire [298, 301]. Ainsi, une altération de l'expression ou de l'activation des MMP est souvent associée avec la progression de plusieurs processus comme l'arthrite, la cicatrisation et le développement tumoral.

**Figure 8: Les gélatinases.** A) Structure de base des gélatinases. B) Activation de MMP-9.



#### **4.1. Structure et expression.**

MMP-9 a d'abord été découverte comme étant une enzyme produite par les neutrophiles [303]. Elle fut clonée pour la première fois à partir de fibroblastes humains transformés, bien qu'on s'aperçut que cette activité était commune à celle de la collagénase de type IV des neutrophiles et donc le produit d'un même gène [304, 305]. En fait, le clonage de MMP-9 à partir de neutrophiles et monocytes humains, de même que son séquençage au niveau protéique, révéla que la partie aminoterminal de l'enzyme MMP-9 produisait un variant tronqué avec une différence de 8 à 10 acides aminés en comparaison avec l'enzyme de cellules transformées [306, 307]. Un débat sur le substrat naturel de l'enzyme identifia d'abord MMP-9 comme une collagénase de type IV, puis comme une gélatinase nommant ainsi MMP-9, gélatinase B. Depuis, MMP-9 est le deuxième membre du sous-groupe des gélatinases de la famille des MMP, ayant comme principal substrat la gélatine, un collagène dénaturé [306]. La structure de base des gélatinases est composé de plusieurs domaines (Figure 8); 1) un peptide signal dirigeant les MMP vers la voie de sécrétion, 2) un pro-peptide bloquant le site actif et conférant ainsi la latence à l'enzyme, 3) un site catalytique contenant un atome de zinc et un domaine répétitif *fibronectine-like* aidant à la liaison au substrat, 4) un domaine hémapexine permettant l'interaction avec le substrat et conférant la spécificité à l'enzyme en plus, 5) d'une région charnière formant un pont entre le site catalytique et le domaine hémapexine [298].

MMP-9 est une enzyme dont l'expression est inductible et qui peut être retrouvée dans la majorité des cellules immunitaires suite à l'exposition à différents stimuli. Elle peut être induite dans les macrophages, éosinophiles, mastocytes, lymphocytes, cellules NK et cellules dendritiques [308-313]. Elle peut aussi être sécrétée par les cellules épithéliales et endothéliales, les fibroblastes et les cellules musculaires lisses [65, 314-316]. L'expression de MMP-9 peut être modulée dans ces cellules suite à une activation par diverses cytokines ou facteurs de croissance (Tableau III), mais également par l'activation de récepteurs suite à des interactions cellule-cellule ou cellule-matrice. Par exemple, les cytokines IL-1, TNF $\alpha$ , IL-2, IL-4 et TGF- $\beta$  sont reconnues pour induire l'expression de MMP-9 dans les lymphocytes T [317-319]. L'activation de  $\alpha$ 4 $\beta$ 1, VCAM-1, LFA-1 et la fibronectine résulte aussi en une induction de l'expression de

MMP-9 dans ces cellules ainsi que la stimulation d'ICAM-1 à la surface des cellules endothéliales [65, 320]. Chez le fibroblaste, le tPA induit l'expression de MMP-9 par liaison au récepteur LRP-1 et cette induction est complètement bloquée par un antagoniste [321]. L'IL-1 et le TNF $\alpha$  ainsi que MCP-1, MIP-1 $\alpha$  et Rantes peuvent aussi moduler l'expression de MMP-9, par les monocytes, de façon paracrine ou autocrine [322-325]. L'activation de monocytes, mais aussi de cellules endothéliales et cellules de muscles lisses par CD40 entraîne l'expression de MMP-9 [326-328]. Le TNF $\alpha$  induit aussi l'expression de MMP-9 dans les mastocytes alors que l'IFN $\gamma$  l'inhibe [329]. Comme l'IFN $\gamma$ , les molécules anti-inflammatoires peuvent aussi inhiber l'expression de MMP-9. Il a été démontré que l'IL-4 et l'INF $\gamma$ , sécrétés par les cellules T, inhibaient l'expression de MMP-9 par les macrophages, une inhibition qui peut également être causée par l'IL-10 [330-333]. Ainsi, il semble que la combinaison de plusieurs cytokines peut moduler l'expression de MMP-9, l'induisant lorsque nécessaire, lors de réaction inflammatoire par exemple, et l'inhibant lorsque le processus doit s'arrêter afin de maintenir l'homéostasie tissulaire. De plus, MMP-9 est maintenant reconnue comme une enzyme pouvant activer ou désactiver certaines cytokines et facteurs de croissance en plus de plusieurs composants de la MEC et protéases. Elle peut donc s'autoréguler en activant et inactivant les molécules responsables de son expression.

#### **4.2. Fonctions.**

Depuis leur découverte, les MMP ont été considérées comme des enzymes principalement impliquées dans la dégradation et le remodelage de la MEC. Il est maintenant bien établi que la capacité des MMP à cliver diverses molécules, tels que des molécules d'adhésion, chimiokines, cytokines et facteurs de croissance, leur confère une importance dans plusieurs processus physiologiques. Étant donné les multiples substrats potentiels de MMP-9 et la diversité des types cellulaires qui l'expriment, tout porte à croire que MMP-9 peut être impliquée dans plusieurs processus au même moment et ce, en des sites et des environnements totalement différents.

### *Fonctions attribuées par la génération de souris déficientes pour le gène mmp-9.*

L'étude de souris déficientes en MMP-9 est un merveilleux outil pour étudier le rôle d'une protéine *in vivo*. La génération de ces souris a démontré que MMP-9 n'était pas indispensable à la survie, mais jouait un rôle dans le développement squelettique, probablement via le processus d'angiogenèse [334]. En fait, les chondrocytes se développent normalement, mais avec un certain retard dans les processus d'apoptose, de vascularisation et d'ossification. Ces processus sont ensuite suractivés pour compenser et produire un squelette d'apparence normale. De plus, ces processus sont contrôlés par les cellules de la moelle osseuse puisque la transplantation de moelle osseuse sauvage corrige le phénotype. MMP-9 a donc un rôle dans la vascularisation du cartilage et l'ossification. Un autre groupe démontra que la déficience en MMP-9 conférait une résistance à l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale chez les jeunes souris, impliquant MMP-9 dans le développement du système immunitaire [335]. Ils démontrèrent aussi que l'absence de MMP-9 diminuait légèrement la fertilité [336]. Suite à l'ablation de la moelle osseuse, Heissig *et al.* ont démontré que MMP-9, par la libération de kit-ligand soluble, était importante pour favoriser la prolifération des cellules souches quiescentes et leur mobilisation lors de la repopulation de la moelle osseuse [337]. Ainsi, en plus d'être impliquée dans la dégradation de la MEC et autres composés, MMP-9 est impliquée dans la migration et chimiotaxie du système immunitaire et l'angiogenèse.

### *Dégradation de la matrice extracellulaire et activation de composés dérivés.*

La MEC est une structure dynamique, en relation directe avec les cellules. Elle sert de support pour les tissus, de substrat pour la migration cellulaire, mais aussi de ligand pour les facteurs de croissance et cytokines. C'est en fait une matrice hétérogène de protéines telles que le collagène de type IV, la laminine, le perlecan et l'entactine, dont l'ensemble produit une matrice de surface cellulaire de 50 à 200 nm d'épaisseur [299]. Les principaux substrats de MMP-9 sont donc présents dans la matrice et les effets possibles de MMP-9 sont aussi nombreux que la quantité des substrats qu'elle peut reconnaître (Tableau III). En plus de dégrader les composants de la matrice, MMP-9 peut moduler l'activité d'autres protéases et cytokines. Elle peut dégrader la galectine-3,

séparant le CRD du domaine terminal, ce qui interfère avec la capacité d'homodimérisation de la galectine [169, 250]. MMP-9 active aussi les cytokines IL-8 et CXCL1 puisque que leur clivage engendre des formes tronquées plus actives que la forme pleine longueur [338]. De façon similaire, elle active le précurseur le IL-1 $\beta$  en sa forme biologiquement active [339]. Ainsi, MMP-9 peut engendrer une panoplie de phénomènes pro-inflammatoires en favorisant le relâchement de la matrice, la libération et l'activation de cytokines et facteurs de croissance, ce qui permet le recrutement de cellules immunitaires.

#### *Chimiotaxie et migration.*

MMP-9 est exprimée par la majorité des cellules du système immunitaire et son rôle dans l'activation de plusieurs cytokines et leurs récepteurs laisse présager un rôle chimiotactique. Par exemple, il existe une relation de rétroactivation positive entre MMP-9 et l'IL-8 [340]. En fait, l'IL-8 induite, suite à une infection ou la stimulation par une cytokine, entraîne la chimiotaxie et l'activation des neutrophiles. Ces derniers sécrètent MMP-9 qui à son tour potentialise l'activité de l'IL-8, la clivant en une forme 10 fois plus active, ce qui favorise une amplification de la chimiotaxie des neutrophiles et de la réponse inflammatoire. En fait, la migration de plusieurs cellules inflammatoires nécessitent la présence de MMP-9 lors du passage au travers une membrane basale artificielle comme le matrigel [341-343]. Il a aussi été démontré que MMP-9 était impliquée dans la migration des cellules basales suite à une blessure de la trachée et lors de bronchiolisation alvéolaire [344, 345]. De plus, il a été démontré que la transfection de RhoA, une GTPase impliquée dans la migration cellulaire, induit l'expression de MMP-9 et son recrutement en des sites de surface spécifiques d'allongement des lamellipodes, où elle co-localise avec CD44, un récepteur transmembranaire [346]. Cette interaction avec CD44 favorise le migration cellulaire, puisque la liaison du hyaluronan avec CD44, diminue l'expression de MMP-9 et inhibe le mouvement de cellules ressemblant aux ostéoclastes [347]. Ainsi, MMP-9 peut favoriser la migration des cellules en : 1) dégradant la MEC, 2) dégradant les liaison cellule-cellule ou cellule-matrice, et par 3) la libération de molécules de croissance. De plus, par l'utilisation de peptides dérivés de *phage display* inhibant la migration cellulaire, il a été possible de mettre de l'avant un

modèle proposant l'existence d'un complexe protéique de courte demi-vie nommé invadosome constituée de MMP-9, d'intégrines, d'uPA/uPAR, des protéines de la MEC, et possiblement d'autres protéines, liées ensemble à la surface cellulaire et qui sont essentielles au contact de la cellule à la MEC lors du processus de migration [348].

#### *Angiogenèse.*

L'implication de MMP-9 dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins a d'abord été mise en évidence dans les souris déficientes pour MMP-9 où la vascularisation est légèrement retardée lors du développement [334]. Depuis, il a été démontré que MMP-9 pouvait cliver et activer VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) en le libérant de la MEC, ce qui favorise le recrutement et l'invasion des cellules endothéliales [349]. De plus, Lee *et al* ont démontré, de façon élégante, que MMP-9 clivait la majorité des isoformes de VEGF relâchant le domaine de liaison au récepteur de la MEC [350]. Ils notèrent également que la forme tronquée entraînait la formation de motifs de néovascularisation irréguliers, caractérisés par l'extension de filopodes, migration et prolifération subséquentes, résultant en une augmentation de la dilatation et de la grosseur des vaisseaux, contrairement au motif régulier de formation en feuille. MMP-9 a aussi un rôle dans la mobilisation des précurseurs de cellules endothéliales de la moelle osseuse [337]. En fait, lors de transfert de moelle osseuse, le transfert de cellules endothéliales précurseurs, ainsi que les cellules souches hématopoïétiques, dans le compartiment prolifératif de la moelle osseuse, nécessite l'activation du ligand c-kit soluble, qui est libéré par MMP-9. L'absence de MMP-9 dans des souris déficientes retarde le recrutement des précurseurs de cellules endothéliales et l'angiogenèse. Le même groupe démontra que l'irradiation module l'angiogenèse en induisant MMP-9, qui à son tour libère c-kit, entraînant le recrutement de précurseurs, la prolifération et la migration de mastocytes. Les mastocytes sécrètent VEGF, ce qui favorise l'accumulation des mastocytes, l'angiogenèse, et amplifie l'induction de MMP-9 [351]. MMP-9 est aussi nécessaire dans l'angiogenèse induite suite à une ischémie, où l'expression de MMP-9 par les macrophages est responsable de la guérison du tissu suite à l'activation de c-kit [352].

**Tableau III : Inducteurs, supresseurs et substrats de MMP-9.**

Inducteurs	Supresseurs	Substrat	
IL-1	IL-4	<u>de la matrice</u>	<u>Autres</u>
IL-2	IL-6	<u>extracellulaire</u>	
IL-8	IL-10		MBP ( <i>myelin basic protein</i> )
NF-Kappa B	IFN $\beta$	Collagène (Type	<i>protein</i> )
TNF $\alpha$	Élastine	I, IV, V, VII, X,	Galectin-3
AP-1	TIMP	XI, XVII)	$\alpha$ 1-antitrypsine
Plasmine	$\alpha$ 2-	Gélatine	pro-TNF $\alpha$
	macroglobuline	Élastine	pro-IL-1 $\alpha$
		Laminine	pro-IL-8
		Fibronectine	pro-TGF $\beta$ 1
		Aggrecan	Amyloïde $\beta$
		Entactine	Plasminogène
		Caséine	FGF-R1
			IL-2R $\alpha$
		<u>Pro-MMP</u>	GRO $\alpha$
		Pro-MMP-2	CTAP-III
		pro-MMP-13	SDF
			ET-1
			TFPI
			ICAM-1
			IP-10
			MIG
			$\alpha$ 1-PI
			$\alpha$ 2-macroglobuline

### **4.3. Implication dans le cancer.**

Depuis des dizaines d'années, il a été établi que la progression de plusieurs types de tumeurs corrélait avec la sécrétion de MMP-9. Des approches variées utilisant sa surexpression ou son inhibition dans les cellules tumorales ou péricellulaires ont depuis confirmé le rôle crucial de MMP-9 dans le développement tumoral. L'utilisation de souris génétiquement modifiées a aussi permis d'évaluer les différents aspects de la progression tumorale et ce dans plusieurs types de cancer.

#### **4.3.1. Rôle de la MMP-9 tumorale.**

L'implication de MMP-9 dans l'invasion tumorale a été indéniablement démontrée par une étude dans laquelle sa surexpression dans des cellules embryonnaires de rat conférait un phénotype métastatique aux cellules [353]. Le même groupe observa aussi que l'inhibition de l'expression de MMP-9 par l'introduction de ribozymes spécifiques diminuait le pouvoir métastatique de cellules embryonnaires transformées exprimant de hauts niveaux de MMP-9 [354]. Par la suite, ces ribozymes ont été utilisés pour inhiber l'expression de MMP-9 dans un modèle de cancer de la prostate murin résultant en une diminution de la métastase aux poumons [355]. La croissance tumorale de glioblastomes, suite à une injection intracrânienne, est aussi pratiquement supprimée par l'introduction d'un ADNc antisens de MMP-9 capable de réduire de 10-14 fois son activité [356]. Puisque l'expression constitutive de MMP-9 par la cellule tumorale semble lui conférer maintes avantages, plusieurs mécanismes lui ont été directement ou indirectement attribués. Dans un essai *in vitro*, l'inhibition de MMP-9, par ARN interférence dans des cellules agressives dérivées de sarcome d'Ewing, semble favoriser l'agrégation cellulaire et l'expression de la E-cadhérine, ce qui diminue la mobilité cellulaire [357]. De plus, il a été démontré que la surexpression de MMP-9 dans des cellules de cancer du sein est responsable du clivage de ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) et que la présence de ICAM-1 soluble inhibe la cytotoxicité antitumorale des cellules NK [358]. Il est cependant évident que les mécanismes précis par lesquels MMP-9 peut engendrer des effets pro-tumoraux sont encore mal connus et pourraient varier selon le type de tumeurs et le stade de la maladie.

#### **4.3.2. Rôle de la MMP-9 du stroma.**

La première étude, utilisant des souris déficientes pour MMP-9, a rapporté son implication dans le processus métastatique en utilisant des modèles expérimentaux de cancer du poumon et de mélanome [359]. Suite à l'injection des cellules par voies intraveineuses, les auteurs ont observé que les souris déficientes pour MMP-9 développaient significativement moins de métastases aux poumons que les souris sauvages, déterminant pour la première fois que l'expression de MMP-9 par les cellules de l'hôte avait aussi un rôle dans le processus métastatique. Le rôle de MMP-9 de l'hôte fut par la suite confirmé par le groupe de Coussens [360]. Ils démontrèrent, dans un modèle transgénique de carcinogenèse épithéliale, que l'absence de MMP-9 chez l'hôte retardait l'apparition du phénotype hyperplasique et dysplasique caractéristique et diminuait l'incidence de conversion maligne. De plus, les tumeurs ayant réussi à croître dans l'environnement déficient révélait un phénotype plus malin. L'utilisation de chimère de moelle osseuse permit d'observer une reconstitution du phénotype caractéristique sauvage, nouvelle évidence du rôle du stroma dans l'hyperprolifération néoplasique. Par contre, le transfert de moelle osseuse dans un modèle de métastase hépatique de carcinome colorectal ne rétablit pas le phénotype sauvage, ce qui suggère que l'expression de MMP-9 par les macrophages hépatiques, i.e. les cellules de Kupfer, favorise aussi la progression du cancer [361]. Pour définir le mécanisme par lequel l'absence de MMP-9 atténue l'incidence de carcinomes squameux, van Kempen *et al* ont évalué les réponses angiogéniques et inflammatoires durant la progression néoplasique dans des souris transgéniques et démontrèrent un retard et une diminution de l'angiogenèse mais aucune différence en ce qui concerne l'infiltration leucocytaire dans les souris déficientes en MMP-9 [362]. Il en est de même dans un modèle transgénique de cancer de l'utérus où on observe une diminution de 66% de l'incidence et une réduction de 76% du volume tumoral avec inhibition de la formation de vaisseaux sanguins dans les souris déficientes en MMP-9 comparativement aux souris témoins [363]. Dans un modèle de souris RIP1-Tag2 déficientes pour MMP-9, l'absence de MMP-9 diminue aussi la formation de tumeurs et l'angiogenèse des îlots pancréatiques, impliquant MMP-9 dans l'initiation du processus angiogénique [349]. L'analyse histologique, suite à l'injection de cancer des ovaires humains dans des souris immunodéficientes arborant une mutation du

gène *mmp-9*, a permis d'observer une diminution de la croissance tumorale, une réduction de l'infiltration de macrophages et une baisse subséquente de la densité vasculaire [364]. Il est donc bien établi que l'expression de MMP-9 chez l'hôte joue un rôle prépondérant dans le développement de tumeur et ce en modulant l'angiogenèse. Dans la même veine, Chantrain *et al* ont démontré un rôle spécifique pour MMP-9 dans la formation de vaisseaux sanguins matures en favorisant le recrutement de péricytes autour des cellules endothéliales [365]. En fait, l'analyse histologique de souris injectées avec des cellules de neuroblastomes a permis d'observer que les microvaisseaux des souris déficientes en MMP-9 étaient significativement plus petits que les souris sauvages. De plus, l'implantation des cellules dans du matrigel polymérisé dans ces souris permit d'observer des couches de péricytes discontinues et une plus faible quantité de péricytes et de cellules endothéliales.

Ainsi, MMP-9 provenant du microenvironnement tumoral est un joueur clé dans la progression du cancer. Sa présence favorise le développement de tumeurs et l'angiogenèse associée à la progression tumorale et il semble maintenant évident que la majorité des cellules responsables proviennent de la moelle osseuse et que le système immunitaire joue aussi un rôle important dans le développement du cancer.

#### **4.3.3. MMP-9 dans le lymphome.**

La relation entre MMP-9 et le lymphome a été rapporté par le groupe d'Anna Kossakowska. Ils démontrèrent que les niveaux d'expression de MMP-9 corrélaient avec le stade clinique de LNH et que son expression était un facteur pouvant être utilisé pour prédire la survie des patients atteints de la maladie [45, 366]. Une activité protéolytique de MMP-9 a été observée dans la majorité des biopsies et parmi les cellules récoltées, il a été identifié que les cellules lymphomateuses et les macrophages étaient responsables de l'expression de MMP-9 [58]. L'expression de MMP-9 corrèle aussi avec l'expression de l'IL-6 et il a été démontré que cette cytokine pouvait induire MMP-9 dans des lignées lymphomateuses qui ne l'exprimait pas [47]. L'expression de MMP-9 a aussi été observée dans deux lignées cellulaires de lymphome de Burkitt [367] et de myélome multiple [368]. Des études effectuées dans notre laboratoire ont ensuite démontré que la croissance d'un lymphome thymique dans une souris induisait une augmentation du taux

de MMP-9 dans le sérum, et que les niveaux de MMP-9 corrélaient avec la taille de la tumeur [369]. Il a été observé que l'expression de MMP-9 dans le thymome n'était pas reliée aux cellules lymphomateuses directement, mais plutôt induite dans les cellules stromales suite aux contacts avec ces dernières. De plus, la co-culture de cellules lymphomateuses avec des cellules endothéliales entraîne une induction bidirectionnelle de MMP-9 suite au contact entre LFA-1 et ICAM-1 [65]. Afin d'identifier le rôle de MMP-9 dans la lymphomagenèse, notre laboratoire a généré des transfectants stables de cellules de lymphomes surexprimant MMP-9 ce qui a permis d'établir que l'expression constitutive de MMP-9 par les cellules lymphomateuses murines accélérât la progression tumorale après l'injection intrathymique et que cet effet n'était pas modifié par l'expression de son inhibiteur naturel TIMP-1. [12]. De plus, la génération de variants agressifs, exprimant constitutivement MMP-9, était capable d'outrepasser la résistance contre le développement du lymphome des souris ICAM-1 déficientes [66]. Il semble donc qu'une pression sélective contraint les cellules lymphomateuses à exprimer un nouveau répertoire de gènes de façon à favoriser leur progression vers un phénotype agressif. L'expression de MMP-9 est aussi induite dans les cellules CD4+ de leucémies de cellules T adulte (ATL) suite à l'infection par HTLV-I (*human T-cell leukemia virus type I*) [370].

## 5. Le rôle de la méthylation de l'ADN dans l'expression de gènes pro-métastatiques.

La modification épigénétique majeure de l'ADN chez l'humain est la méthylation de cytosines lorsqu'elles sont placées en amont d'une guanine (CpG). L'ajout du groupement méthyle se fait généralement à la position 5 du cycle pyrimidique pour générer la 5-méthylcytosine (m5-C) [371]. L'introduction est catalysée par une réaction enzymatique accomplie par les méthyltransférases de l'ADN (DNMT) suite au transfert du groupement du donneur S-adenosyl-méthionine. La distribution des CpG dans le génome humain n'est pas uniforme, les m5-C forment environ 1% des nucléotides de l'ADN totale et affecte environ 70-80% des CpG du génome [372]. On retrouve dans approximativement la moitié des gènes de long fragments riches en doublets CpG, nommés îlots CpG [373]. Ces îlots sont souvent situés en 5' des gènes et autour du site d'initiation de la transcription et rarement dans les autres régions d'un gène, comme les introns et les exons. En général, dans le génome, la majorité des CpG qui ne sont pas associés aux îlots sont méthylés alors que les îlots CpG en amont des régions promotrices sont normalement non-méthylés, sauf au niveau du chromosome X inactif de même que pour les gènes soumis à l'empreinte parentale [374]. De façon générale, la méthylation spécifique de certains CpG est importante dans le maintien des régions non-codantes de l'ADN sous une forme inerte, alors que l'hypométhylation des îlots des promoteurs de gènes serait responsable de l'expression. La méthylation de l'ADN par les DNMT est donc un phénomène de régulation transcriptionnelle des gènes

### **5.1. Les méthyltransférases de l'ADN.**

Les DNMT sont formées de deux domaines, le domaine régulateur N-terminal et le domaine C-terminal. Le domaine régulateur diffère entre les membres de la famille et contient plusieurs régions d'interaction qui leur permettent de lier l'ADN et d'autres protéines alors que le domaine C-terminal est hautement conservé et est responsable de l'activité catalytique [375]. Chez les mammifères, on retrouve au moins cinq membres, initialement classés selon leur spécificité de substrat, soit : 1) les méthyltransférases *de novo*, DNMT3a et DNMT3B, qui ajoutent des groupements méthyle au CpG non-méthylés, et 2) les méthyltransférases d'entretien, DNMT1, responsables de la copie du motif de méthylation du brin parental sur le nouveau brin formé lors de la réplication de

l'ADN [375, 376]. On retrouve également une troisième famille de méthyltransférase de l'ADN, soit DNMT2, identifiée par homologie de séquence mais dont la fonction demeure inconnue. Auparavant, on croyait chacun des membres responsables de processus distincts, mais les récentes études révèlent maintenant une certaine coopération.

*DNMT1 : une méthyltransférase d'entretien.*

DNMT1, une enzyme contenant 1620 acides aminés, a été la première méthyltransférase de l'ADN clonée. DNMT1 fait partie des méthyltransférases d'entretien car il a été observé que l'enzyme avait une préférence pour l'ADN hémiméthylé [377]. L'importance de DNMT1 dans le maintien des motifs de méthylation a été corroborée par des études utilisant des cellules et des souris déficientes pour DNMT1. Ces études ont démontré que les cellules souches embryonnaires arborant une mutation dans les deux allèles du gène *dnmt1* avaient un taux de méthylation réduit mais stable et que leur potentiel de différenciation était altéré, bloquant de façon irréversible le développement embryonnaire chez la souris [378]. De plus, la mutation homozygote du gène dans les cellules somatiques entraîne, en plus d'une hypométhylation génomique, l'apoptose cellulaire en 5-6 jours [379]. Ces résultats indiquent que la méthylation *de novo* par d'autres méthyltransférases est suffisante pour maintenir la survie des cellules indifférenciées alors que la méthylation d'entretien est nécessaire pour la différenciation et la survie des cellules somatiques. Une activité *de novo* sur des gènes normalement non-méthylés a aussi été démontré pour DNMT1 suite à sa surexpression dans les cellules souches déficientes et sauvages [380]. Par contre, une surexpression trop forte de la protéine entraîne la létalité embryonnaire suite au transfert des cellules souches dans les blastocystes. De façon générale, on considère donc que l'activité principale de DNMT1 est la méthylation d'entretien, mais il semble qu'elle puisse aussi avoir une activité *de novo*.

### *DNMT3a et DNMT3b : des méthyltransférases de novo.*

Les enzymes DNMT3a et 3b sont deux enzymes très homologues mais codées sur deux gènes différents. Elles possèdent 908 et 859 acides aminés, respectivement. Elles diffèrent de DNMT1 essentiellement au niveau du domaine régulateur qui contient, dans ce dernier cas, un domaine de liaison à la PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*). Elles sont reconnues comme majoritairement responsables de l'ajout de groupement méthyle sur les CpG non-méthylés sur les séquences régulatrices des gènes et sur les séquences 'satellites' des centromères respectivement. Par contre, certaines données laissent croire qu'elles pourraient aussi jouer un rôle dans le maintien en complétant la méthylation de sites oubliés par DNMT1 [381]. En fait, DNMT1, DNMT3a et 3b peuvent tous méthyler des substrats non-méthylés et hémiméthylés et coopéreraient dans le maintien des motifs de méthylation lors de la réplication [377, 381, 382]. Cette coopération entre les méthyltransférases a été corroborée par des études sur le fait qu'une lignée de carcinome du côlon déficiente en DNMT1 révélait une faible diminution du taux de méthylation alors que le taux était dramatiquement altéré dans des cellules déficientes pour les enzymes DNMT1 et DNMT3b [383, 384].

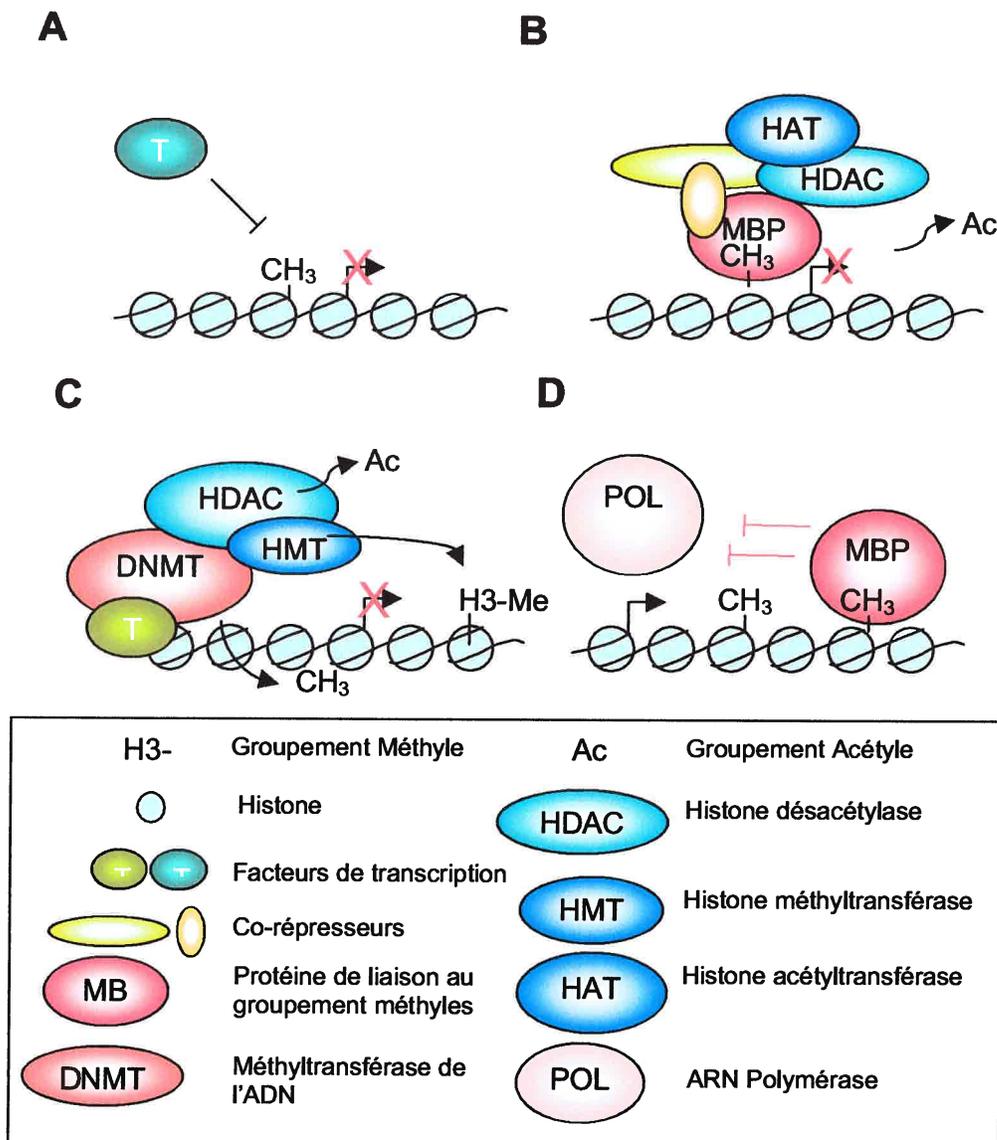
### *Énigmatiques DNMT2 et DNMT3L.*

DNMT2, une enzyme de 415 acides aminés, est la plus petite des méthyltransférases, ne possédant pas le domaine régulateur N-terminal présent sur DNMT1 et DNMT3a et 3b. Bien qu'elle possède tous les motifs catalytiques, son activité méthyltransférase n'a pas encore été clairement démontrée [375]. De plus, aucune altération du processus de méthylation n'a été observée dans les cellules souches embryonnaires déficientes pour DNMT2 qui sont de phénotype normal [382]. Une activité méthyltransférase n'a non plus été associée à DNMT3L (*DNMT3-like*), un enzyme très homologue avec DNMT3a et DNMT3b. Néanmoins, il a été démontré que sa présence est essentielle pour l'établissement des motifs de méthylation maternels et paternels lors de l'oogénèse [385]. Ce phénomène pourrait être expliqué par sa capacité à se lier physiquement et stimuler DNMT3a et DNMT3b, et possiblement d'autres protéines impliquées dans la régulation épigénétique de l'ADN, telle que les déacétylases d'histones [386].

## **5.2. Inhibition de la transcription par la méthylation.**

La méthylation de l'ADN est un processus lié à la transcription des gènes. Des efforts considérables ont été investis afin d'élucider les mécanismes impliqués dans cette relation [387] (Figure 9). Essentiellement, on croit que la méthylation de l'ADN pourrait directement inhiber la transcription en bloquant l'accès des facteurs de transcription à la région promotrice des gènes [388]. On croit également que des protéines de liaison au groupement méthyle (*methyl-CpG binding protein*) reconnaissent l'ADN méthylé, recrutent des co-répresseurs et forment un complexe qui limite l'accès des facteurs de transcriptions et inhibent la transcription [389, 390]. Ce système de répression impliquerait aussi des modifications de la chromatine en induisant le recrutement d'histones déacétylases et acétyltransférases qui seraient responsables de sa condensation [391]. Récemment, il a été découvert que les DNMT pouvaient aussi interférer dans le processus de transcription et elles sont maintenant considérées dans les mécanismes de répression par la méthylation [387]. En fait, les DNMT pourraient être recrutées par des répresseurs transcriptionnels et interagir directement avec les histones déacétylases et les histones méthyltransférases pour modifier la structure de la chromatine [392-395]. Finalement, la méthylation dans le corps du gène, i.e. les introns et les exons, pourrait aussi inhiber la transcription en bloquant l'accès de l'ARN polymérase II à la chromatine, bloquant ainsi l'élongation [396].

**Figure 9: Mécanismes d'inhibition de la transcription par la méthylation.** A) Méthylation dans le site de reconnaissance d'un facteur de transcription activateur peut bloquer sa liaison et inhiber la transcription. B) La liaison de MBP sur le groupement méthyle entraîne le recrutement de co-répresseurs de HDAC et HAT et le complexe et la modification de la chromatine inhibe la transcription. C) Les DNMT sont recrutées par un facteur répresseur de transcription et interagissent physiquement avec HDAC et HMT ce qui modifie la chromatine et inhibe la transcription. D) La méthylation dans le corps du gène peut bloquer l'accès du complexe de réplication et inhiber la transcription. Adapté de Klose and Bird [387].



### **5.3. Méthylation et cancer.**

Les changements épigénétiques pathologiques sont considérés comme des alternatives aux modifications chromosomiques et aux mutations, qui sont responsables de l'altération de la fonction des gènes [397]. Ces changements se retrouvent sous forme d'hypométhylation globale, ou d'hypo- ou d'hyperméthylation spécifique de gènes.

#### *Hypométhylation et activation des gènes.*

La perte de méthylation des dinucléotides CpG a été la première altération épigénétique identifiée dans les cellules cancéreuses. La comparaison de l'ADN normal et l'ADN provenant de cellules tumorales par buvardage de type Southern révéla que plusieurs CpG étaient méthylés dans l'ADN normal alors qu'ils étaient déméthylés dans les cellules cancéreuses correspondantes [398]. Il a ensuite mis en évidence que le contenu en 5-mC était globalement réduit dans les cellules tumorales [399]. Depuis, il a été démontré que l'hypométhylation globale mène à l'instabilité chromosomique et augmente la fréquence tumorale en favorisant, par exemple, les translocations chromosomiques [400]. En fait, il a été démontré que l'introduction d'un allèle hypomorphe de DNMT1 dans des souris  $Nf1^{+/-}$   $p53^{+/-}$  induisait la formation de sarcomes plus rapidement et augmentait de 2.2 fois la fréquence de perte d'hétérozygotie [401]. De plus, 80% des souris possédant un allèle hypomorphe et un allèle nul de DNMT1 développent des lymphomes thymiques agressifs en 4-8 mois [402].

L'hypométhylation est aussi responsable de l'activation de gènes spécifiques. Plusieurs îlots CpG sont connus pour être normalement méthylés dans les tissus somatiques [403]. Les îlots peuvent être déméthylés dans le cancer et conduire à l'activation des gènes. Par exemple, il a été démontré que l'expression des oncogènes HRAS et RRAS était affectée par l'hypométhylation [404, 405]. Il en est de même pour plusieurs antigènes tumoraux, tel CAGE, un gène normalement exprimé seulement dans les testicules et se retrouvant exprimé dans plusieurs cancers, et MAGE un antigène tumoral associé au mélanome [406, 407]. Plusieurs évidences suggèrent aussi une implication de l'hypométhylation dans l'activation de gènes importants dans la progression du cancer. Une déméthylation des CpG des promoteurs de la cycline D2 provoque sa surexpression dans des cancers gastriques [408]. L'utilisation de matrice

différentielle d'ADNc a aussi permis d'identifier maspin et S100P, des gènes reliés à la progression du cancer, en tant que gènes affectés par l'hypométhylation [409]. De la même façon, la comparaison de matrices d'oligonucléotides de cellules de cancer de la prostate et de cellules saines provenant d'un même patient ont permis de constater que la surexpression de WNT5A, S100P et CRIP1 dans les cellules tumorales était sous le contrôle de la méthylation [410]. L'hypométhylation est également responsable de la surexpression de MN/CA9 dans les carcinome de cellules rénales et de S100A4, un gène associé aux métastases du cancer du côlon [411, 412]. Elle est aussi responsable de la surexpression de MDR1, un gène de résistance aux drogues, dans les leucémie myéloïdes [413], de même que de plusieurs autres gènes de résistance dans le cancer du sein [414].

#### *Hyperméthylation et inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs.*

L'hypométhylation n'est pas la seule façon par laquelle la méthylation contribue à la progression du cancer. En fait, la majorité des études ont d'abord porté sur l'hyperméthylation et l'inactivation de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs. Le premier gène suppresseur de tumeur dont la baisse d'expression dans le cancer fut associé à une hyperméthylation fut le gène de rétinoblastome (Rb) [415]. Ensuite, il a été démontré que l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs p16 et von Hippel-Lindau, de l'enzyme de réparation MLH1 et de la E-cadhérine était inhibée dans les lignées cellulaires et cancers primaires et corrélait avec le taux de méthylation de leurs promoteurs respectifs [416-420]. Récemment, la découverte d'un lien direct menant à l'inactivation précoce du gène suppresseur de tumeur SRFP1 par la méthylation à l'expression constitutive des gènes de réponse aux Wnt (*Wingless-related mouse mammary virus*), qui sont responsables de mutations subséquentes d'APC et de la  $\beta$ -caténine lors de la progression du cancer colorectal, a mis en évidence l'effet des mécanismes épigénétiques dans l'évolution du cancer [421]. En fait, il a été proposé que l'inactivation précoce des gènes par la méthylation pourrait constituer une barrière épigénétique qui se dresserait dans les premières étapes de la progression tumorale et favoriserait l'instabilité génétique menant à l'altération d'autres gènes qui activeraient l'oncogénèse. Par la suite, les mécanismes épigénétiques et génétiques collaboreraient lors de la progression tumorale [422, 423]. L'ensemble de ces recherches met à l'avant-

plan un rôle clé de la méthylation en tant que mécanisme primordial de régulation des gènes dont l'altération peut mener à la transformation cellulaire et la progression tumorale.

## **CHAPITRE 1**

## RÉSUMÉ DU CHAPITRE 1

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

Demers M., Magnaldo T., St-Pierre Y. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0134  
A novel function for galectin-7: Promoting tumorigenesis by up-regulating MMP-9 gene expression  
(2005) *Cancer Research*, 65 (12) , pp. 5205-5210.

La métastase est un processus multiséquentiel par lequel la cellule cancéreuse, après avoir acquise certaines propriétés, se propage aux différents tissus cibles, en grande partie selon les concepts de l'hypothèse du « *Seed and Soil* » émis par Paget. C'est la raison majeure du décès des gens souffrant du cancer. Nous avons récemment identifié la galectine-7 en tant que nouveau gène associé à la progression des lymphomes de cellules T vers un phénotype métastatique, ce qui suggère une relation causale possible. L'étude présentée dans ce chapitre visait spécifiquement à déterminer le rôle de la galectine-7 dans le lymphome. Nous avons observé que le développement de lymphome thymique était accéléré dans des cellules lymphomateuses surexprimant la galectine-7. De plus, la transfection d'un vecteur d'expression contenant le gène de la galectine-7 dans des cellules lymphomateuses à faible potentiel métastatique augmentait leur comportement agressif et conférait à ces cellules la nouvelle capacité d'outrepasser la résistance contre la dissémination du lymphome des souris déficientes pour la molécule d'adhésion intercellulaire ICAM-1. Finalement, nous présentons des données suggérant que la galectine-7 module le comportement agressif des cellules de lymphome en contrôlant l'expression de gènes pro-métastatiques comme MMP-9. Cette hypothèse est basée sur les évidences suivantes : (a) les transfectants surexprimant la galectine-7 ont de plus hauts niveaux d'expression de MMP-9, (b) l'addition de 13-lactose inhibe complètement l'expression de MMP-9 par les transfectants exprimant la galectine-7 et (c) les formes recombinantes de la galectine-7 induisent l'expression de MMP-9 dans les cellules lymphomateuses murines et humaines. Nos résultats ont dévoilé l'existence d'une activité précédemment inconnue de la galectine-7, la promotion de la progression maligne des cellules cancéreuses.

## RÉSUMÉ DU CHAPITRE 2

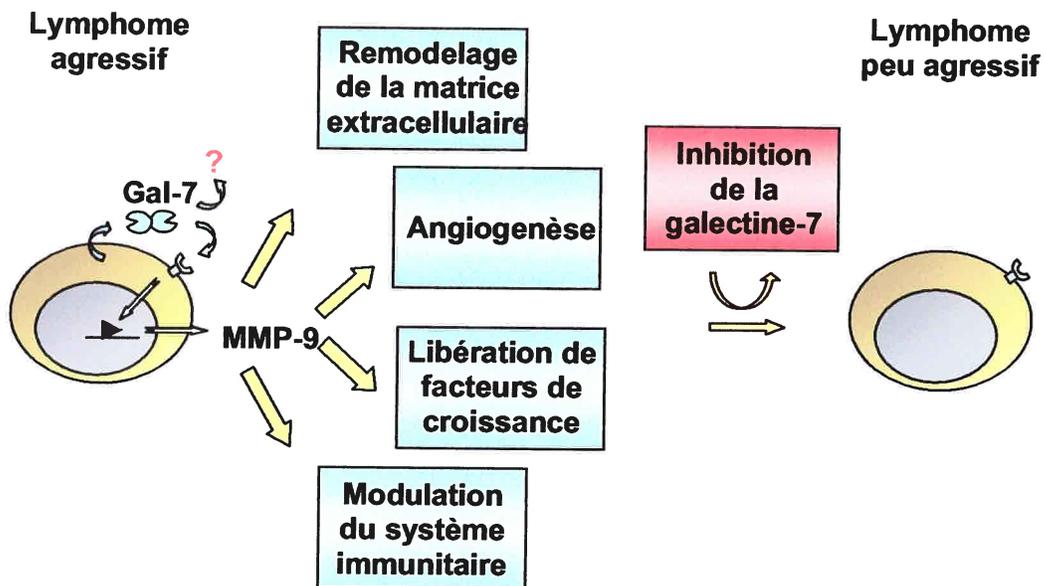
Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

Demers M., Biron-Pain K., Hebert J., Lamarre A., Magnaldo T., St-Pierre Y.  
Galectin-7 in lymphoma: Elevated expression in human lymphoid malignancies and decreased lymphoma dissemination by antisense strategies in experimental model  
(2007) *Cancer Research*, 67 (6), pp. 2824-2829.  
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3891

La galectine-7 est principalement retrouvée dans les épithéliums stratifiés squameux et dans une variété d'autres types de cellules cancéreuses. Comme pour d'autres membres de la famille des galectines, il a été démontré que l'expression de la galectine-7 régule négativement le développement de certains types de tumeurs alors que dans d'autres cas, elle corrèle avec leur progression. Par exemple, l'expression de la galectine-7 est associée aux carcinomes mammaires chez le rat ainsi qu'à la progression de lymphomes des cellules T. Dans ce travail, nous présentons des évidences qui indiquent que la galectine-7 est une molécule importante pour la dissémination des cellules de lymphome *in vivo*. Nous avons établi que la transfection stable de cellules de lymphome avec un plasmide codant pour l'ADNe antisense de la galectine-7 inhibait la dissémination et l'invasion des cellules lymphomateuses dans les organes périphériques, augmentant ainsi la survie des souris. Nous avons aussi observé que l'inhibition de la galectine-7 dans les cellules agressives corrèle avec une diminution de l'invasion des cellules tumorales dans les organes cibles et une réduction de l'expression de la métalloprotéinase de la matrice-9, un gène associé à un mauvais pronostic des lymphomes non-Hodgkiniens. Finalement, l'analyse de l'expression de la galectine-7 dans 50 échantillons de différents néoplasmes de cellules B matures a révélé que la galectine-7 est exprimée à des niveaux anormalement élevés dans une proportion significative de ces néoplasmes comparativement aux cellules B normales. L'ensemble de ces résultats suggèrent que la galectine-7 serait une cible thérapeutique potentielle pour le traitement anti-lymphomateux.

## CONCLUSION DU CHAPITRE 2

**Figure 11: La galectine-7 est une cible thérapeutique potentielle.** La sécrétion de la galectine-7 confère au lymphome des habiletés métastatiques reliées à sa capacité à induire des gènes pro-métastatiques. Si on inhibe son expression, on diminue la dissémination et l'invasion des cellules lymphomateuses dans le corps. La galectine-7 est donc une cible thérapeutique potentielle pour le traitement du lymphome.



## **CHAPITRE 3**

### RÉSUMÉ DU CHAPITRE 3

La galectine-7 est une protéine de liaison aux  $\beta$ -galactosides, identifiée à l'origine comme étant exprimée dans les épithéliums stratifiés, principalement dans les kératinocytes où son expression a été associée à l'apoptose induite suite à une exposition aux rayons UVB. Sa fonction pro-apoptotique est aussi reliée au fait que dans des cellules de carcinome du côlon, la galectine-7 a été démontrée comme étant l'un des gènes de réponse précoce exprimés suite à l'apoptose induite par p53. Par contre, dans les néoplasmes lymphoïdes murins et humains, nous avons démontré que la galectine-7 était constitutivement exprimée à de forts niveaux alors qu'elle était pratiquement indétectable dans les lymphocytes normaux. Les mécanismes responsables de l'activation du gène de la galectine-7 demeurent inconnus. Dans cette étude, nous avons analysé la régulation de l'expression de la galectine-7 dans les cellules de lymphome. Nous avons déterminé que la région du promoteur contenant 571 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription comprenait les éléments de régulation fonctionnels nécessaires à l'initiation de la transcription. Nous avons aussi démontré que l'induction de l'expression de la galectine-7 était indépendante de p53 dans les cellules de lymphomes T chez la souris, mais qu'une mutation dans la séquence consensus de CRE-BP à la position -59 du promoteur de la galectine-7, dans un gène rapporteur, bloquait l'activité luciférase. De façon plus importante encore, nous avons démontré que la méthylation de l'ADN jouait un rôle central dans le contrôle de l'expression de la galectine-7. Cette conclusion est basée sur nos résultats démontrant que les dinucléotides CpG présents dans le promoteur de la galectine-7 des cellules qui l'expriment constitutivement possèdent de plus faibles niveaux de méthylation que les cellules qui ne l'expriment pas. De plus, les cellules traitées avec un inhibiteur de méthylation expriment de forts niveaux de galectine-7 et les cellules ayant subi une ablation génétique pour les gènes Dnmt-1 et Dnmt-3b l'expriment constitutivement. Ces résultats mettent en évidence la contribution de l'hypométhylation en tant que mécanisme épigénétique contrôlant l'expression de la galectine-7 durant la progression du lymphome.

**Galectin-7, a gene expressed in aggressive cells, regulated upon  
methylation-based transcriptional induction.**

Mélanie Demers<sup>1</sup>, Julie Couillard<sup>1</sup>, Katherine Biron-Pain<sup>1</sup>, Ambra Mari-Giglia<sup>2</sup>, Thierry  
Magnaldo<sup>2</sup>, and Yves St-Pierre<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>INRS-Institut Armand-Frappier [M.D., K.B.P., J.C., Y.S.P.] University of Québec, Laval,  
Québec, Canada, H7V 1B7, and <sup>2</sup>CNRS, UPR 2169, "Instabilité Génétique et Cancer", Institut  
Gustave-Roussy, PR2 39, rue Camille Desmoulins, 94805 Villejuif, France [A.M.G., T.M.]

**Running title:** Galectin-7 transcriptional regulation

**Key words:** lymphoma, galectin-7, gene transcription, DNA methylation, cyclic AMP.

**Footnotes:**

<sup>1</sup> Supported by a grant from the Canadian Institute for Health Research (Grant No. MT-15011). Y.S.P is a scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). M.D. is supported by a studentship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). K. B. P. and J. C. are supported by a studentship from La Fondation Armand-Frappier.

<sup>2</sup> To whom requests should be addressed, at INRS-Institut Armand-Frappier, University of  
Quebec, 531 Boul. Des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7. Phone : 450-686-5354 ;  
Fax : 450-686-5501 ; E-mail : [yves.st-pierre@iaf.inrs.ca](mailto:yves.st-pierre@iaf.inrs.ca)

**ABSTRACT**

Galectin-7 is a  $\beta$ -galactoside-binding protein originally identified in stratified epithelia, most notably in epidermal keratinocytes where it is associated with apoptosis following exposure to UVB irradiations. Galectin-7 pro-apoptotic function has been established by the fact that in a human colorectal carcinoma cell line, galectin-7 has been shown to be one of the early-response genes to be expressed following p53-induced apoptosis. In human and murine lymphoid neoplasms, however, we have previously reported that galectin-7 was constitutively expressed at high levels whereas it was slightly detectable in normal lymphocytes. The underlying mechanisms that lead to activation of the galectin-7 gene remain unknown. In the present work, we investigated the regulation of galectin-7 expression in lymphoma cells. We found that the region of the promoter containing the 571 nucleotides upstream of the initiation codon contained the functionally independent transcriptional elements that were capable of initiating active transcription. We also found that upregulation of galectin-7 expression was independent of p53 in lymphoma cells but mutation of the CRE-BP consensus sequence at position -59 abolished luciferase activity of the galectin-7 reporter gene. Most importantly, we found that DNA methylation plays a central role in controlling galectin-7 gene expression. This conclusion was based on our results showing that cells expressing galectin-7 constitutively had low levels of DNA methylation at CpGs located in the promoter as compared to those not expressing galectin-7. Moreover, cells treated with a DNA methyltransferase inhibitor expressed high levels of galectin-7 and cells bearing genetic ablations for *Dnmt-1* and *Dnmt-3b* constitutively expressed galectin-7. These data highlight the contribution from DNA hypomethylation an epigenetic mechanism regulating galectin-7 expression during lymphoma progression.

**Key words:** galectin-7/DNA methylation/T cell lymphoma/

## INTRODUCTION

To define the cascade of genetic alterations, which underlie progression to lymphoid malignancy, we have recently employed an approach based on genomic analysis of an aggressive lymphoma variant and its non-aggressive parental cells. We found that the most prominent change among the genes tested was the strong upregulation of galectin-7 in aggressive lymphoma cells (1). Galectins are carbohydrate-binding proteins with an affinity for  $\beta$ -galactosides (2). To date, 14 mammalian galectins have been identified and several have been shown to be secreted and capable of altering cellular functions, such as cell-cell or cell-matrix adhesion. In mammals, their distribution is tissue specific and their expression is developmentally regulated (2,3). In the case of Galectin-7, it was initially described as a marker of the differentiation levels of keratinocytes by Madsen and colleagues (4). It is also expressed in the sheath of the hair follicle, in the oesophagus and oral epithelia, cornea, and the Hassal's corpuscles of the thymus (5). It plays a crucial role in epithelial cell migration and in the re-epithelialization of corneal and/or epidermal wounds (6-8). The mechanisms regulating its expression remains, however, largely unknown, mostly in the case of tumor cells. Some observations suggest that galectin-7 may be under p53 control, since galectin-7 is one of the 14 transcripts out of 7,202 induced in colorectal cancer cells by p53 expression, whose major function is to regulate apoptosis and DNA repair (9). We have recently reported, however, high galectin-7 expression levels in a significant proportion of human mature B-cell lymphoid neoplasms but not in normal B lymphocytes (10). Here we report the first study on the promoter region of the galectin-7 gene. We identified regulators of expression of this galectin and found that the 5' proximal region is under epigenetic control.

## MATERIAL AND METHODS

**Culture of cell lines and reagents.** The mouse T lymphoma cell lines 267 and 164T2 were established in our laboratory from radiation-induced primary T cell lymphomas in C57BL/Ka (11). The Jurkat human T lymphoma cell line, Raji B lymphoma cell line, 4T1 murine breast carcinoma cell line, MDA-MB-231 and MCF-7 human breast adenocarcinoma cell lines were purchased from American Type culture collection (Rockville, MD). HCT116 parental and knockout human colon carcinoma cell lines were a generous gift from Dr. Bert Vogelstein (Sydney Kimmel Cancer Center, John Hopkins University Medical Institutions, Baltimore, Maryland). All lymphoma cells were maintained in RPMI-1640 complete medium (supplemented with 10 % (v/v) FCS, 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES buffer, 0.1 unit/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin and 55 µM β-mercaptoethanol). 4T1, MDA-MB-31 and MCF-7 cell lines were maintained in DMEM complete medium (supplement with 8 % (v/v) FCS, 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES buffer, 0.1 unit/ml penicillin, 50µg/ml streptomycin, sodium pyruvate 1mM (4T1 and MCF-7) and sodium bicarbonate 0.075% (4T1)). HCT116 and knockout were grown in McCoy's 5A complete medium. For treatment with doxorubicin (DOX)  $7 \times 10^6$  were resuspended in complete medium containing the indicated concentrations of DOX and incubated for the indicated times at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. For treatment with 5'aza-3'-deoxyxytidine (5'Aza-dC) (Sigma Chemicals, St. Louis, MO),  $1 \times 10^6$  for Jurkat and Raji cells,  $1 \times 10^5$  for 4T1 cells,  $1.5 \times 10^5$  for MDA-MB-231 and MCF-7 cells and  $2 \times 10^5$  for HCT116 cells were resuspended in complete medium containing the indicated concentrations of 5'Aza-dC and incubated for 72 hours at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. For treatment with dibutyryl cAMP (dbcAMP),  $1 \times 10^6$  Jurkat and  $1 \times 10^5$  4T1 cells were resuspended in complete medium containing the indicated concentrations of dbcAMP and incubated for the indicated times at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

All products were from GIBCO Life Technologies (Burlington, ON, Canada). Horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit secondary antibodies were obtained from Amersham (Amersham Pharmacia, QC). The antibody against p53 (FL-393) was purchased from Santa Cruz (Santa Cruz, CA). The rabbit polyclonal antibody specific for galectin-7 has been described (12). All other reagents were purchased from Sigma, unless otherwise indicated.

***In vivo* selection of highly aggressive mouse lymphoma cell lines.** The aggressive 164T2S11 (S11) and 164T2S19 (S19) cell lines were established from serial *in vivo* passages (11 and 19, respectively) of the parent 164T2 line in young adult C57BL/6 males using the spleen as the organ from which lymphoma cells were harvested following intravenous injection, as previously described (13). Briefly, for each passage, 6-8 week-old mice were injected via the tail vein with  $10^6$  lymphoma cells. When mice presented clinical signs of lymphoma, they were sacrificed and lymphoma cells were isolated from the spleen (S) or kidneys (K). A leukocyte suspension was obtained by removing red blood cells using the standard ammonium chloride-based protocol. The 164T2S3.2 (S3.2) and the 164T2S9.2 (S9.2) cell lines were established following three and nine *in vivo* passages, respectively, of the parental 164T2 cells in C57BL/6 spleen. The 164T2K3.1 (K3.1), 164T2K6.1 (K6.1), 164T2K15.1.3 (K15.1.3), 164T2K3.2 (K3.2), 164T2K6.2 (K6.2), 164T2K9.2 (K9.2) and 164T2K12.2 (K12.2) cell lines were established after three, six, nine, twelve and fifteen passages respectively using the kidney as the organ from which lymphoma cells were harvested following intravenous injection. Such clones were maintained in culture without loss of aggressiveness (1,13).

**Western blot analysis.** Cells were washed with PBS and resuspended in lysis buffer (10 mM Tris (pH 7.5), 2.5% Triton X-100) containing protease inhibitors (Complete tablets, Roche,

Laval, QC). Equal amounts of whole-cell extracts (40 and 100 µg for galectin-7 and p53, respectively) were separated on SDS-PAGE gel and transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON). The membranes were blocked with 10% milk in PBS/0.5% Tween 20 overnight, subsequently blotted for 2 hours with primary antibodies. Membranes were probed with polyclonal rabbit anti-galectin-7 (1:500) (12) or rabbit monoclonal anti-p53 antibody (0.2 µg/ml). Secondary antibodies consisted of horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit IgG. Detection was performed by the enhanced chemiluminescence method (Amersham).

**RNA isolation and semi-quantitative PCR.** Total RNA was isolated from lymphoma cells using Trizol reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen Canada Inc., Burlington, ON). Two µg of total RNA was reverse transcribed using the Omniscript™ reverse transcriptase (QIAGEN) and PCR amplified using the following conditions: 94°C for 0.5 min., 54°C for 1 min., and 72°C for 1 min. Then, a final extension step at 72°C for 10 min. The primers used for PCR amplification are listed in **Table II**. Thirty (for *galectin-7* and *GAPDH* gene amplification) and 35 (*p21*) cycles of amplification were performed in a thermal cycler (model PTC-100 TM, MJ Research, Watertown, MA). The amplification for each gene was in the linear curve. Ten µl of the reaction mixture was size-fractionated on a 1.2-% agarose gel and specifically amplified products were detected by ethidium bromide staining and UV transillumination. Loading was normalized against the internal control mRNA (*GAPDH*).

**DNA isolation and methylation-sensitive restriction mapping of the galectin-7 promoter.**

To document methylation at specific CpG sites within the galectin-7 promoter, genomic DNA from lymphoma cells was isolated using Intergen DNA extraction kit according to manufacturer's instructions (Serologicals Corporation, Toronto, ON). Briefly, 20-50 x 10<sup>6</sup>

lymphoma cells were collected and gently lysed. The nuclei were pelleted and enzymatically deproteinated. DNA was precipitated with absolute ethanol and re-solubilised. DNA was then digested with the restriction endonucleases HpaII (10U/μl) and MspI (8U/μl), or incubated without enzymes (control) for 3 hours at 37°C. Galectin-7 promoter fragments were amplified using 5 μl of each digestion products and specific primers (**Table II**). Unless otherwise indicated, thirty cycles of amplification were performed in a thermal cycler (MJ Research), using the following program: 94°C for 0.5 min., 64°C for 1 min., and 72°C for 1 min. (2 min. for -2003 nt.). Then, a final extension step at 72°C for 10 min. was performed. Ten μl of the reaction mixture was size-separated on a 1.2-% agarose gel and specifically amplified products were detected by ethidium bromide staining and UV transillumination.

**Determination of the nucleotide sequence of the murine galectin-7 promoter and plasmid constructions.** The 5' region of the *galectin-7* gene of the S19 cell line was subjected to automated DNA sequencing from gel-purified PCR fragments using primers designed to amplify regions -2003 to +21 and -571 to +21 (**Table II**). The resulting 2024 and 592 bp PCR products were subsequently cloned into pCR4-Topo vector (Invitrogen Canada Inc., Burlington, ON). Inserts were excised using EcoRI, blunted and subcloned into the SmaI restriction site of pGL3-basic vector (Promega, Madison, WI). Creation of point mutations in the -571/+21 fragment were made by PCR-based site-directed mutagenesis to generate the ΔCRE-BP -59 (TTGCCTTTACTTAAAGGTCCCC to TTGCCTTTACCCAAGGTCCCC), the ΔSP1-173 (TGTGTGGGGGCAGGGCAGGAGGA to TGTGTGGGGCCTTGGGCAGGAGGA, the ΔCRE-BP-434 (GCCTGTCTTTGACGGCAGAAGCAGAGG to GCCTGTCTTTGATTCAGAAGCAGAGG and the ΔSP1-515 (GGTAACCTGGGGGTAGGGTGG to GGTAACCTGGGGCCATGGGTGG) using the

Quick Change Site-directed mutagenesis method (Stratagene). Automated nucleotide sequencing confirmed the presence of the expected mutations.

**Transient transfection and luciferase assay.** Jurkat, HCT116 and 4T1 cells were seeded one day prior to transfection into a 6-well plate at a concentration of  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^5$  and  $1 \times 10^5$  cells per well respectively. Cells were then washed twice with PBS and transfected with 2.5  $\mu$ g luciferase plasmid using DNAfectin reagent according to manufacturer's protocol (Applied Biological Materials Inc., Vancouver, Canada). For luciferase assays, normalization in transfection efficiency was measured by cotransfection with 0.5  $\mu$ g  $\beta$ -galactosidase construct (kindly provided by Dr. Pierre Lemieux, Supratek Pharma, Laval, QC). The culture medium was changed to complete medium 5 h after transfection for 48 h. Cell lysis and luciferase assays were performed using the Luciferase Assay System (Promega, Madison, WI) in a luminometer (Berthold Lumat LB 9507) and values were converted to relative light units (RLU).  $\beta$ -Galactosidase activity was measured with the  $\beta$ -galactosidase Assay System kit (Clontech, Mountain View, USA).

## RESULTS

**Galectin-7 expression is induced in several lymphoma cells during their transition toward aggressiveness.** Using a genomic approach, we have previously compared the transcriptome of low metastatic variants with their aggressive variants isolated from serial *in vivo* passages using the spleen as the target organs from which the lymphoma cells were recovered. Galectin-7 was identified as one such gene whose expression was significantly upregulated in aggressive lymphoma (1). To further characterize whether upregulation of galectin-7 expression in T lymphoma cells was dependent of tumor microenvironment, Western blot analysis was carried out on lymphoma cell lines established from three independent series of *in vivo* passages with

the 164T2 parental cells that were recovered for each passage from tumors located in the spleen or the kidneys. We found that galectin-7 protein was upregulated in most of our cell lines tested, whether they were isolated from the spleen or the kidneys (**Fig. 1A and B**). Most remarkably, despite the fact that galectin-7 had been previously associated to pro-apoptotic activity, the level of expression of galectin-7 in lymphoma cells remained stable for up to 15 and 19 *in vivo* passages of lymphoma cells in both tissue microenvironment. In fact, the observation that galectin-7 expression increased upon *in vivo* passages suggests that a selective pressure favored cells expressing this protein (**Fig. 1B**).

**p53 does not regulate galectin-7 in lymphoma cells.** To address the molecular mechanism responsible for the upregulation of galectin-7 in lymphoma cells, we first examined the role of p53 since previous studies had reported that galectin-7 could be induced by p53, at least in the case of human colorectal cancer cells (9). Our results clearly showed, however, that the level of galectin-7 expressed in different lymphoma cell lines did not correlate to p53 levels. In fact, although most of our lymphoma cell lines expressed galectin-7 constitutively, most of these cells did not express detectable levels of p53 (**Fig. 2A**). Similar results were obtained when we examined p53 expression at the mRNA level (*data not shown*). Using the mouse *p53* genomic sequence (accession number mCG15749.1) as a reference, DNA sequencing performed from the DNA of lymphoma cell lines (164T2, 267, and S19), expressing or not galectin-7, showed no mutations in regions of the p53 gene previously associated with genetic alterations of p53 expression.

The p53 protein has a short half-life and is normally maintained at low, often undetectable levels in cells (14). Its expression levels can, however, be induced, upon exposure to various chemotherapeutic drugs (15,16). To study whether induction of p53 could upregulate

galectin-7 expression, lymphoma cells were treated with increasing concentrations of doxorubicin (DOX) for four hours and analyzed for galectin-7 expression. Our results showed that although such treatment induced a strong increase in the steady-state level of p53 in 164T2 and S11 lymphoma cells, we could not detect increased expression of galectin-7 upon treatment (**Fig. 2B**). As expected, however, increase of p53 protein level following such treatment induced p21<sup>Waf1/Cip1</sup>, a cyclin-dependent kinase inhibitor known to mediate some of the biological effects of p53 activation (**Fig. 2C**) (17), providing that p53 in these lymphoma cells is functional. Taken together, these results suggest that upregulation of galectin-7 in lymphoma cells is p53 independent.

**Methylation status of galectin-7 in murine lymphoma cells.** We have previously shown that the expression of galectin-7 is activated in T lymphoma cells treated with the inhibitor of DNA methylation 5-aza-2'-deoxycytidine (5'Aza-dC) (1). To determine whether aberrant promoter methylation could contribute to the variation of galectin-7 expression in our cell lines, we examined the methylation status at CpGs sites within its promoter in lymphoma cells with different galectin-7 expression by PCR amplification of genomic DNA after restriction digest with the methylation-sensitive enzyme HpaII (CCGG). In the first series of experiments, we have examined the methylation status of CpGs located in the 5' flanking region of the galectin-7 gene (from -2003 bps upstream to + 21 bps of the ATG start codon) in various lymphoma cell lines expressing or not galectin-7 (**Fig. 3A**). We found that lymphoma cells that do not express galectin-7, such as 164T2 cells, were heavily methylated in this promoter region as compared to the S19 lymphoma cells which constitutively express galectin-7 (**Fig. 3B**). To examine further methylation status of the *galectin-7* gene promoter in other cell lines, we used primer pairs which amplify across the MspI/HpaII sites located within promoter region (located at positions -145, -903, and -1221 bps upstream of the ATG start codon). Undigested or DNA

digested with MspI were both used as controls to assess the quality of genomic DNA source and accessibility of individual sequences to restriction enzymes. We found that the 164T2 lymphoma cells were heavily methylated at all three HpaII/MspI sites, as evidenced by the resistance of PCR products to HpaII digestion (**Fig. 3C**). Methylation of these three sites was also observed in the 267 lymphoma cells, which also do not express galectin-7 (1,18) (*data not shown*). In contrast, all three cell lines expressing galectin-7 had PCR products sensitive to HpaII digestion, indicating of low methylation at CpGs islands within the promoter. The presence of very small amount of PCR products most likely reflect the fact that CpG methylation is often significantly less than 100%, as reported in methylation analysis of other promoters (19).

**Impaired methylation induces galectin-7 expression in human cell lines.** We further examined the importance of DNA methylation in relation to galectin-7 expression. First, we found that treatment of both human Jurkat T lymphoma and human Raji B lymphoma cell lines with the pharmacological inhibitor of DNA methylation 5'Aza-dC induced a dose-dependent galectin-7 expression (**Fig. 4A**). Second, this inhibition of DNA methylase activity in human MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cell lines as well as in the human HCT116 carcinoma cells also induced *de novo* expression of galectin-7 in these cells (**Fig. 4B**). Moreover, galectin-7 expression was also induced in HCT116, MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines after treatment with another DNA methyltransferase inhibitor, zebularine which have a better stability, lower toxicity and higher selectivity (20) (*data not shown*). Finally, double knock out (DKO) HCT116 cells bearing genetic ablations for *Dnmt-1* and *Dnmt-3b* (DKO) (21), which is commonly used to unmask the role of hypomethylation on gene expression, constitutively expressed higher levels of galectin-7 mRNA as compared to their parental wild-

type parental cells (**Fig. 4C**). Taken together, these results indicate that DNA methylation plays a central role in controlling galectin-7 gene expression.

**Functional analysis of the murine *galectin-7* gene promoter.** To further understand the control of galectin-7 gene transcription, two genomic DNA fragments containing 2,024 bp (-2003 to +21) and 592 bp (-571 to +21) encompassing the 5'-flanking region of the mouse galectin-7 gene upstream of the translation start codon ATG were isolated by PCR from S19 lymphoma cells and cloned into the pGL3-Basic vector. Sequence analysis revealed that the galectin-7 promoter region contains one canonical TATA box and putative binding sites for the following transcription factors: Sp1, AP-1, CRE-BP, GATA-1, etc. In addition, the promoter also contains several GC boxes (**Fig. 3A**). These fragments were cloned upstream of the firefly luciferase cDNA into pGL3-basic vector, assessed for promoter activity and tested for their ability to drive the expression of the luciferase reporter gene in different cell lines. Our results show that the short fragment (-571 to +21) contained functionally independent transcriptional elements that were capable of initiating transcription in Jurkat cells (**Fig. 5A**). The level of transcriptional activity obtained with the short fragment was comparable with that obtained with the longer fragment containing 2,024 bp. Similar results were obtained in the human HCT116 colon carcinoma cells and the murine 4T1 breast cancer cell line (**Fig. 5B and C**).

To evaluate the roles of the Sp1 and the CRE-BP in the galectin-7 gene activation, we introduced site-directed mutations at individual Sp1 and CRE-BP sites in the galectin-7 promoter-reporter gene construct containing the minimal promoter. We found that mutations of the CRE-BP consensus TTACTTAA to TTACCCAA at position -59 but not at position -434 reduced luciferase gene expression as compared to the wild-type control, whereas mutations of

the Sp1 had no effect in all cell lines tested (Fig. 5A-C). Taken together, these results indicate that the proximal -571 nucleotides of the promoter are sufficient for *galectin-7* transcription and suggest CRE-BP may play a fundamental role in the control of *galectin-7* expression, at least in tumor cells.

**Induction of the cyclic AMP pathway results in increased galectin-7 expression.** Since mutations of the CRE-BP binding site located at -59 nucleotides repressed the transcriptional activity of the *galectin-7* promoter, we assessed whether if *galectin-7* expression could be increased upon triggering of the cAMP pathway. To test this possibility, Jurkat lymphoma cells were treated with 1mM of dibutyryl cyclic AMP (dbcAMP) and *galectin-7* mRNA expression was monitored by RT-PCR at different time post-stimulation. The results showed that *galectin-7* is induced in Jurkat cells after treatment with dbcAMP and that the expression is highest after 18 hours of treatment (Fig. 6A). As expected from our previous results with the reporter vector, this induction was not restricted to lymphoma cells but was also observed using 4T1 breast carcinoma cells (Fig. 6B). Moreover, treatment with forskolin, an activator of adenylyl cyclase, also increased *galectin-7* expression (*data not shown*). Taken together, these results showed that the cAMP pathway is implicated in the regulation of *galectin-7* expression.

## DISCUSSION

We have previously reported high levels of *galectin-7* expression in a significant proportion of human and murine lymphoid neoplasms but not in normal lymphocytes. How *galectin-7* gene expression is induced in lymphoma cells is unknown. What we detail here is the first characterization of the *galectin-7* gene promoter and its activation by DNA hypomethylation. For this purpose, we adopted a strategy based on *in silico* sequence analysis and luciferase reporter gene assays. Our results show that: 1) in contrast to what has previously been reported

in the case of human colon carcinoma cells, upregulation of galectin-7 expression was independent of p53 in lymphoma cells; 2) the region of the promoter containing 571 nucleotides upstream of the initiation codon contained all functionally independent transcriptional elements capable of initiating transcription; 3) mutation of the CRE-BP consensus sequence at position -59 abolished luciferase activity of the galectin-7 reporter gene, and 4) DNA methylation plays a central role in controlling galectin-7 gene expression since cells expressing galectin-7 constitutively had low levels of DNA methylation at CpGs located in the promoter as compared to those not expressing galectin-7 and cells treated with a DNA methyltransferase inhibitor or bearing genetic ablations for *Dnmt-1* and *Dnmt-3b* constitutively expressed higher levels of galectin-7.

Galectin-7 is a 15 kDa protein originally found in the human epidermis (4,22). In contrast, galectin-7 was not reported to be expressed in simple epithelial from endodermal origin such as the kidney or the liver (5,23). In fact, galectin-7 has often been associated with apoptosis, most notably in keratinocytes following UVB irradiation (12) which is known to stabilize the p53 protein. Galectin-7 has also been identified as one of the p53 inducible genes, raising the possibility that it may be implicated in p53-mediated transcriptional activation and apoptosis (9). The fact that galectin-7 was expressed at high levels in chemically-induced rat mammary carcinoma (24) and in mouse and human lymphoid malignancies (10,18) indicate, however, that different biological functions might be attributed to galectin-7 and that distinct transcriptional mechanisms are likely to be involved in different cell types, most notably in different types of tumor cells. This may explain the apparent conflicting results showing that galectin-7 expression is p53 independent in lymphoma cells, as compared to what occurs in colon carcinoma cells.

Major attention has recently focused on DNA methylation as a possible regulatory mechanism for the expression of a number of genes during the malignant process (25). Aberrant genomic methylation found in cancer cells suggests that the imbalance in the methylation status of the genome may contribute to tumor progression by favoring reactivation of promoters of genes involved in different aspects of tumorigenesis (26). Rosty *et al.*, (27) have recently reported hypomethylation of the S100A4 gene in pancreatic cell carcinomas. A correlation of hypomethylation and expression of MN/CA9 (a tumor-associated antigen) was reported by Cho *et al.*, (28) in renal cell carcinomas. Additionally, DNA hypomethylation and overexpression has been shown for MDR in myeloid leukemia (29), for BCL-2 in chronic lymphocytic leukemia (30), for MAGE-1 in melanomas (31) and for c-Ha-RAS in gastric carcinomas (32). Recently, Strichman-Almashanu *et al.*, (33) have identified unique CpG islands that are methylated specifically in normal tissues but not in cancers. Using an experimental lymphoma model, we have previously shown that hypomethylation favors the emergence of aggressive lymphoma cells by inducing MMP-9 (34), a gene associated to high-grade lymphomas (35,36). We had also shown that demethylating agents induce the expression of galectin-7 in lymphoma cells (1). In the present work, we provide additional evidence that galectin-7 is regulated by DNA methylation. To our knowledge, this is the first study reporting that galectin-7 is regulated by DNA methylation. The silencing of galectin-7 during normal lymphocyte development at the early stages of lymphoma progression could thus be necessary to suppress the influence of specific transcription factor, such as CRE-BP. Such possibility for a role in DNA methylation in the expression of other members of the galectin family has been raised in other types of cancers. Galectin-3 promoter, for instance, is highly methylated in pituitary as well as in other tumors but not in normal tissue (37,38).

In conclusion, our studies provide a starting point for a more detailed examination of galectin-7 gene regulation. Our findings strongly suggest that DNA methylation and CRE-BP but not p53 likely play a role in the induction of galectin-7 expression during lymphoma progression. Further studies are needed to elucidate the functional relationship between these mechanisms and whether they also play a role in the expression of galectin-7 in normal development.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Doris Legault and Diane Tremblay for their excellent technical support, Dr. Bert Vogelstein for providing HCT116 and knock-outs cell lines, Dr. Pierre-Olivier Estève for helpful advice, and Dr. Edouard F. Potworowski for critical reading of the manuscript.

**FIGURE LEGENDS**

**FIGURE 1. Analysis of galectin-7 expression in lymphoma cells.** Western blot analysis of galectin-7 in lymphoma cell lines isolated from *in vivo* passages using the (A) spleen or the (B) kidney as the organ from which lymphoma cells were harvested following intravenous injection. Proteins from cell lysates were immunodetected with galectin-7-specific polyclonal antibodies as described (1,12). Results are representative of three independent experiments.

**FIGURE 2. p53 expression does not correlate with galectin-7 expression in lymphoma cells.** A, Western blot analysis of p53 and galectin-7 in murine lymphoma cell lines. Proteins from cell lysates were immunodetected with galectin-7-specific polyclonal antibodies as described. Cos-7 cells, which express p53 constitutively, were used as a positive control for p53 expression. B, Activation of p53 in lymphoma cells fails to induce galectin-7 expression. Lymphoma cell lines (164T2 and S11) were maintained in complete medium and treated with the indicated doxorubicin concentrations. Total cell proteins from each sample were resolved in SDS/PAGE, transferred, and immunoblotted with antibodies against p53 and galectin-7. Untreated cells were included as controls. Data are representative of three independent experiments. C, Induction of p21<sup>Waf1/Cip1</sup> in T lymphoma cells by doxorubicin treatment. Lymphoma cells were treated for the indicated times with doxorubicin concentration of 0.005 µg/ml and 0.05 µg/ml. Total RNA was extracted and expression of p21<sup>Waf1/Cip1</sup> was assessed by RT-PCR using specific primers. The expression of GAPDH was included as an RNA loading control. Data are representative of two independent experiments.

**FIGURE 3. Methylation status of galectin-7 promoter in lymphoma cells.** A, Schematic diagram of galectin-7 promoter depicting the methyl CpG dinucleotides and the relevant *cis*-acting elements. The vertical green lines represent the location of CpG dinucleotides, and the

arrow indicates the approximate position of the transcription start site. The horizontal bars below the schematic indicate the location of the DNA fragments amplified by methylation-sensitive restriction fingerprinting on the DNA recovered from lymphoma cells. B, Genomic DNA was digested with HpaII and MspI, or incubated without enzymes (control) for 3 hours at 37°C. The presence of a 2024 bp product after PCR amplification indicates that galectin-7 promoter was methylated in 164T2 cells, but not in S19 cells. C, Methylation status of individual CpGs located within specific HpaII sites in the galectin-7 promoter of different lymphoma cell lines was further confirmed using primers encompassing specific HpaII sites (located at position -145, -903 and -1221 bps). Lane M indicates the DNA ladder. Data are representative of three independent experiments.

**FIGURE 4. Galectin-7 is expressed in human cancer cells with impaired methylation.**

Expression of galectin-7 assessed by RT-PCR analysis following a 72 hours treatment with the 5'Aza-dC demethylating agent at the indicated concentrations. Induction of galectin-7 has been observed in (A) Jurkat (*left*) and Raji (*right*) human lymphoma cells, (B) MCF-7 (*left*), MDA-MB-231 (*right*) breast cancer cell lines and HCT116 (*bottom*) colon carcinoma cell line. (C) Constitutive galectin-7 mRNA expression in DKO somatic cells double-knock-outs for *Dnmt-1* and *Dnmt-3b* compare to their parental counterparts HCT116 as assessed by RT-PCR analysis. The expression of GAPDH was included as an RNA loading control. Results are representative of two independent experiments.

**FIGURE 5. Mutation of CRE-BP binding site repressed *galectin-7* gene activation.**

Luciferase reporter assay demonstrating *galectin-7* promoter activity in (A) Jurkat human T lymphoma cells, (B) HCT116 human colon carcinoma cells and (C) murine 4T1 mammary carcinoma cells. Fragments encompassing -2003/+21 and -571/+21 of the *galectin-7* promoter

have been fused to luciferase gene. Site-directed mutagenesis for two SP1 recognition sites ( $\Delta$ -173 and  $\Delta$ -515) (black box) and two CRE-BP recognition sites ( $\Delta$ -59 and  $\Delta$ -434) (black rhombus) have been generated with the -571/+21 fragment. Constructs were transiently co-transfected for 48 hours with pCMV/ $\beta$ -gal and cell lysates used to evaluate luciferase activity. Values of luciferase activities were normalised for transfection efficiencies by assaying for  $\beta$ -galactosidase activity. The histogram represents the mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments performed in duplicates.

**FIGURE 6. Induction of galectin-7 expression following dibutyryl cAMP treatment.** A, Time-course kinetic of galectin-7 mRNA expression in Jurkat human T lymphoma cell line treated with 1 mM of dbcAMP. Histogram shows the quantitative analysis of galectin-7 expression performed by imaging densitometry. B, mRNA analysis of galectin-7 expression in 4T1 mammary carcinoma cells treated with the indicated concentrations of dbcAMP for 18 hours. Total RNA was extracted and galectin-7 expression was assessed by RT-PCR. The expression of GAPDH was included as an RNA loading control. Data are representative of two independent experiments.

## REFERENCES

1. Moisan, S., Demers, M., Mercier, J., Magnaldo, T., Potworowski, E. F., and St-Pierre, Y. (2003) *Leukemia* **17**(4), 751-759
2. Barondes, S. H., Cooper, D. N., Gitt, M. A., and Leffler, H. (1994) *J Biol Chem* **269**(33), 20807-20810
3. Kasai, K., and Hirabayashi, J. (1996) *J Biochem (Tokyo)* **119**(1), 1-8
4. Madsen, P., Rasmussen, H. H., Flint, T., Gromov, P., Kruse, T. A., Honore, B., Vorum, H., and Celis, J. E. (1995) *J Biol Chem* **270**(11), 5823-5829
5. Magnaldo, T., Fowles, D., and Darmon, M. (1998) *Differentiation* **63**(3), 159-168
6. Cao, Z., Said, N., Amin, S., Wu, H. K., Bruce, A., Garate, M., Hsu, D. K., Kuwabara, I., Liu, F. T., and Panjwani, N. (2002) *J Biol Chem* **277**(44), 42299-42305
7. Cao, Z., Said, N., Wu, H. K., Kuwabara, I., Liu, F. T., and Panjwani, N. (2003) *Arch Ophthalmol* **121**(1), 82-86
8. Cao, Z., Wu, H. K., Bruce, A., Wollenberg, K., and Panjwani, N. (2002) *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**(9), 2897-2904
9. Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J. L., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1997) *Nature* **389**(6648), 300-305
10. Demers, M., Biron-Pain, K., Hebert, J., Lamarre, A., Magnaldo, T., and St-Pierre, Y. (2007) *Cancer Res* **67**(6), 2824-2829
11. Aoudjit, F., Potworowski, E. F., and St-Pierre, Y. (1998) *Blood* **91**(2), 623-629
12. Bernerd, F., Sarasin, A., and Magnaldo, T. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(20), 11329-11334
13. Lalancette, M., Aoudjit, F., Potworowski, E. F., and St-Pierre, Y. (2000) *Blood* **95**(1), 314-319
14. Brown, J. P., and Pagano, M. (1997) *Biochim Biophys Acta* **1332**(2), O1-6
15. Tewey, K. M., Rowe, T. C., Yang, L., Halligan, B. D., and Liu, L. F. (1984) *Science* **226**(4673), 466-468
16. Mahyar-Roemer, M., and Roemer, K. (2001) *Oncogene* **20**(26), 3387-3398
17. el-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1993) *Cell* **75**(4), 817-825
18. Demers, M., Magnaldo, T., and St-Pierre, Y. (2005) *Cancer Res* **65**(12), 5205-5210
19. Arthey, W. B., Sweet, M. P., Alig, G. C., and Arrick, B. A. (1999) *Cancer Res* **59**(10), 2292-2296
20. Yoo, C. B., Cheng, J. C., and Jones, P. A. (2004) *Biochem Soc Trans* **32**(Pt 6), 910-912
21. Rhee, I., Bachman, K. E., Park, B. H., Jair, K. W., Yen, R. W., Schuebel, K. E., Cui, H., Feinberg, A. P., Lengauer, C., Kinzler, K. W., Baylin, S. B., and Vogelstein, B. (2002) *Nature* **416**(6880), 552-556
22. Magnaldo, T., Bernerd, F., and Darmon, M. (1995) *Dev Biol* **168**(2), 259-271
23. Timmons, P. M., Colnot, C., Cail, I., Poirier, F., and Magnaldo, T. (1999) *Int J Dev Biol* **43**(3), 229-235
24. Lu, J., Pei, H., Kaeck, M., and Thompson, H. J. (1997) *Mol Carcinog* **20**(2), 204-215
25. Jones, P. A., and Baylin, S. B. (2002) *Nat Rev Genet* **3**(6), 415-428
26. Herman, J. G., and Baylin, S. B. (2003) *N Engl J Med* **349**(21), 2042-2054
27. Rosty, C., Ueki, T., Argani, P., Jansen, M., Yeo, C. J., Cameron, J. L., Hruban, R. H., and Goggins, M. (2002) *Am J Pathol* **160**(1), 45-50
28. Cho, M., Uemura, H., Kim, S. C., Kawada, Y., Yoshida, K., Hirao, Y., Konishi, N., Saga, S., and Yoshikawa, K. (2001) *Br J Cancer* **85**(4), 563-567

29. Nakayama, M., Wada, M., Harada, T., Nagayama, J., Kusaba, H., Ohshima, K., Kozuru, M., Komatsu, H., Ueda, R., and Kuwano, M. (1998) *Blood* **92**(11), 4296-4307
30. Hanada, M., Delia, D., Aiello, A., Stadtmuer, E., and Reed, J. C. (1993) *Blood* **82**(6), 1820-1828
31. De Smet, C., De Backer, O., Faraoni, I., Lurquin, C., Brasseur, F., and Boon, T. (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(14), 7149-7153
32. Fang, J. Y., Zhu, S. S., Xiao, S. D., Jiang, S. J., Shi, Y., Chen, X. Y., Zhou, X. M., and Qian, L. F. (1996) *J Gastroenterol Hepatol* **11**(11), 1079-1082
33. Strichman-Almashanu, L. Z., Lee, R. S., Onyango, P. O., Perlman, E., Flam, F., Frieman, M. B., and Feinberg, A. P. (2002) *Genome Res* **12**(4), 543-554
34. Chicoine, E., Esteve, P. O., Robledo, O., Van Themsche, C., Potworowski, E. F., and St-Pierre, Y. (2002) *Biochem Biophys Res Commun* **297**(4), 765-772
35. Stetler-Stevenson, M., Mansoor, A., Lim, M., Fukushima, P., Kehrl, J., Marti, G., Ptaszynski, K., Wang, J., and Stetler-Stevenson, W. G. (1997) *Blood* **89**(5), 1708-1715
36. Kossakowska, A. E., Hinek, A., Edwards, D. R., Lim, M. S., Zhang, C. L., Breitman, D. R., Prusinkiewicz, C., Stabler, A. L., Urbanski, L. S., and Urbanski, S. J. (1998) *Am J Pathol* **152**(2), 565-576
37. Ruebel, K. H., Jin, L., Qian, X., Scheithauer, B. W., Kovacs, K., Nakamura, N., Zhang, H., Raz, A., and Lloyd, R. V. (2005) *Cancer Res* **65**(4), 1136-1140
38. Ahmed, H., Banerjee, P. P., and Vasta, G. R. (2007) *Biochem Biophys Res Commun* **358**(1), 241-246
39. Xiao, H., Hasegawa, T., and Isobe, K. (1999) *J Cell Biochem* **73**(3), 291-302

**TABLE I:** Sequences of the oligoprimers used for DNA sequencing of p53.

<b>Primer F</b>	<b>Sequence 5'-&gt;3'</b>	<b>Primer R</b>	<b>Sequence 5'-&gt;3'</b>	<b>Exon #</b>	<b>size (bp)</b>
ME5F	TCTCTTCCAGTACTCTCCTC	ME5R	GAGGGCTTACCATCACCATC	5	204
ME5F	TCTCTTCCAGTACTCTCCTC	ME5-6R	AATTACAGACCTCGGGTGGCT	5-6	425
ME7F	GCCGGCTCTGAGTATAACCACCAT	ME7R1	GGAAACAGAGGAGGAGACTTCAT	7	257
ME7F	GCCGGCTCTGAGTATAACCACCAT	ME7R2	GGTAGATAGGGTAGGAAC	7	231
ME8F1	TCTTACTGCCTTGTGGCTGGTCCT	ME8R1	CAGGTGGGCAGCGCTGTGGAAGG	8	269
ME8F2	TCCCGGATAGTGGGAACCTT	ME8R2	GCCTGCGTACCTCTCTTGC	8	157

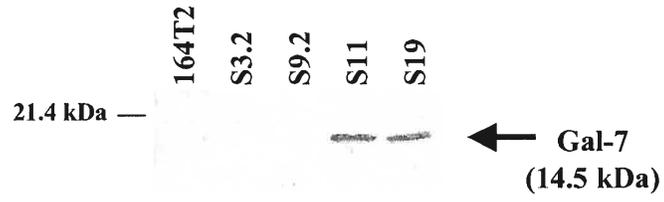
**TABLE II:** Sequences of the oligoprimers used for RT-PCR and methylation-sensitive restriction mapping.

<b>Gene/Specificity</b>	<b>Sense sequence</b>	<b>Antisense sequence</b>	<b>Nt. (bp)</b>
Human Galectin-7	ATGTCCACCGTCCCCACAAG	TGACGCGATGATGAGCACCTC	282
Human Galectin-7	TTGCTCCTTGCTGTTGAAGACCAC	AGGTTCCATGTAAACCTGCTGTGC	107
Murine Galectin-7	CCATGTCTGCTACCCATCAC	GCTTAGAAGATATTCAATGAATGC	411
Galectin-7 promoter -2003 nt.	CCATGTGTGTGTGAACCTGAAGAG	CCCCAGTATACTTACAGACATGGC	2024
Galectin-7 promoter -966 nt.	CAGGCTATTGGAAGTTCCCC	CCCCAGTATACTTACAGACATGGC	987
Galectin-7 promoter HpaII #1	GCCACTCCATTACTGACCAC	CCCCAGTATACTTACAGACATGGC	592
Galectin-7 promoter HpaII #2	CAGGCTATTGGAAGTTCCCC	GCCACTGTACTGACGTACAGG	287
Galectin-7 promoter HpaII #3	CCATGTGTGTGTGAACCTGAAGAG	GTTACCACTCCTAACAGCCCAGC	877
GAPDH	CGGAGTCAACGGATTTGGTCTGAT	AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC	306
p21 <sup>(Waf1/Cip1)</sup> <sup>a</sup>	AGATCCACAGCGATATCCAGAC	ACACACAGAGTGAGGGCTAAGG	604

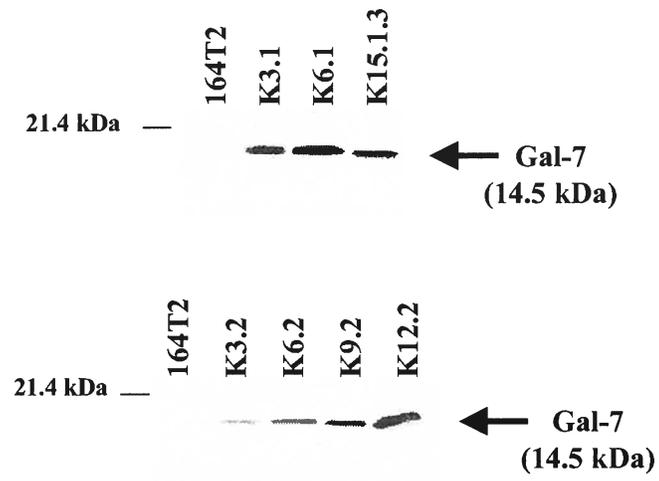
<sup>a</sup>Xiao et al.(39)

# Figure 1

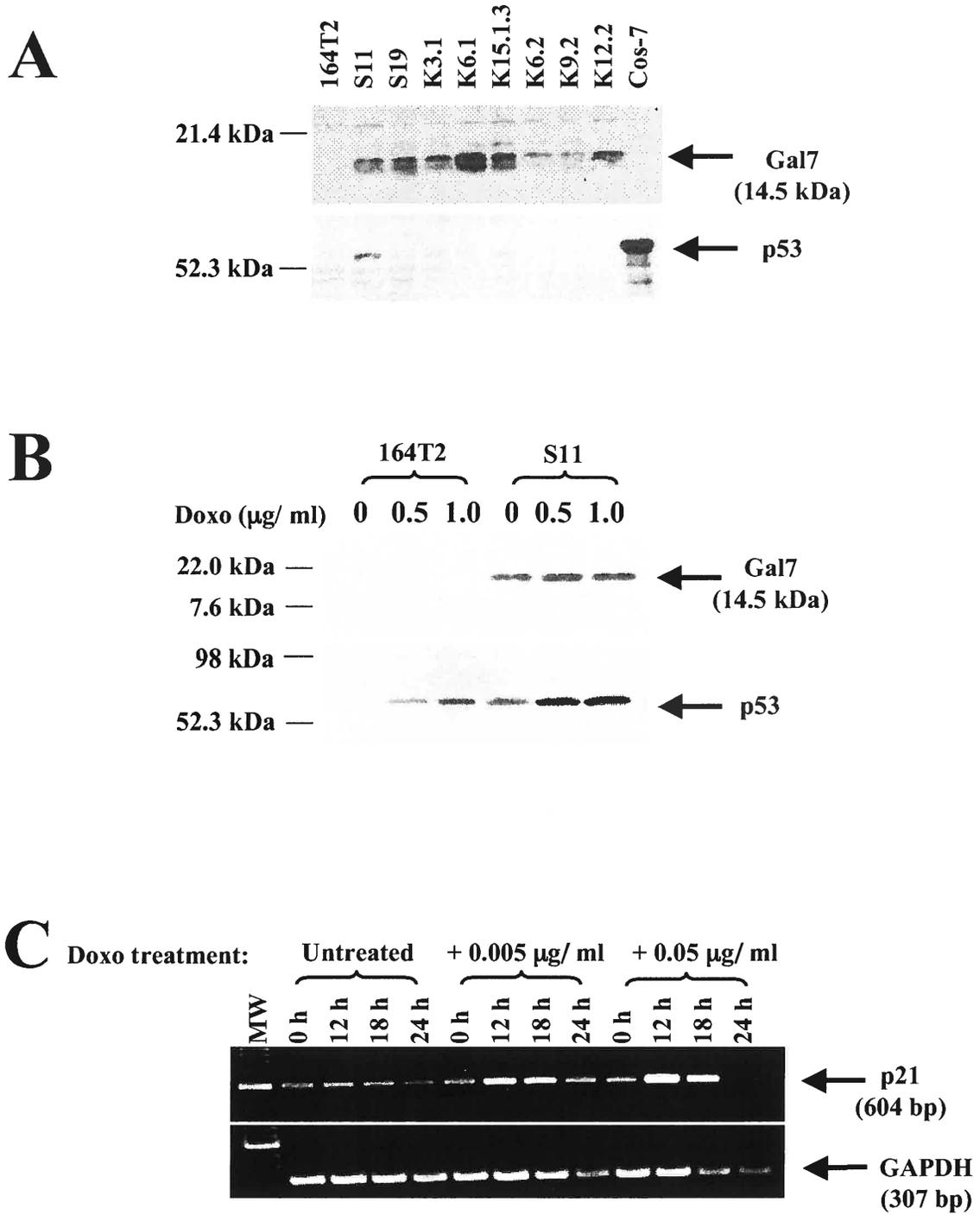
## A



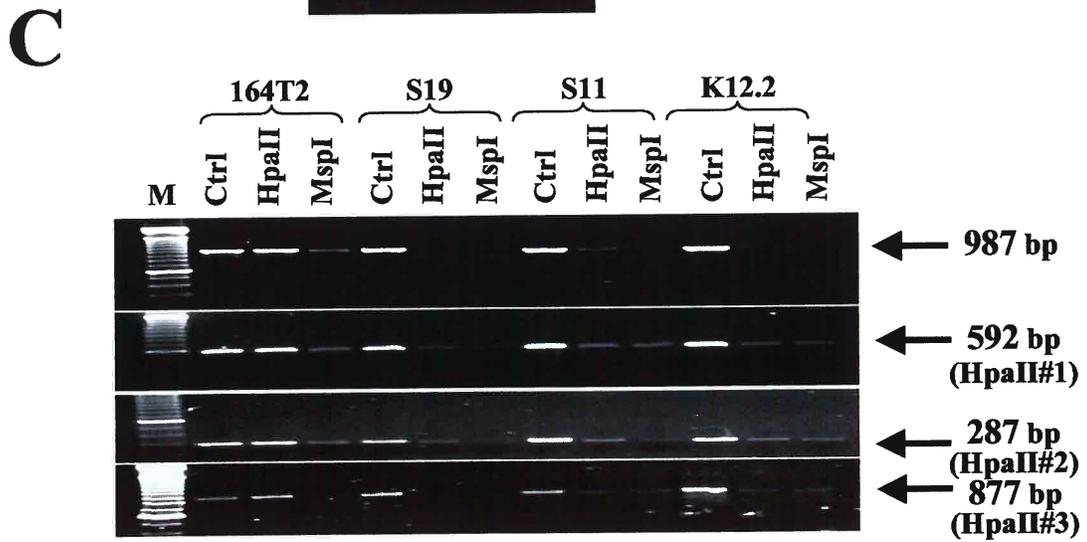
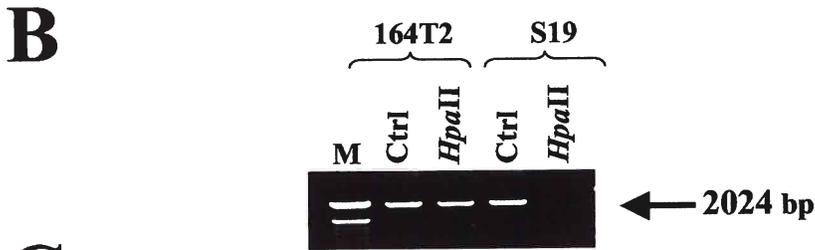
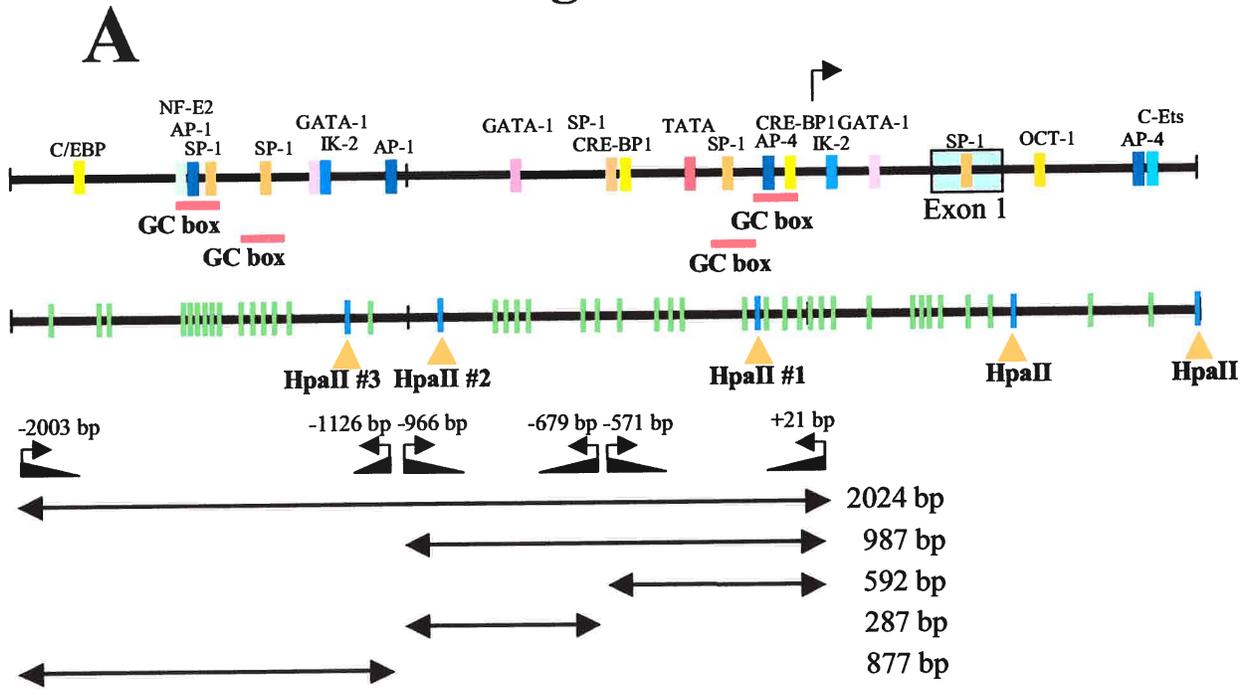
## B



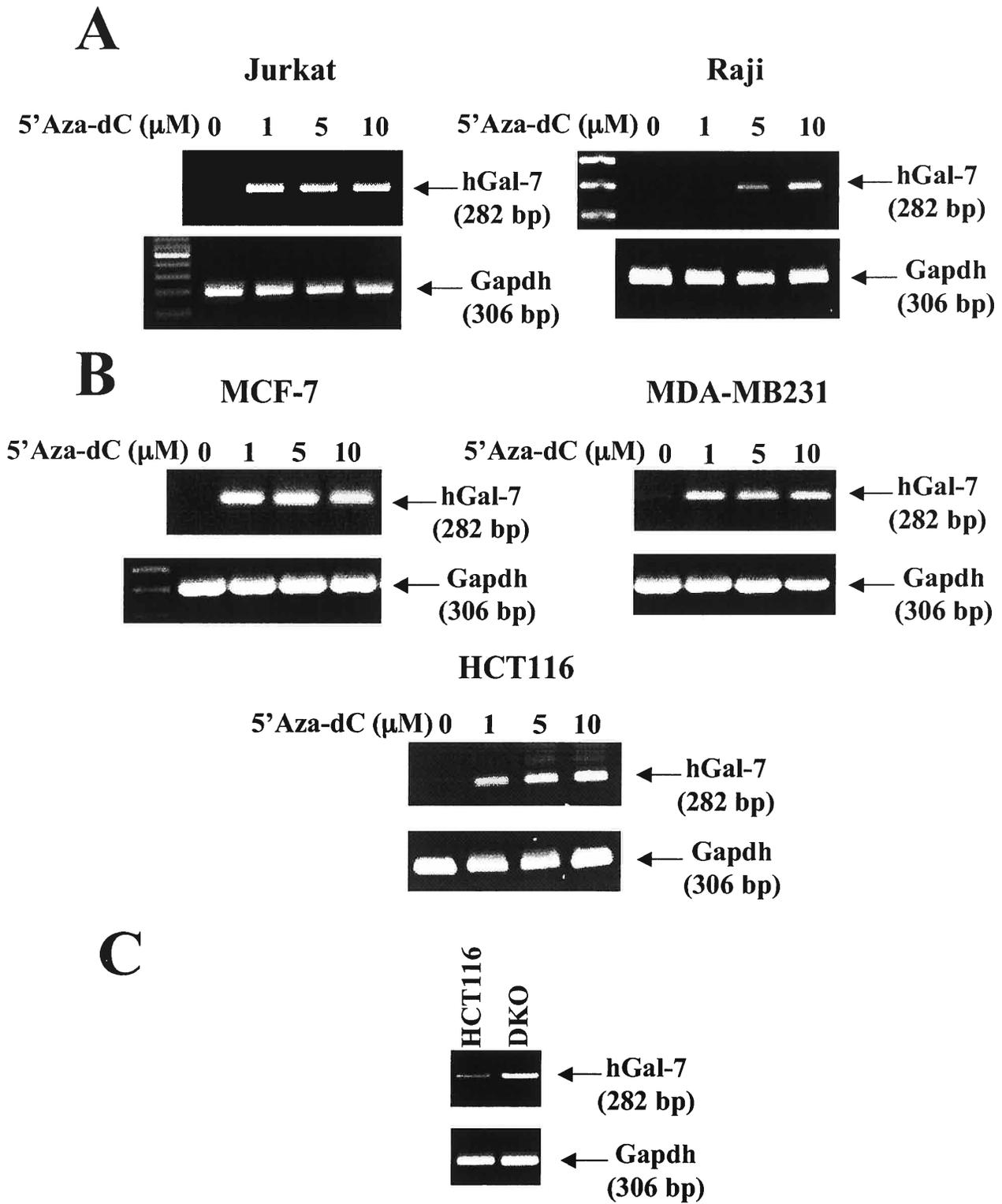
# Figure 2



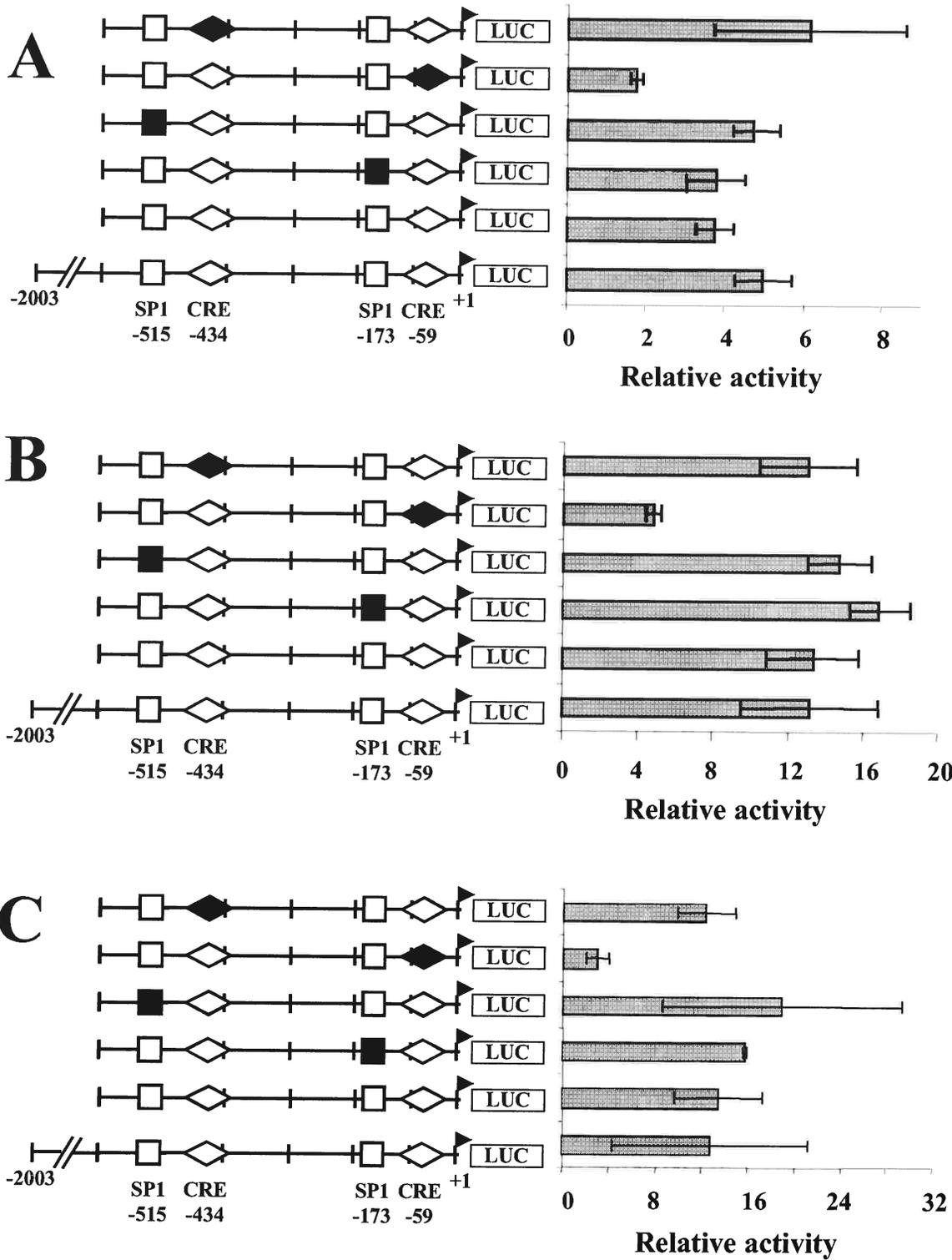
# Figure 3



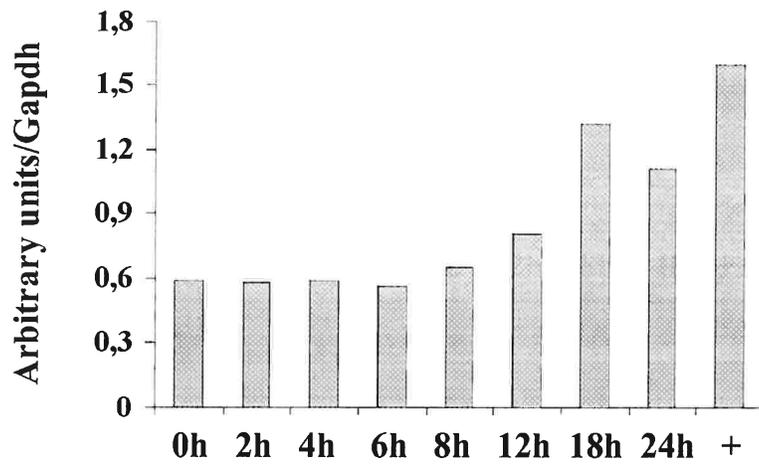
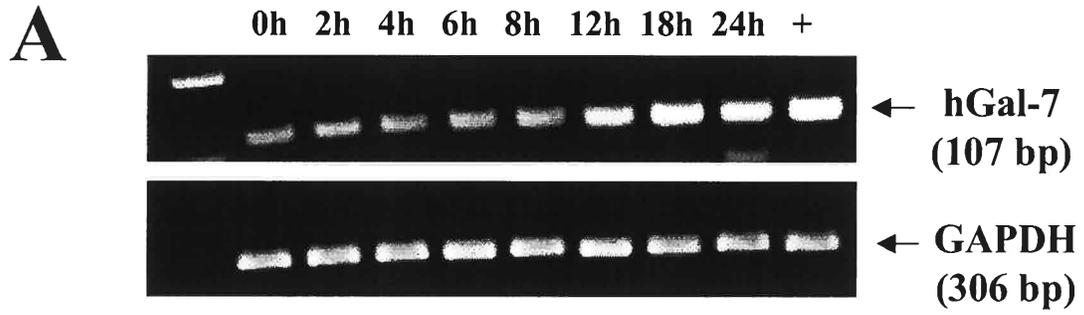
**Figure 4**



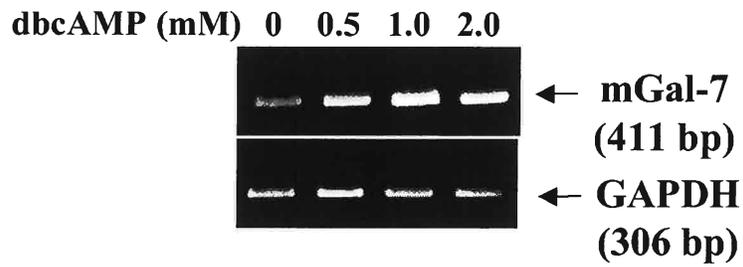
# Figure 5



# Figure 6

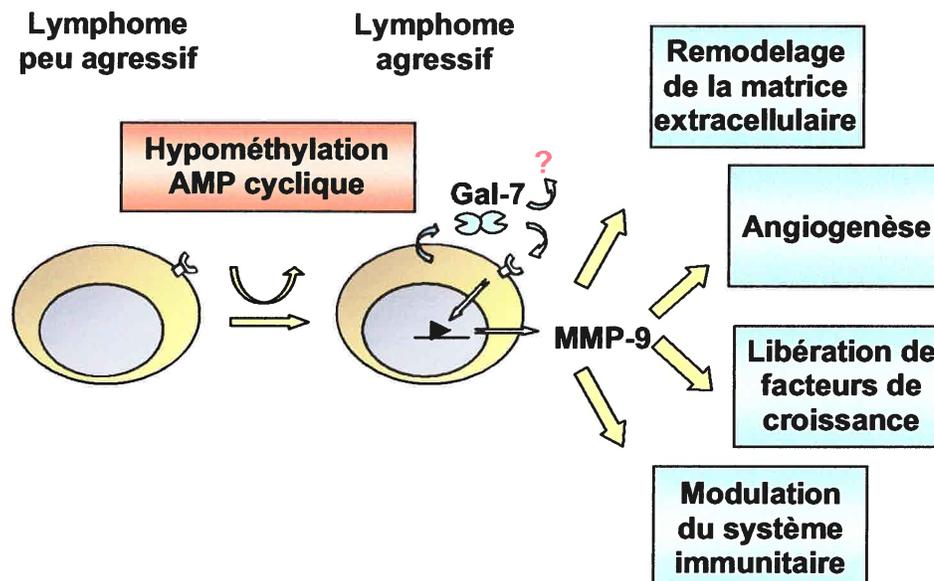


**B**



### CONCLUSION DU CHAPITRE 3

**Figure 12: L'expression de la galectine-7 est induite par l'hypométhylation de l'ADN et l'AMP cyclique.** Une altération des mécanismes de méthylation de l'ADN et des mécanismes impliqués dans l'homéostasie est souvent caractéristique de la progression tumorale. L'hypométhylation de l'ADN et l'activation de la voie de l'AMP cyclique sont impliquées dans l'induction de la galectine-7 lors de la progression du lymphome vers un phénotype agressif et peuvent donc être, en partie, responsable de l'avènement des propriétés métastatiques du lymphome.



## **DISCUSSION GÉNÉRALE**

## **1. Importance de la découverte de la galectine-7 dans la progression tumorale.**

La recherche de gènes conférant aux lymphomes agressifs la capacité de se disséminer a conduit nos travaux vers la galectine-7. Au moment d'entreprendre ces travaux de thèse, la littérature définissait la galectine-7 en tant que marqueur de kératinocytes et d'épithélium stratifiés possiblement impliqué dans l'adhésion cellule-cellule et/ou cellule-matrice [265, 266], puis comme gène associé à la fonction pro-apoptotique de p53 [279]. Depuis, nos travaux ont démontré que 1) la galectine-7 favorise la croissance et la progression du lymphome, possiblement via sa capacité à induire l'expression de MMP-9 ; 2) elle confère au lymphome la capacité d'outrepasser, du moins en partie, la résistance des souris déficientes pour ICAM-1 contre la dissémination des lymphomes ; 3) son inhibition dans les lymphomes agressifs diminue leur potentiel métastatique ; 4) son expression dans le lymphome n'est pas sous le contrôle de p53 et ; 5) la méthylation de l'ADN et la voie de l'AMP cyclique jouent un rôle important dans le contrôle de son expression.

### *Identification de la galectine-7 dans les lymphomes agressifs.*

Afin d'identifier les gènes qui confèrent au lymphome la capacité de se disséminer, nous avons utilisé un modèle murin expérimental de lymphome radio-induit. Notre laboratoire a généré des cellules lymphomateuses agressives par sélection *in vivo* dans des souris C57BL/6 normales [66]. L'agressivité des lignées cellulaires 164T2S11 (S11) et 164T2S19 (S19) a été établie suite à une série de passages *in vivo* par injection intraveineuse, 11 et 19 passages respectivement, de la lignée de lymphome thymique 164T2. Comme les cellules métastatiques, S11 et S19, les cellules non-métastatiques 164T2 ont des propriétés de migration organes spécifiques identiques [66], ce qui implique que le comportement agressif de nos variants émerge d'un nouveau transcriptome constitué de gènes dont la fonction s'exprime aux étapes tardives du processus métastatique, plus précisément aux étapes '*post-homing*', ou post-extravasation.

L'analyse comparative, par matrices différentielles d'ADNc, des cellules non agressives et des variants hautement métastatiques nous a permis d'identifier plusieurs gènes étant différentiellement exprimés (Annexe A). Parmi ces gènes, nous avons

observé une forte augmentation de l'expression du gène de la galectine-7. Cette dernière était reconnue, en condition normale, pour être spécifiquement exprimée dans les épithéliums stratifiés [265, 266, 273] et induite suite à l'exposition aux rayons UV [280] ce qui l'implique dans la protection contre les coups de soleil. Au niveau du cancer, l'expression de la galectine-7 avait été retrouvée dans les carcinomes squameux [291], mais peu exprimée dans les kératinocytes transformés [265] alors qu'elle s'avérait augmentée lors de carcinogénèse mammaire induite chimiquement [293]. Nos recherches démontraient donc, pour la première fois, que la surexpression de la galectine-7 semblait être corrélée avec l'agressivité du lymphome, suggérant une relation causale possible. Depuis, nos travaux ont mis en évidence l'importance de la galectine-7 dans le développement du lymphome murin et son expression dans les LNH. Depuis, d'autres études ont rapporté que la galectine-7 est anormalement surexprimée dans divers cancers humains, notamment les carcinomes squameux thyroïdiens et buccaux [292, 295]. De plus, il a été démontré que l'expression de la galectine-7 corrélait avec un fort taux de récurrence de carcinomes de l'hypopharynx humain ce qui corrobore le potentiel pro-tumoral de la galectine-7 [296].

*Mécanisme d'action de la galectine-7 : un modèle pour les galectines.*

Dans le chapitre I, nous avons voulu déterminer si l'expression de la galectine-7 dans le lymphome conférait un certain avantage à celui-ci ou si son expression était induite de façon aléatoire. La transfection du gène codant de la galectine-7 dans les cellules non-agressives nous a permis de déterminer que : 1) la croissance primaire du lymphome est accélérée par l'injection de cellules exprimant la galectine-7 ; 2) ces mêmes cellules favorisent une dissémination et une invasion plus rapide du lymphome et ; 3) la surexpression de la galectine-7 est suffisante pour attribuer aux cellules lymphomateuses la capacité d'outrepasser, du moins en partie, la résistance des souris déficientes pour ICAM-1. La galectine-7 confère donc à elle seule un net avantage au lymphome, le rendant plus habile dans sa quête d'établissement de tumeurs secondaires dans un nouvel organe/tissu. Cet avantage pourrait être expliqué, du moins en partie, par nos résultats démontrant que la galectine-7 induit l'expression de MMP-9, un gène associé à l'agressivité du lymphome, et dont la transfection augmente la croissance de

notre modèle de lymphome [12, 367]. Cette relation fonctionnelle entre la galectine-7 et MMP-9 ouvre de nouveaux horizons sur les mécanismes impliquant les galectines dans la progression tumorale. Plusieurs membres de la famille des MMP peuvent moduler divers processus impliqués dans la dissémination du lymphome (Annexe B). Ainsi leur induction possible par les galectines pourrait s'avérer crucial dans l'élucidation des mécanismes régissant le processus métastatique. Par exemple, leur induction pourrait notamment être responsable de l'augmentation de la mobilité et l'invasion *in vitro* des cellules de cancer du sein surexprimant la galectine-3 [245]. L'induction d'un membre des MMP par la galectine-1 pourrait aussi expliquer le fait que la croissance tumorale et l'angiogenèse sont significativement inhibées dans les souris déficientes pour la galectine-1 [186]. En fait, MMP-9 est, entre autres, reconnue pour moduler l'angiogenèse en libérant VEGF [349] et son ablation génétique dans des souris résulte en une réduction du nombre et de la taille des vaisseaux sanguins [365]. Si on considérait que la galectine-1 pouvait induire MMP-9, son absence provoquerait une diminution de l'expression de MMP-9, et donc une inhibition de VEGF et de l'angiogenèse. Il en est de même pour la galectine-3 qui, lorsque surexprimée de façon cytoplasmique dans le cancer de la prostate, provoque une forte vascularisation [146]. On peut croire que la surexpression de la galectine-3 stimulerait l'expression de MMP-9 qui à son tour libérerait le VEGF, ce qui favoriserait l'angiogenèse. De plus, l'induction des MMP par les galectines pourrait favoriser la progression tumorale par le clivage de médiateurs solubles [424], de molécules d'adhésion [358], et par leur implication dans l'évasion du système immunitaire [425]. Le dévoilement de l'induction de MMP-9 par la galectine-7 laisse donc présager un nouveau mécanisme par lequel les galectines peuvent favoriser la progression tumorale. Il est possible néanmoins que la galectine-7 puisse induire l'expression d'autres gènes pro-métastatiques dont l'identité reste à définir. Des travaux futurs, utilisant des analyses comparatives de transcriptomes, par exemple, pourront certainement aider à éclaircir cette question.

#### *Une nouvelle cible potentielle pour le traitement du cancer.*

L'inhibition de l'expression des galectine-1 ou -3 dans le cancer du côlon, le cancer du sein, ainsi que les gliomes et glioblastomes s'est avérée bénéfique pour inhiber

la progression tumorale [184, 229, 232, 257, 258]. La découverte de l'expression constitutive de la galectine-7 dans des lymphomes agressifs de la souris ainsi que son rôle dans la progression du lymphome nous a donc poussé à déterminer si la galectine-7 avait un potentiel en tant que cible thérapeutique. Dans le deuxième chapitre, nous avons démontré que : 1) la galectine-7 est exprimée dans plusieurs types de cancers hématologiques d'origine humaine et que ; 2) son inhibition diminuait le phénotype agressif de nos lymphomes. Pour la première fois, la galectine-7 était identifiée comme une cible thérapeutique potentielle contre le lymphome.

De plus, comme la galectine-7 avait préalablement été associée au cancer du sein [293], nous avons voulu déterminer si elle pouvait être impliquée dans la progression de ce dernier et ainsi servir de cible thérapeutique dans le traitement de différents types de cancers. Nous avons donc généré des transfectants stables de cellules de carcinome mammaire 4T1 surexprimant la galectine-7 et nous les avons injectés dans la glande mammaire de souris syngéniques afin d'évaluer si la galectine-7 avait un effet sur le développement du cancer du sein (Annexe C). Les résultats ont démontré que la galectine-7 augmentait significativement, comme dans le cas du lymphome, le pouvoir tumorigénique des cellules en diminuant la survie des souris (Annexe D). Les cellules 4T1 sont des cellules de carcinomes mammaires murins qui provoquent la formation de métastases au foie, aux poumons, au cerveau et dans la moelle osseuse. Ce modèle est utilisé fréquemment pour les études fondamentales du cancer du sein [426]. Les analyses macroscopiques et histologiques des organes de souris injectées avec des cellules 4T1 ont révélé que les souris injectées avec les cellules surexprimant la galectine-7 avaient plus de nodules tumoraux aux poumons que celles injectées avec les cellules témoins, et ce malgré qu'elles aient été sacrifiées plus tôt (Annexe E). Nos résultats suggèrent donc que la galectine-7 augmente le pouvoir tumorigénique des cellules 4T1 en favorisant la formation de métastases aux poumons.

Afin de déterminer si la galectine-7 était exprimée dans les cancers du sein humain, nous avons évalué l'expression, par immunohistochimie, de la galectine-7 dans un vaste échantillon de tissus mammaires provenant de biopsies de patientes atteintes de carcinomes mammaires. Les résultats ont démontré que plus de la moitié des 50 échantillons exprimaient la galectine-7 (Annexe F). Une expression de la galectine-7 était

retrouvée dans les cellules malignes et surtout au niveau des cellules myoépithéliales. Ces dernières se retrouvent juxtaposées entre les cellules en prolifération et en différenciation normale dans le sein et séparent les cellules en prolifération et en différenciation anormale lors de stade précancéreux, ce qui suggère qu'elles pourraient réguler la transition vers un phénotype invasif [427]. De plus, comme elles entourent les canaux glandulaires et lésions néoplasiques, elles forment une barrière entre les cellules épithéliales et les cellules endothéliales en prolifération. Elles pourraient de cette façon empêcher l'invasion et la progression tumorale et agir comme suppresseur de tumeurs puisqu'une des caractéristiques des carcinomes invasifs est la perte de la couche de cellules myoépithéliales [428]. L'identification de la galectine-7 en tant que marqueur de cellules myoépithéliales, nous porte à croire que son expression dans les cellules luminales et myoépithéliales favorise la progression et la dissémination du cancer.

Dans l'ensemble, l'identification de hauts niveaux d'expression de la galectine-7 dans le lymphome et le cancer du sein ont mis en évidence un fort potentiel de la galectine-7 comme cible pour les traitements anticancéreux.

#### *Induction de la galectine-7 lors de la progression vers un phénotype agressif.*

Dans le chapitre trois, nous avons démontré que la galectine-7 est induite lors de la progression du lymphome et ce dès le premier passage *in vivo* de nos cellules. De plus, le niveau d'expression dans les lymphomes semble proportionnel au nombre de passages effectué, ce qui suggère que l'environnement péri-tumoral exerce une pression sélective constante qui favorise l'expression de la galectine-7. De façon à définir les mécanismes régissant l'expression de la galectine-7, nous avons déterminé : 1) que la galectine-7 n'était pas sous le contrôle de p53 dans le lymphome ; 2) que l'hypométhylation jouait un rôle clé dans son induction ; 3) que l'AMP cyclique pouvait induire la galectine-7, et ; 4) que la région en 5' du codon d'initiation semble contenir les éléments essentiels permettant la transcription de la galectine-7. La méthylation de l'ADN est un mécanisme reconnu pour moduler l'expression des gènes au niveau transcriptionnel. Des études de notre groupe et d'autres équipes ont démontré que l'expression des MMP, notamment MMP-9 et MMP-3, pouvait être régulée par la méthylation de l'ADN (Annexe G) [429-431]. Nos résultats comparatifs des dinucléotides CpG entre les cellules non-agressives

164T2 et les cellules agressives S19 avaient ainsi permis d'identifier plusieurs dinucléotides différenciellement méthylés pouvant être impliqués dans l'expression constitutive de MMP-9 par les cellules agressives. Comme le promoteur de la galectine-7 est aussi affecté par la méthylation dans les cellules agressives, il serait probable qu'une hypométhylation globale, résultant de la pression engendré par le microenvironnement, soit responsable du relâchement de la chromatine ce qui rendrait les promoteurs accessibles pour les facteurs de transcription essentiels à l'expression de ces gènes. Cette pression exercée par le microenvironnement pourrait affecter l'expression ou encore l'activité des DNMT et ainsi déréguler le méthylome et l'expression des gènes [432], puisqu'il a été démontré que les motifs de méthylation de certains promoteurs pouvaient varier en fonction du microenvironnement [433, 434].

Le promoteur de la galectine-7 pourrait aussi être affecté par une hypométhylation spécifique aux niveaux des îlots CpG. Comme nous l'avons montré dans le chapitre trois, le promoteur de la galectine-7 est constitué de plusieurs dinucléotides CpG. Dans ce cas, la galectine-7 pourrait être identifiée comme un nouvel antigène tumoral dont l'induction est reliée à l'hypométhylation tel CAGE [406]. Il est aussi possible que le promoteur de la galectine-7, chez les cellules agressives, soit muté à certains sites CpG méthylés dans les cellules non-agressives qui seraient responsables de l'inaccessibilité de certains facteurs de transcriptions comme CREB ou ATF2.

Le clonage du promoteur de la galectine-7 nous a permis d'identifier la voie de signalisation de l'AMP cyclique comme mécanisme de régulation de la galectine-7. Il est probable que cette voie soit induite par le microenvironnement lors des passages *in vivo*. De plus, il a été démontré que l'activation des lymphocytes résulte en une augmentation des niveaux d'AMP cyclique et la liaison des facteurs CREB/ATF [435]. Il est donc possible que lors de la progression du lymphome, les interactions entraînent une activation constante conduisant à une induction de l'AMP cyclique intracellulaire, d'ATF2 et ainsi de la galectine-7. Bien que l'ensemble de ces résultats représente une avancée significative sur nos connaissances des mécanismes qui régulent l'expression de la galectine-7, qui jusque-là étaient plutôt modestes, il n'en demeure pas moins qu'il reste à définir comment ces mécanismes sont impliqués dans l'expression de la galectine-7 humaine et surtout quels sont les rôles des nombreux autres facteurs de transcriptions

dont on retrouve les séquences consensus dans le promoteur de la galectine-7. Il faudra donc non seulement définir comment ces éléments sont impliqués dans l'expression de la galectine-7 dans les tissus normaux, mais aussi comment la méthylation de l'ADN pourrait intervenir, par exemple durant la progression tumorale, pour modifier le processus transcriptionnel de ce promoteur.

## **2. La galectine-7 : un point de départ.**

Nos travaux ont permis d'identifier la galectine-7 comme étant un gène important dans la progression du cancer que ce soit par son expression qui pourrait être utilisée comme marqueur d'agressivité ou cible thérapeutique, ou encore par ses fonctions qui confèrent au lymphome des propriétés métastatiques. Néanmoins, plusieurs phénomènes restent toujours à élucider.

### *Galectine-7 et MMP-9 : une relation méconnue.*

Nous avons démontré que la galectine-7 favorisait le développement du lymphome, et que la progression était due, du moins en partie, à l'induction de MMP-9 mais les récepteurs impliqués sont totalement inconnus. Comme les galectines lient les  $\beta$ -galactosides, plusieurs glycoprotéines pourraient en être responsables. Des études par purification d'affinité de façon sensible au lactose de la fraction membranaire de nos lymphomes, comme il a été effectué pour la galectine-8 chez le neutrophile [225] pourraient s'avérer bénéfiques pour l'identification du récepteur. Néanmoins, il a été estimé que plus de 50% des protéines totales sont substituées par l'ajout de glycans en plusieurs sites [436]. Il est donc probable que la galectine-7, en plus d'induire l'expression de MMP-9 dans nos lymphomes, puisse entraîner l'induction de cette enzyme dans les cellules stromales ou péri-tumorales de façon à favoriser la progression du lymphome. Afin de déterminer si l'apport favorable de MMP-9 pouvait aussi être dû à une expression stromale, nous avons utilisé des souris déficientes pour le gène MMP-9. La croissance et la dissémination du lymphome ne sont pas affectées par l'absence de MMP-9 (Annexe H). Nous avons donc injecté nos transfectants surexprimant la galectine-7 par voie intraveineuse dans ces souris en comparaison avec les souris C57BL/6 normales (Annexe I). Les résultats ont démontré une augmentation du taux de

survie des souris en l'absence de MMP-9 ce qui suggère que l'induction de la MMP-9 stromale par la galectine-7 est aussi impliquée dans la progression du lymphome. Quelles sont les cellules influencées par la galectine-7 et quel est le mécanisme par lequel la MMP-9 stromale et tumorale favorise le développement du lymphome ? Ces questions restent à élucider et sont présentement en étude.

En plus de l'effet de la galectine-7 sur l'expression de MMP-9 et probablement d'autres MMP, il est probable que la galectine-7 puisse, comme d'autres galectines, être clivée par MMP-9 ou moduler son activité. La galectine-3 possède un site de clivage pour MMP-9 et MMP-2, l'Ala62-Tyr63, qui lorsque clivé produit deux fragments, l'un contenant le CRD intacte et l'autre, le domaine amino-terminal [169, 250]. Ce clivage de la galectine-3 altère le CRD de façon à augmenter la liaison aux glycoconjugués, mais diminue sa capacité d'homodimérisation [169]. Elle peut aussi être clivée suite à la libération du domaine extracellulaire de MT1-MMP [437]. Malgré le fait que la galectine-7 ne contient pas, contrairement à la galectine-3, de domaine amino-terminal, il se pourrait que les MMP, en particulier MMP-9, puissent quand même hydrolyser la galectine-7 et affecter, par exemple, la formation de dimères et son activité biologique. Dans cet ordre d'idée, il a récemment été rapporté que la galectine-1 était un nouveau substrat de MMP-2, bien que les détails de l'interaction et les effets biologiques du clivage n'aient pas encore été bien définis [438].

D'autre part, comme MMP-9 est une enzyme hautement glycosylée [439, 440], il est possible que la galectine-7, comme la galectine-8, puisse s'y lier. En fait, il a été démontré que la galectine-8 pouvait non seulement interagir avec pro-MMP-9 mais aussi avec MMP-3, une enzyme reconnue pour activer MMP-9 [225, 441]. De plus, les auteurs ont démontré que la présence de galectine-8 accélérât la cinétique de clivage de MMP-9 par MMP-3 et ce, de façon dépendante de la concentration. Ces études nous portent à croire que, dans notre modèle, la galectine-7 pourrait, en plus d'induire l'expression de MMP-9, interagir avec cette dernière ou d'autres MMP afin de moduler son activité. Il est également possible que la galectine-7 et MMP-9 forment une boucle d'action, chacun des gènes stimulant l'expression de l'autre. En effet, il a été démontré que la galectine-9 était induite par le PMA dans les cellules Jurkat et que cette induction était inhibée par l'ajout d'un inhibiteur de MMP, suggérant que les MMPs, du moins certaines, sont impliquées

dans l'induction de la galectine-9 [126]. De façon similaire, il serait donc possible que la galectine-7 induise l'expression de MMP-9 et que cette dernière stimule à son tour l'expression de la galectine-7 créant une amplification de signal et favorisant leur activité biologique.

*La fonction pro-apoptotique de la galectine-7 dans le lymphome : mythe ou réalité.*

Comme la galectine-7 a été identifiée comme gène sensibilisant les cellules à l'apoptose induite chimiquement [271, 280], nous avons émis l'hypothèse que nos variants agressifs, exprimant de hauts niveaux de galectine-7, devaient avoir subi, lors de leur progression vers un phénotype agressif, une certaine pression sélective de façon à résister à la fonction pro-apoptotique de la galectine-7. Nous avons démontré, dans le chapitre 3, que l'expression de la galectine-7 n'était pas associée à celle de p53 dans nos cellules lymphomateuses contrairement aux cellules de cancers du côlon [271, 279]. Ce phénomène peut évidemment s'expliquer par un effet spécifique au niveau du type cellulaire. Il a été démontré, par exemple, que la galectine-3 a des fonctions distinctes dépendamment du type de cellules dans lesquelles elle est exprimée. En effet, sa surexpression dans les cellules T et les lymphomes de Burkitt augmente la résistance des cellules à l'apoptose induite alors que sa surexpression dans des cellules de cancer du sein rendent les cellules plus sensibles [142-144]. D'autre part, s'il s'avérait que la galectine-7 soit associée à une fonction apoptotique dans nos cellules lymphomateuses, il est possible que nos variants agressifs expriment d'autres gènes leur permettant de résister à cette fonction de la galectine-7. L'analyse comparative du transcriptome des cellules non-agressives et agressives (Annexe A) nous a permis d'observer la surexpression de gènes associés à une fonction anti-apoptotique, mIAP3 l'homologue murin de XIAP [442], reconnu pour inhiber l'activité des caspases-3 -7 et -9 [443, 444] et l'apoptose induite par TRAIL [445], et deux glutathione-S-transférases, faisant partie d'une famille de protéines reconnue pour inhiber le signal apoptotique engendré par ASK1 [446]. Il est donc envisageable que lors de leur progression vers un phénotype métastatique, les cellules lymphomateuses acquièrent un nouveau répertoire de gènes finement régulés afin de compenser pour les effets négatifs provoqués par l'expression d'autres gènes.

### *Influence du microenvironnement sur la galectine-7.*

Nous avons démontré que la galectine-7 favorisait la croissance thymique et la dissémination du lymphome. Par contre, lorsque nous avons injecté nos transfectants surexprimant la galectine-7 de façon sous-cutanée, nous avons été surpris de constater que la fréquence des tumeurs était diminuée, seulement 37.8% des souris injectées avec les transfectants surexprimant la galectine-7 ont développé des tumeurs comparativement à 86.7% des souris témoins (Annexe J). L'ensemble de ces résultats suggèrent que le potentiel de la galectine-7 à déterminer l'issue de la progression tumorale dépend des capacités de la cellule tumorale à interagir avec son environnement. En fait, nos résultats sont les premiers à établir que le microenvironnement péri-tumoral coopère avec une galectine dans la manifestation de ces fonctions. La présence de molécules d'adhésions, ou de facteurs de croissance ou cytokines sous la peau sont tous des facteurs qui sont susceptibles d'influencer le rôle de la galectine-7. La réaction de la cellule tumorale en un environnement spécifique peut bien entendu expliquer ce phénotype. Il a été démontré, par exemple, que des cellules de cancers du pancréas sécrétaient plus de VEGF et de bFGF lorsque injectées dans la cavité péritonéale en comparaison avec des injections sous-cutanées [447]. Il est aussi plausible que la défense immunitaire présente dans le tissu sous-cutané soit responsable de la réjection tumorale. Quoi qu'il en soit, la littérature concède à la galectine-7, comme aux autres galectines, des caractéristiques fonctionnelles distinctes en relation avec le type cellulaire, et nos résultats suggèrent maintenant une nouvelle variation en fonction du microenvironnement et de ses facteurs.

### **3. Futur potentiel de la galectine-7.**

L'ensemble de nos recherches a démontré pour la première fois l'importance de l'expression de la galectine-7 dans le développement du lymphome. L'identification d'un gène conférant au lymphome des propriétés métastatiques ne peut que parfaire nos connaissances pour ce qui est des mécanismes qui régissent l'établissement de cancers agressifs. Ces découvertes ouvrent la porte à une panoplie de recherches afin d'élucider les mécanismes sous-jacents à la galectine-7 et son potentiel dans le développement de traitements anti-cancéreux.

### *Élucidation des interactions menant à l'induction de la galectine-7 in vivo.*

La bioluminescence a récemment apporté aux biologistes de nouvelles opportunités afin d'effectuer des études non-invasives dans les cellules et animaux vivants [449]. Le gène rapporteur le plus utilisé pour la bioluminescence est la luciférase qui catalyse la transformation de son substrat, la D-luciférine en oxyluciférine dans un processus dépendant de l'ATP et qui résulte en l'émission de photons pouvant être détectés [450]. Comme le promoteur de la galectine-7 murine a déjà été cloné en amont du gène de la luciférase, il serait intéressant de transfecter des cellules de lymphome non-agressif avec le gène rapporteur et d'injecter ces cellules dans des souris syngéniques de manière à déterminer l'activité transcriptionnelle de la galectine-7 *in vivo*. De telles études ont déjà été effectuées avec des éléments de réponse à p53 dans un modèle de carcinome du côlon [451]. Le traitement des souris par des injections intraveineuses de D-luciférine nous permettrait, à l'aide d'un système de caméra développé par IVIS pour l'imagerie rapide d'animal anesthésié, de déterminer les endroits où le promoteur de la galectine-7 est activé *in vivo* [452]. Ces expériences nous permettraient d'évaluer les environnements et les interactions menant à l'induction de la galectine-7 et ainsi que les mécanismes impliqués.

### *Souris déficientes pour la galectine-7 : un modèle d'étude.*

Des souris déficientes pour la galectine-7 ont été générées par le groupe de Françoise Poirier à l'Institut Jacques Monod à Paris. Les souris sont viables et démontrent un phénotype normal (communications personnelles). Dans notre modèle, l'utilisation de ces souris s'avérerait un outil de choix afin d'établir de façon inconditionnelle la relevance de la galectine-7 dans le développement du lymphome. Ces souris pourraient d'abord nous permettre d'établir si la galectine-7 est essentielle dans la lymphomagenèse en comparant l'incidence du développement de lymphomes radio-induits dans les souris normales et déficientes en galectine-7. S'il s'avérait que la lymphomagenèse puisse être induite dans ces souris, nous pourrions tirer avantage de cette étude et établir de nouvelles lignées de lymphome dépourvues totalement de galectine-7. Ces lymphomes pourraient ensuite être utilisés dans l'élucidation des

mécanismes régissant la fonction pro-tumorale de la galectine-7. En fait, nous pourrions évaluer *in vivo* la croissance et la dissémination de ces lymphomes en comparaison avec les lymphomes témoins et surexprimant la galectine-7 dans les souris normales. Les données établies pourraient démontrer si la galectine-7 est essentielle pour la progression du lymphome. Si oui, la comparaison des différentes étapes du processus métastatique tels les interactions avec les cellules endothéliales, l'extravasation, le *homing*, l'angiogenèse et la distribution et l'infiltration tissulaire entre les trois types cellulaires pourraient dévoiler les mécanismes affectés par la galectine-7.

Afin de pousser un peu plus loin les recherches, nous pourrions profiter de la disponibilité des souris déficientes pour la galectine-7 et déterminer si la galectine-7 stromale a une certaine influence sur la progression du lymphome. Malgré le fait qu'à ce jour l'expression de la galectine-7 en condition normale semble être restreinte aux épithéliums stratifiés [265, 266], il est possible qu'elle puisse être induite dans certains tissus suite à certains contacts cellulaires ou lors de réactions inflammatoires, comme c'est le cas lors de cicatrisation [281]. Ainsi, l'injection des cellules de lymphomes dans les souris déficientes en galectine-7 pourrait révéler le rôle de la galectine-7 stromale.

#### *Avènement pour le domaine thérapeutique.*

L'identification de la galectine-7 comme cible thérapeutique potentielle contre le cancer suggère l'importance de développer des armes pharmacologiques contre celle-ci. En fait, des composés à base de phenyl thio-beta-D-galactopyranosides [453] et des dérivés de thioureido N-acetyllactosamines [454] ont été développés et identifiés comme des inhibiteurs efficaces de la galectine-7. De plus, les meilleurs inhibiteurs contre la galectine-7 démontrent une affinité faible pour les autres galectines [454]. L'utilisation de ces composés, dans notre modèle, pourrait donc s'avérer utile pour disséquer les diverses fonctions de la galectine-7 mais aussi crucial s'ils pouvaient inhiber la progression du cancer en bloquant l'activité de la galectine-7 sans affecter la fonction biologique des autres galectines.

L'injection d'inhibiteurs par voie intrapéritonéale, comme il a été le cas pour l'injection de glycoamines synthétiques pour le traitement de cancer du sein [262] ou de zebularine contre la croissance de lymphome chez la souris [455], pourrait contribuer à

développer un traitement efficace contre le lymphome agressif, mais aussi, possiblement contre le cancer du sein. Bien sûr, les injections se feraient à différentes doses, et à différents temps après l'injection des cellules cancéreuses et l'évaluation de la toxicité des composés devrait être attentivement surveillée. Plusieurs autres composés inhibiteurs pourraient être évalués envers la galectine-7. Récemment, une revue sur les composés anti-galectine discutait des effets et des modes d'actions de ces agents envers les galectines-1 et -3, qui sont les plus étudiés dans le domaine du cancer [456]. Il est probable que certains de ces composés puissent aussi affecter les fonctions biologiques de la galectine-7.

## **CONCLUSION GÉNÉRALE**

Mes travaux ont permis de déterminer que l'expression de la galectine-7 jouait un rôle important dans la progression du lymphome vers un phénotype métastatique. L'expression de cette dernière favorise la croissance et la dissémination du lymphome et ce, en induisant MMP-9 et possiblement d'autres gènes. Cette découverte conférait pour la première fois une fonction pro-tumorale à la galectine-7. Nous nous sommes donc questionnés sur son potentiel comme cible thérapeutique. L'utilisation d'une stratégie antisense nous a permis de démontrer que son inhibition chez les cellules agressives réduisait la capacité de dissémination et d'invasion de ces cellules. Ces résultats confirmaient l'implication de la galectine-7 dans la progression. De plus, son expression dans les néoplasmes lymphoïdes humains a révélé son potentiel en tant que cible dans les traitements anti-lymphomateux.

Depuis, nous avons démontré que la galectine-7 était aussi induite dans le cancer du sein et favorise la dissémination au poumon. Ainsi, nous avons découvert que la galectine-7 était non seulement un gène induit lors de la progression du lymphome mais possiblement impliqué lors de la progression de carcinomes mammaires. De plus, nous avons déterminé que son expression était induite par déméthylation du promoteur et que l'activation de la voie de l'AMP cyclique était aussi impliquée dans sa régulation.

Dans l'ensemble, mes travaux ont permis d'identifier la galectine-7 comme un gène important dans le processus tumorigénique du lymphome et du cancer du sein lui laissant présager un potentiel en tant que cible thérapeutique anti-cancéreuse.

## **ANNEXES**

## ANNEXE A

*Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.*

Upregulation of galectin-7 in murine lymphoma cells is associated with progression toward an aggressive phenotype.

S. Moisan, M. Demers, J. Mercier, T. Magnaldo, E.F. Potworowski and Y. St-Pierre.

*Leukemia* (2003) **17**, 751–759. doi:10.1038/sj.leu.2402870

## ANNEXE B

*Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.*

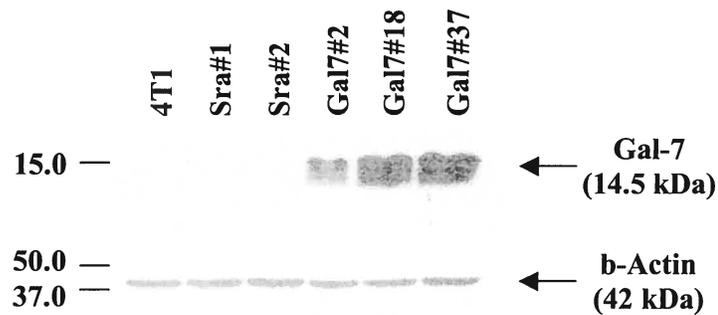
Crit Rev Immunol. 2005;25(6):493-523. New roles for matrix metalloproteinases in metastasis.  
Demers M, Couillard J, Bélanger S, St-Pierre Y. DOI: 10.1615/CritRevImmunol.v25.i6.30

New roles for matrix metalloproteinases in metastasis.

M. Demers, J. Couillard, S. Bélanger and Y. St-Pierre

## ANNEXE C

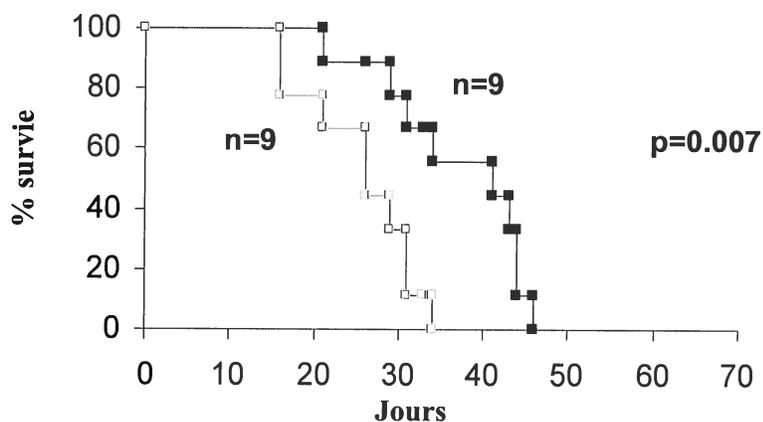
### Expression de la galectine-7 par les transfectants 4T1



**Légende:** Les carcinomes mammaires 4T1 ont été transfectées avec le vecteur d'expression Sra $\alpha$  puro contenant le gène codant pour la galectine-7 par l'utilisation de Lipofectamine 2000 selon le manuel d'utilisation du manufacturier. Des transfectants stables surexprimant la galectine-7 ont été obtenu et les niveaux d'expression évalué par immunobuvardage de type Western de 50 $\mu$ g d'extrait de protéines totales en comparaison avec les cellules témoins transfectées avec le vecteur Sra $\alpha$  puro sans insert d'ADNc.

## ANNEXE D

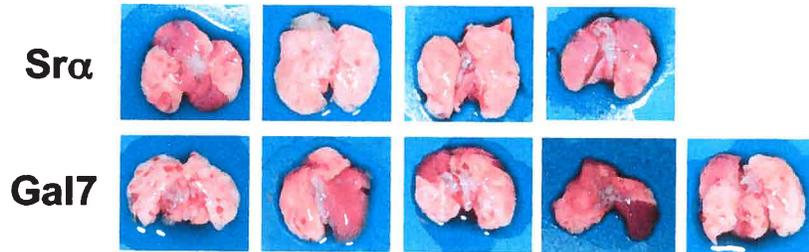
### La galectine-7 diminue la survie des souris.



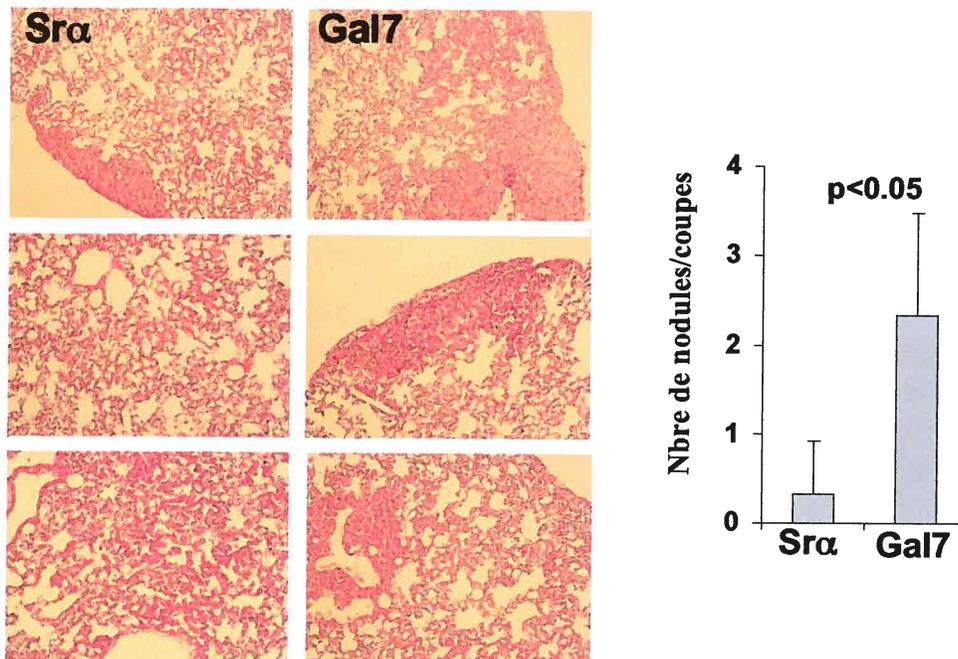
**Légende:** Analyse du taux de survie suite à l'injection dans la glande mammaire de souris BALB/c de  $1 \times 10^5$  transfectants surexprimant la galectine-7 (□) en comparaison avec des souris injectées avec les transfectants témoins (■). Les souris étaient sacrifiées lorsque moribondes ou lorsque la taille de la tumeur atteignait  $2500 \text{ mm}^3$  en fonction de la formule suivante:  $\text{longueur}^2 \times \text{largeur} \times 0.4$ . Certaines souris ont été perfusées et les organes récoltés et conservés dans la paraformaldéhyde 4% pour analyses histologiques alors que pour d'autres les organes ont été récoltés frais et immédiatement congelés dans un mélange glace sèche-éthanol pour analyses moléculaires. Les résultats démontrent que la galectine-7 affecte le taux de survie des souris ( $p=0.007$ ). Les analyses statistiques ont été effectuées selon le *Log Rank Test*.

## ANNEXE E

### A La galectine-7 favorise la dissémination au poumon



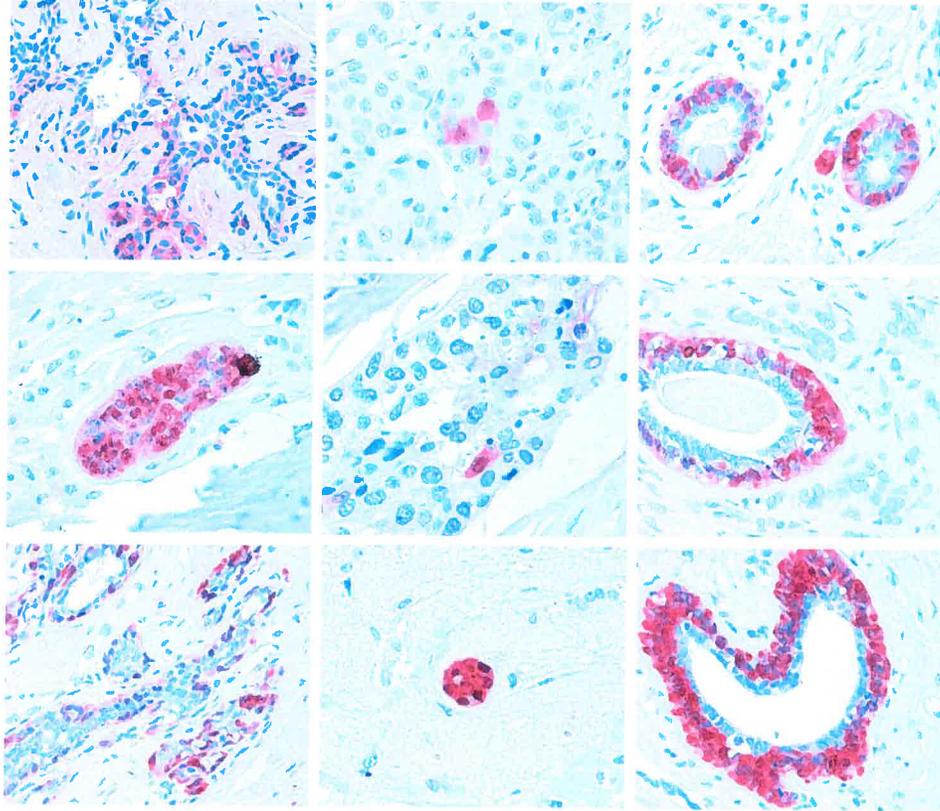
### B



**Légende:** Analyse macroscopique (A) et histologique 400X (B), par hématoxyline-éosine, des poumons récoltés suite aux sacrifices des souris BALB/c ayant subi une injections dans la glande mammaire de  $1 \times 10^5$  transfectants surexprimant la galectine-7 (Gal-7) en comparaison avec les poumons de souris injectées avec les transfectants témoins (Sra). Les analyses démontrent que la galectine-7 favorise la métastase aux poumons ( $p < 0.05$ ). Les analyses statistiques ont été effectuées selon le test T de Student.

## ANNEXE F

### Les carcinomes mammaires humains expriment la galectine-7.



**Légende:** Représentation de l'analyse immunohistochimique de l'expression de la galectine-7 produite par *LifeSpan Bioscience* sur 50 échantillons de cancers du sein humains. On observe une forte expression de la galectine-7 dans les cellules malignes et les cellules myoépithéliales.

## ANNEXE G

*Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.*

Biochem Biophys Res Commun. 2006 Apr 21;342(4):1233-9. Epub 2006 Feb 21. The role of DNA hypomethylation in the control of stromelysin gene expression.

Couillard J, Demers M, Lavoie G, St-Pierre Y.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.02.068>

The role of DNA hypomethylation in the control of stromelysin gene expression.

J. Couillard, M. Demers, G. Lavoie and Y. St-Pierre.

## ANNEXE H

*Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.*

Leukemia. 2007 Dec;21(12):2506-11. Epub 2007 Sep 6. Triggering of T-cell leukemia and dissemination of T-cell lymphoma in MMP-9-deficient mice.

Roy JS, Van Themsche C, Demers M, Opendakker G, Arnold B, St-Pierre Y.

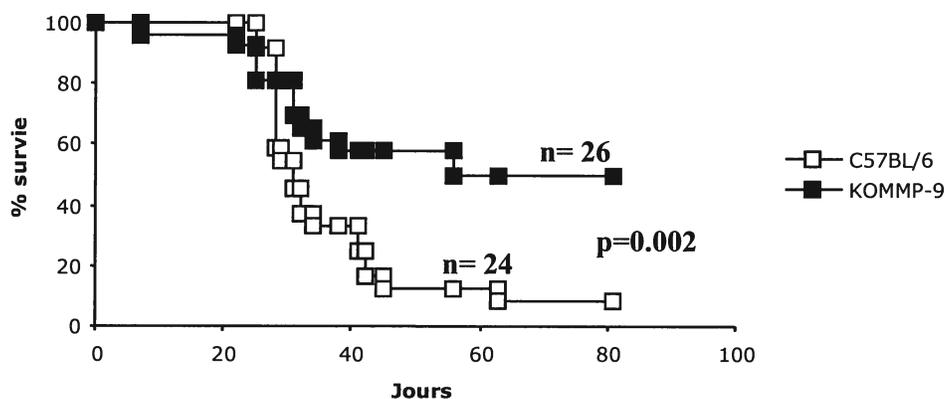
doi:10.1038/sj.leu.2404936

Triggering of T cell leukemia and dissemination of T cell lymphoma in  
MMP-9-deficient mice.

J.S. Roy, C. Van Themsche, M. Demers, G. Opendaker, B. Arnold and Y. St-Pierre.

## ANNEXE I

### L'absence de MMP-9 chez l'hôte diminue le potentiel agressif des cellules surexprimant la galectine-7.

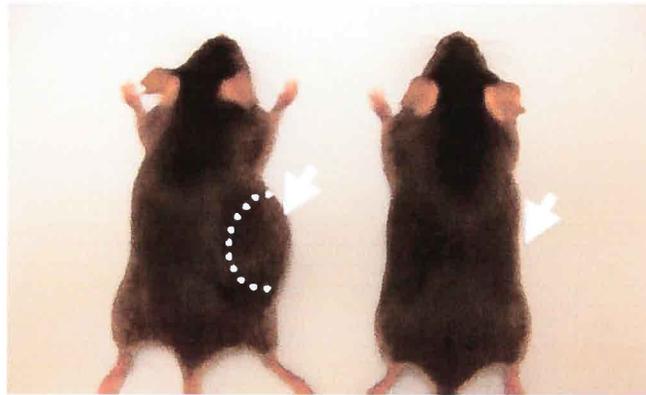


**Légende:**  $10^6$  cellules lymphomateuses surexprimant la galectine-7 ont été injectées par voie intraveineuse dans des souris C57BL/6 et déficientes en MMP-9 (KOMMP-9) Lorsque moribondes, les souris ont été sacrifiées. Le graphique représente le taux de survie des souris en fonction du temps. Les souris déficientes en MMP-9 ont un meilleur taux de survie comparativement aux souris normales ( $p=0.002$ ). Les résultats représentent l'ensemble de deux expériences indépendantes impliquant deux clones surexprimant la galectine-7

## ANNEXE J

La galectine-7 inhibe la croissance sous-cutanée du lymphome.

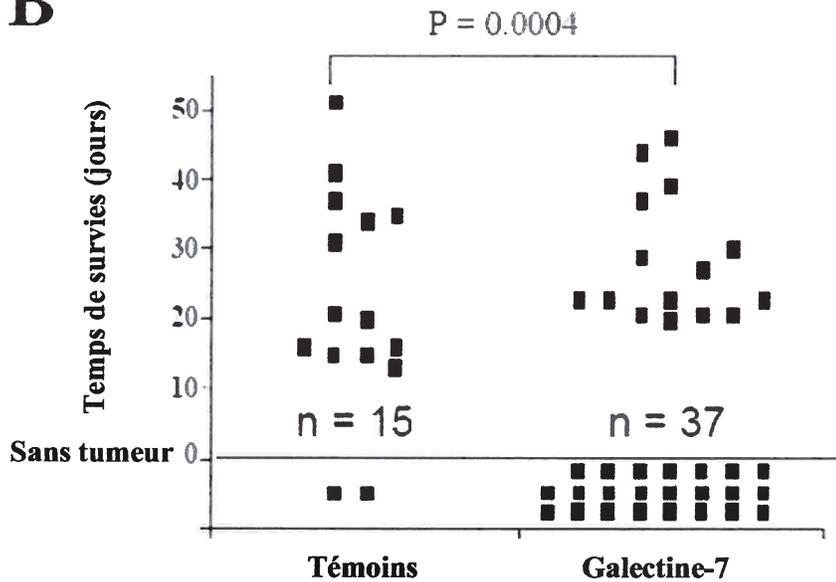
**A**



+ vecteur  
témoin

+ Galectine-7

**B**



**Légende:**  $10^6$  cellules lymphomateuses ont été injectées par voie sous-cutanée dans des souris C57BL/6 adultes et la croissance tumorale a été mesurée à l'aide d'un *caliper*. Quand les tumeurs atteignent  $2500 \text{ mm}^3$ , les souris sont sacrifiées et sujettes à une analyse macroscopique. (A) Souris représentatives du développement d'une tumeur lymphoïde suite à l'injection de cellules témoins (transfectées avec le vecteur vide) ou avec le l'ADNc de la galectine-7. (B) Cinétique de la croissance tumorale. La galectine-7 réduit significativement le développement de tumeurs ( $p= 0.0004$ ). Les résultats représentent l'ensemble de deux expériences indépendantes impliquant six clones surexprimant la galectine-7.

## **RÉFÉRENCES**

1. Chambers, A.F., I.C. MacDonald, E.E. Schmidt, *et al.*, *Steps in tumor metastasis: new concepts from intravital videomicroscopy*. *Cancer Metastasis Rev*, 1995. **14**(4): p. 279-301.
2. Koop, S., E.E. Schmidt, I.C. MacDonald, *et al.*, *Independence of metastatic ability and extravasation: metastatic ras-transformed and control fibroblasts extravasate equally well*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(20): p. 11080-4.
3. Jonas, P., B. Holzmann, D. Jablonski-Westrich, and A. Hamann, *Dissemination capacity of murine lymphoma cells is not dependent on efficient homing*. *Int J Cancer*, 1998. **77**(3): p. 402-7.
4. Chambers, A.F., G.N. Naumov, S.A. Vantyghem, and A.B. Tuck, *Molecular biology of breast cancer metastasis. Clinical implications of experimental studies on metastatic inefficiency*. *Breast Cancer Res*, 2000. **2**(6): p. 400-7.
5. Bos, J.L., *ras oncogenes in human cancer: a review*. *Cancer Res*, 1989. **49**(17): p. 4682-9.
6. Chambers, A.F. and A.B. Tuck, *Ras-responsive genes and tumor metastasis*. *Crit Rev Oncog*, 1993. **4**(2): p. 95-114.
7. McClatchey, A.I., I. Saotome, K. Mercer, *et al.*, *Mice heterozygous for a mutation at the Nf2 tumor suppressor locus develop a range of highly metastatic tumors*. *Genes Dev*, 1998. **12**(8): p. 1121-33.
8. Takeichi, M., *Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis*. *Curr Opin Cell Biol*, 1993. **5**(5): p. 806-11.
9. Christofori, G. and H. Semb, *The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene*. *Trends Biochem Sci*, 1999. **24**(2): p. 73-6.
10. Sato, H. and M. Seiki, *Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in tumor metastasis*. *J Biochem (Tokyo)*, 1996. **119**(2): p. 209-15.
11. Curran, S. and G.I. Murray, *Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis*. *J Pathol*, 1999. **189**(3): p. 300-8.
12. Aoudjit, F., S. Masure, G. Opendakker, E.F. Potworowski, and Y. St-Pierre, *Gelatinase B (MMP-9), but not its inhibitor (TIMP-1), dictates the growth rate of experimental thymic lymphoma*. *Int J Cancer*, 1999. **82**(5): p. 743-7.
13. Juliano, R.L. and J.A. Varner, *Adhesion molecules in cancer: the role of integrins*. *Curr Opin Cell Biol*, 1993. **5**(5): p. 812-8.
14. Natali, P.G., M.R. Nicotra, A. Bartolazzi, R. Cavaliere, and A. Bigotti, *Integrin expression in cutaneous malignant melanoma: association of the alpha 3/beta 1 heterodimer with tumor progression*. *Int J Cancer*, 1993. **54**(1): p. 68-72.
15. St-Pierre, Y., F. Aoudjit, M. Lalancette, and E.F. Potworowski, *Dissemination of T cell lymphoma to target organs: a post-homing event implicating ICAM-1 and matrix metalloproteinases*. *Leuk Lymphoma*, 1999. **34**(1-2): p. 53-61.
16. Fidler, I.J., *Seed and soil revisited: contribution of the organ microenvironment to cancer metastasis*. *Surg Oncol Clin N Am*, 2001. **10**(2): p. 257-69, vii-viii.
17. Nowell, P.C., *The clonal evolution of tumor cell populations*. *Science*, 1976. **194**(4260): p. 23-8.
18. Stoler, D.L., N. Chen, M. Basik, *et al.*, *The onset and extent of genomic instability in sporadic colorectal tumor progression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(26): p. 15121-6.

19. Merlo, L.M., J.W. Pepper, B.J. Reid, and C.C. Maley, *Cancer as an evolutionary and ecological process*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(12): p. 924-35.
20. Greaves, M., *Darwinian medicine: a case for cancer*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(3): p. 213-21.
21. Tsao, J.L., Y. Yatabe, R. Salovaara, *et al.*, *Genetic reconstruction of individual colorectal tumor histories*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(3): p. 1236-41.
22. Baylin, S.B. and J.G. Herman, *DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics*. Trends Genet, 2000. **16**(4): p. 168-74.
23. Feinberg, A.P., R. Ohlsson, and S. Henikoff, *The epigenetic progenitor origin of human cancer*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(1): p. 21-33.
24. Hart, I.R. and I.J. Fidler, *Role of organ selectivity in the determination of metastatic patterns of B16 melanoma*. Cancer Res, 1980. **40**(7): p. 2281-7.
25. Nakajima, M., K. Morikawa, A. Fabra, C.D. Bucana, and I.J. Fidler, *Influence of organ environment on extracellular matrix degradative activity and metastasis of human colon carcinoma cells*. J Natl Cancer Inst, 1990. **82**(24): p. 1890-8.
26. Kuperwasser, C., T. Chavarria, M. Wu, *et al.*, *Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(14): p. 4966-71.
27. Bonadonna, G., *Historical review of Hodgkin's disease*. Br J Haematol, 2000. **110**(3): p. 504-11.
28. Fraga, M. and J. Forteza, *Diagnosis of Hodgkin's disease: an update on histopathological and immunophenotypical features*. Histol Histopathol, 2007. **22**(8): p. 923-35.
29. Kwong, Y.L., *Predicting the outcome in non-Hodgkin lymphoma with molecular markers*. Br J Haematol, 2007. **137**(4): p. 273-87.
30. Staudt, L.M., *Molecular diagnosis of the hematologic cancers*. N Engl J Med, 2003. **348**(18): p. 1777-85.
31. Kwong, Y.L., *Natural killer-cell malignancies: diagnosis and treatment*. Leukemia, 2005. **19**(12): p. 2186-94.
32. Carbone, P.P., H.S. Kaplan, K. Musshoff, D.W. Smithers, and M. Tubiana, *Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification*. Cancer Res, 1971. **31**(11): p. 1860-1.
33. Rogers, B.B., *Overview of non-Hodgkin's lymphoma*. Semin Oncol Nurs, 2006. **22**(2): p. 67-72.
34. Imamura, J., I. Miyoshi, and H.P. Koeffler, *p53 in hematologic malignancies*. Blood, 1994. **84**(8): p. 2412-21.
35. Yin, X.M., Z.N. Oltvai, and S.J. Korsmeyer, *BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax*. Nature, 1994. **369**(6478): p. 321-3.
36. Mushinski, J.F., J. Hanley-Hyde, G.J. Rainey, *et al.*, *Myc-induced cyclin D2 genomic instability in murine B cell neoplasms*. Curr Top Microbiol Immunol, 1999. **246**: p. 183-9; discussion 190-2.
37. Gao, Y., D.O. Ferguson, W. Xie, *et al.*, *Interplay of p53 and DNA-repair protein XRCC4 in tumorigenesis, genomic stability and development*. Nature, 2000. **404**(6780): p. 897-900.

38. Stamatopoulos, K., C. Kosmas, C. Belessi, *et al.*, *Molecular insights into the immunopathogenesis of follicular lymphoma*. *Immunol Today*, 2000. **21**(6): p. 298-305.
39. Michiels, F., G.G. Habets, J.C. Stam, R.A. van der Kammen, and J.G. Collard, *A role for Rac in Tiam1-induced membrane ruffling and invasion*. *Nature*, 1995. **375**(6529): p. 338-40.
40. Stroeken, P.J., E.A. van Rijthoven, M.A. van der Valk, and E. Roos, *Targeted disruption of the beta1 integrin gene in a lymphoma cell line greatly reduces metastatic capacity*. *Cancer Res*, 1998. **58**(7): p. 1569-77.
41. Drillenburg, P. and S.T. Pals, *Cell adhesion receptors in lymphoma dissemination*. *Blood*, 2000. **95**(6): p. 1900-10.
42. Nabeshima, K., J. Suzumiya, M. Nagano, *et al.*, *Emmprin, a cell surface inducer of matrix metalloproteinases (MMPs), is expressed in T-cell lymphomas*. *J Pathol*, 2004. **202**(3): p. 341-51.
43. Belanger, S.D. and Y. St-Pierre, *Role of selectins in the triggering, growth, and dissemination of T-lymphoma cells: implication of L-selectin in the growth of thymic lymphoma*. *Blood*, 2005. **105**(12): p. 4800-6.
44. Kruger, A., J.E. Fata, and R. Khokha, *Altered tumor growth and metastasis of a T-cell lymphoma in Timp-1 transgenic mice*. *Blood*, 1997. **90**(5): p. 1993-2000.
45. Kossakowska, A.E., S.A. Huchcroft, S.J. Urbanski, and D.R. Edwards, *Comparative analysis of the expression patterns of metalloproteinases and their inhibitors in breast neoplasia, sporadic colorectal neoplasia, pulmonary carcinomas and malignant non-Hodgkin's lymphomas in humans*. *Br J Cancer*, 1996. **73**(11): p. 1401-8.
46. Weimar, I.S., D. de Jong, E.J. Muller, *et al.*, *Hepatocyte growth factor/scatter factor promotes adhesion of lymphoma cells to extracellular matrix molecules via alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 integrins*. *Blood*, 1997. **89**(3): p. 990-1000.
47. Kossakowska, A.E., D.R. Edwards, C. Prusinkiewicz, *et al.*, *Interleukin-6 regulation of matrix metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) expression in malignant non-Hodgkin's lymphomas*. *Blood*, 1999. **94**(6): p. 2080-9.
48. Little, C.C., *US Science wars against an unknown enemy : cancer*. *Life* 1937. **2**: p. 11-17.
49. Waterston, R.H., K. Lindblad-Toh, E. Birney, *et al.*, *Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome*. *Nature*, 2002. **420**(6915): p. 520-62.
50. Paquette, Y., L. Doyon, A. Laperriere, *et al.*, *A viral long terminal repeat expressed in CD4+CD8+ precursors is downregulated in mature peripheral CD4-CD8+ or CD4+CD8- T cells*. *Mol Cell Biol*, 1992. **12**(8): p. 3522-30.
51. Girard, L., Z. Hanna, N. Beaulieu, *et al.*, *Frequent provirus insertional mutagenesis of Notch1 in thymomas of MMTVD/myc transgenic mice suggests a collaboration of c-myc and Notch1 for oncogenesis*. *Genes Dev*, 1996. **10**(15): p. 1930-44.
52. Hanna, Z., C. Simard, A. Laperriere, and P. Jolicoeur, *Specific expression of the human CD4 gene in mature CD4+ CD8- and immature CD4+ CD8+ T cells and in macrophages of transgenic mice*. *Mol Cell Biol*, 1994. **14**(2): p. 1084-94.

53. Priceputu, E., I. Bouallaga, Y. Zhang, *et al.*, *Structurally distinct ligand-binding or ligand-independent Notch1 mutants are leukemogenic but affect thymocyte development, apoptosis, and metastasis differently.* J Immunol, 2006. **177**(4): p. 2153-66.
54. Beer, J.Z., E. Budzicka, E. Niepokojczycka, *et al.*, *Loss of tumorigenicity with simultaneous changes in radiosensitivity and photosensitivity during in vitro growth of L5178Y murine lymphoma cells.* Cancer Res, 1983. **43**(10): p. 4736-42.
55. Verschueren, H., J. Dewit, J. De Braekeleer, V. Schirmmacher, and P. De Baetselier, *Motility and invasive potency of murine T-lymphoma cells: effect of microtubule inhibitors.* Cell Biol Int, 1994. **18**(1): p. 11-9.
56. Kruger, A., V. Umansky, M. Rocha, *et al.*, *Pattern and load of spontaneous liver metastasis dependent on host immune status studied with a lacZ transduced lymphoma.* Blood, 1994. **84**(9): p. 3166-74.
57. Arlt, M., C. Kopitz, C. Pennington, *et al.*, *Increase in gelatinase-specificity of matrix metalloproteinase inhibitors correlates with antimetastatic efficacy in a T-cell lymphoma model.* Cancer Res, 2002. **62**(19): p. 5543-50.
58. Kossakowska, A.E., A. Hinek, D.R. Edwards, *et al.*, *Proteolytic activity of human non-Hodgkin's lymphomas.* Am J Pathol, 1998. **152**(2): p. 565-76.
59. Kossakowska, A.E., S.J. Urbanski, and D.R. Edwards, *Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) RNA is expressed at elevated levels in malignant non-Hodgkin's lymphomas.* Blood, 1991. **77**(11): p. 2475-81.
60. Kruger, A., M.J. Arlt, M. Gerg, *et al.*, *Antimetastatic activity of a novel mechanism-based gelatinase inhibitor.* Cancer Res, 2005. **65**(9): p. 3523-6.
61. Banke, I.J., M.J. Arlt, M.M. Mueller, *et al.*, *Effective inhibition of experimental metastasis and prolongation of survival in mice by a potent factor Xa-specific synthetic serine protease inhibitor with weak anticoagulant activity.* Thromb Haemost, 2005. **94**(5): p. 1084-93.
62. Lieberman, M., A. Decleve, P. Ricciardi-Castagnoli, *et al.*, *Establishment, characterization and virus expression of cell lines derived from radiation- and virus-induced lymphomas of C57BL/Ka mice.* Int J Cancer, 1979. **24**(2): p. 168-77.
63. Haran-Ghera, N., M. Lieberman, and H.S. Kaplan, *Direct action of a leukemogenic virus on the thymus.* Cancer Res, 1966. **26**(3): p. 438-42.
64. Haran-Ghera, N., A. Peled, R. Krautghamer, and P. Resnitzky, *Initiation and promotion in radiation-induced myeloid leukemia.* Leukemia, 1992. **6**(7): p. 689-95.
65. Aoudjit, F., E.F. Potworowski, and Y. St-Pierre, *Bi-directional induction of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 during T lymphoma/endothelial cell contact: implication of ICAM-1.* J Immunol, 1998. **160**(6): p. 2967-73.
66. Lalancette, M., F. Aoudjit, E.F. Potworowski, and Y. St-Pierre, *Resistance of ICAM-1-deficient mice to metastasis overcome by increased aggressiveness of lymphoma cells.* Blood, 2000. **95**(1): p. 314-9.
67. Barondes, S.H., V. Castronovo, D.N. Cooper, *et al.*, *Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins.* Cell, 1994. **76**(4): p. 597-8.

68. Lobsanov, Y.D., M.A. Gitt, H. Leffler, S.H. Barondes, and J.M. Rini, *X-ray crystal structure of the human dimeric S-Lac lectin, L-14-II, in complex with lactose at 2.9-Å resolution*. J Biol Chem, 1993. **268**(36): p. 27034-8.
69. Barondes, S.H., D.N. Cooper, M.A. Gitt, and H. Leffler, *Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins*. J Biol Chem, 1994. **269**(33): p. 20807-10.
70. Leffler, H., S. Carlsson, M. Hedlund, Y. Qian, and F. Poirier, *Introduction to galectins*. Glycoconj J, 2004. **19**(7-9): p. 433-40.
71. Hirabayashi, J. and K. Kasai, *The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution*. Glycobiology, 1993. **3**(4): p. 297-304.
72. Lopez-Lucendo, M.F., D. Solis, S. Andre, et al., *Growth-regulatory human galectin-1: crystallographic characterisation of the structural changes induced by single-site mutations and their impact on the thermodynamics of ligand binding*. J Mol Biol, 2004. **343**(4): p. 957-70.
73. Cho, M. and R.D. Cummings, *Galectin-1, a beta-galactoside-binding lectin in Chinese hamster ovary cells. I. Physical and chemical characterization*. J Biol Chem, 1995. **270**(10): p. 5198-206.
74. Leppanen, A., S. Stowell, O. Blixt, and R.D. Cummings, *Dimeric galectin-1 binds with high affinity to alpha2,3-sialylated and non-sialylated terminal N-acetylglucosamine units on surface-bound extended glycans*. J Biol Chem, 2005. **280**(7): p. 5549-62.
75. Dunic, J., S. Dabelic, and M. Flogel, *Galectin-3: An open-ended story*. Biochim Biophys Acta, 2006.
76. Nickel, W., *Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells*. Traffic, 2005. **6**: p. 607-614.
77. Seelenmeyer, C., S. Wegehingel, I. Tews, et al., *Cell surface counter receptors are essential components of the unconventional export machinery of galectin-1*. J Cell Biol, 2005. **171**(2): p. 373-81.
78. Poirier, F., *Roles of galectins in vivo*. Biochem Soc Symp, 2002(69): p. 95-103.
79. Poirier, F., P.M. Timmons, C.T. Chan, J.L. Guenet, and P.W. Rigby, *Expression of the L14 lectin during mouse embryogenesis suggests multiple roles during pre- and post-implantation development*. Development, 1992. **115**(1): p. 143-55.
80. Joo, H.G., P.S. Goedegebuure, N. Sadanaga, et al., *Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding protein in activated T lymphocytes*. J Leukoc Biol, 2001. **69**(4): p. 555-64.
81. Ocklenburg, F., D. Moharreggh-Khiabani, R. Geffers, et al., *UBD, a downstream element of FOXP3, allows the identification of LGALS3, a new marker of human regulatory T cells*. Lab Invest, 2006. **86**(7): p. 724-37.
82. Liu, F.T., D.K. Hsu, R.I. Zuberi, et al., *Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages*. Am J Pathol, 1995. **147**(4): p. 1016-28.
83. Chen, H.Y., B.B. Sharma, L. Yu, et al., *Role of galectin-3 in mast cell functions: galectin-3-deficient mast cells exhibit impaired mediator release and defective JNK expression*. J Immunol, 2006. **177**(8): p. 4991-7.

84. Kim, H., J. Lee, J.W. Hyun, *et al.*, *Expression and immunohistochemical localization of galectin-3 in various mouse tissues*. Cell Biol Int, 2006.
85. Nio, J., Y. Kon, and T. Iwanaga, *Differential cellular expression of galectin family mRNAs in the epithelial cells of the mouse digestive tract*. J Histochem Cytochem, 2005. **53**(11): p. 1323-34.
86. Sarafian, V., R. Jans, and Y. Poumay, *Expression of lysosome-associated membrane protein 1 (Lamp-1) and galectins in human keratinocytes is regulated by differentiation*. Arch Dermatol Res, 2006. **298**(2): p. 73-81.
87. Nio, J. and T. Iwanaga, *Galectins in the mouse ovary: concomitant expression of galectin-3 and progesterone degradation enzyme (20alpha-HSD) in the corpus luteum*. J Histochem Cytochem, 2007. **55**(5): p. 423-32.
88. Stock, M., H. Schafer, S. Stricker, *et al.*, *Expression of galectin-3 in skeletal tissues is controlled by Runx2*. J Biol Chem, 2003. **278**(19): p. 17360-7.
89. Zuniga, E., G.A. Rabinovich, M.M. Iglesias, and A. Gruppi, *Regulated expression of galectin-1 during B-cell activation and implications for T-cell apoptosis*. J Leukoc Biol, 2001. **70**(1): p. 73-9.
90. Blaser, C., M. Kaufmann, C. Muller, *et al.*, *Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells*. Eur J Immunol, 1998. **28**(8): p. 2311-9.
91. Heilmann, S., T. Hummel, F.L. Margolis, M. Kasper, and M. Witt, *Immunohistochemical distribution of galectin-1, galectin-3, and olfactory marker protein in human olfactory epithelium*. Histochem Cell Biol, 2000. **113**(3): p. 241-5.
92. Choi, J.Y., A.J. van Wijnen, F. Aslam, *et al.*, *Developmental association of the beta-galactoside-binding protein galectin-1 with the nuclear matrix of rat calvarial osteoblasts*. J Cell Sci, 1998. **111 ( Pt 20)**: p. 3035-43.
93. Dyer, K.D. and H.F. Rosenberg, *Transcriptional regulation of galectin-10 (eosinophil Charcot-Leyden crystal protein): a GC box (-44 to -50) controls butyric acid induction of gene expression*. Life Sci, 2001. **69**(2): p. 201-12.
94. Kubach, J., P. Lutter, T. Bopp, *et al.*, *Human CD4+CD25+ regulatory T cells: proteome analysis identifies galectin-10 as a novel marker essential for their anergy and suppressive function*. Blood, 2007.
95. Hotta, K., T. Funahashi, Y. Matsukawa, *et al.*, *Galectin-12, an Adipose-expressed Galectin-like Molecule Possessing Apoptosis-inducing Activity*. J Biol Chem, 2001. **276**(36): p. 34089-97.
96. Dunphy, J.L., G.J. Barcham, R.J. Bischof, *et al.*, *Isolation and characterization of a novel eosinophil-specific galectin released into the lungs in response to allergen challenge*. J Biol Chem, 2002. **277**(17): p. 14916-24.
97. Maquoi, E., F.A. van den Brule, V. Castronovo, and J.M. Foidart, *Changes in the distribution pattern of galectin-1 and galectin-3 in human placenta correlates with the differentiation pathways of trophoblasts*. Placenta, 1997. **18**(5-6): p. 433-9.
98. Yang, R.Y., D.K. Hsu, L. Yu, H.Y. Chen, and F.T. Liu, *Galectin-12 is required for adipogenic signaling and adipocyte differentiation*. J Biol Chem, 2004. **279**(28): p. 29761-6.

99. Salvatore, P., C. Contursi, G. Benvenuto, C.B. Bruni, and L. Chiariotti, *Characterization and functional dissection of the galectin-1 gene promoter*. FEBS Lett, 1995. **373**(2): p. 159-63.
100. Lu, Y. and R. Lotan, *Transcriptional regulation by butyrate of mouse galectin-1 gene in embryonal carcinoma cells*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1444**(1): p. 85-91.
101. Lu, Y., D. Lotan, and R. Lotan, *Differential regulation of constitutive and retinoic acid-induced galectin-1 gene transcription in murine embryonal carcinoma and myoblastic cells*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1491**(1-3): p. 13-9.
102. De Gregorio, E., L. Chiariotti, and P.P. Di Nocera, *The overlap of Inr and TATA elements sets the use of alternative transcriptional start sites in the mouse galectin-1 gene promoter*. Gene, 2001. **268**(1-2): p. 215-23.
103. Chiariotti, L., G. Benvenuto, R. Zarrilli, *et al.*, *Activation of the galectin-1 (L-14-I) gene from nonexpressing differentiated cells by fusion with undifferentiated and tumorigenic cells*. Cell Growth Differ, 1994. **5**(7): p. 769-75.
104. Salvatore, P., G. Benvenuto, M. Caporaso, C.B. Bruni, and L. Chiariotti, *High resolution methylation analysis of the galectin-1 gene promoter region in expressing and nonexpressing tissues*. FEBS Lett, 1998. **421**(2): p. 152-8.
105. Salvatore, P., G. Benvenuto, R. Pero, *et al.*, *Galectin-1 gene expression and methylation state in human T leukemia cell lines*. Int J Oncol, 2000. **17**(5): p. 1015-8.
106. Benvenuto, G., M.L. Carpentieri, P. Salvatore, *et al.*, *Cell-specific transcriptional regulation and reactivation of galectin-1 gene expression are controlled by DNA methylation of the promoter region*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(6): p. 2736-43.
107. Gillenwater, A., X.C. Xu, Y. Estrov, *et al.*, *Modulation of galectin-1 content in human head and neck squamous carcinoma cells by sodium butyrate*. Int J Cancer, 1998. **75**(2): p. 217-24.
108. Voss, P.G., Y.G. Tsay, and J.L. Wang, *Galectin-3: differential accumulation of distinct mRNAs in serum-stimulated mouse 3T3 fibroblasts*. Glycoconj J, 1994. **11**(4): p. 353-62.
109. Kadrofske, M.M., K.P. Openo, and J.L. Wang, *The human LGALS3 (galectin-3) gene: determination of the gene structure and functional characterization of the promoter*. Arch Biochem Biophys, 1998. **349**(1): p. 7-20.
110. Rosenberg, I.M., R. Iyer, B. Cherayil, C. Chiodino, and S. Pillai, *Structure of the murine Mac-2 gene. Splice variants encode proteins lacking functional signal peptides*. J Biol Chem, 1993. **268**(17): p. 12393-400.
111. Raimond, J., F. Rouleux, M. Monsigny, and A. Legrand, *The second intron of the human galectin-3 gene has a strong promoter activity down-regulated by p53*. FEBS Lett, 1995. **363**(1-2): p. 165-9.
112. Guittaut, M., S. Charpentier, T. Normand, *et al.*, *Identification of an internal gene to the human Galectin-3 gene with two different overlapping reading frames that do not encode Galectin-3*. J Biol Chem, 2001. **276**(4): p. 2652-7.
113. Fogel, S., M. Guittaut, A. Legrand, M. Monsigny, and E. Hebert, *The tat protein of HIV-1 induces galectin-3 expression*. Glycobiology, 1999. **9**(4): p. 383-7.
114. Hsu, D.K., S.R. Hammes, I. Kuwabara, W.C. Greene, and F.T. Liu, *Human T lymphotropic virus-I infection of human T lymphocytes induces expression of the*

- beta-galactoside-binding lectin, galectin-3*. Am J Pathol, 1996. **148**(5): p. 1661-70.
115. Dumic, J., G. Lauc, and M. Flogel, *Expression of galectin-3 in cells exposed to stress-roles of jun and NF-kappaB*. Cell Physiol Biochem, 2000. **10**(3): p. 149-58.
  116. Kim, K., E.P. Mayer, and M. Nachtigal, *Galectin-3 expression in macrophages is signaled by Ras/MAP kinase pathway and up-regulated by modified lipoproteins*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1641**(1): p. 13-23.
  117. Li, F., I. Kato, H. Kawaguchi, *et al.*, *The galectin-3 gene promoter binding proteins in the liver of rats 48-h post-treatment with CCl4*. Gene, 2006. **367**: p. 46-55.
  118. Ruebel, K.H., L. Jin, X. Qian, *et al.*, *Effects of DNA methylation on galectin-3 expression in pituitary tumors*. Cancer Res, 2005. **65**(4): p. 1136-40.
  119. Ahmed, H., P.P. Banerjee, and G.R. Vasta, *Differential expression of galectins in normal, benign and malignant prostate epithelial cells: Silencing of galectin-3 expression in prostate cancer by its promoter methylation*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **358**(1): p. 241-6.
  120. Gitt, M.A., S.M. Massa, H. Leffler, and S.H. Barondes, *Isolation and expression of a gene encoding L-14-II, a new human soluble lactose-binding lectin*. J Biol Chem, 1992. **267**(15): p. 10601-6.
  121. Sturm, A., M. Lensch, S. Andre, *et al.*, *Human galectin-2: novel inducer of T cell apoptosis with distinct profile of caspase activation*. J Immunol, 2004. **173**(6): p. 3825-37.
  122. Sakakura, C., K. Hasegawa, K. Miyagawa, *et al.*, *Possible involvement of RUNX3 silencing in the peritoneal metastases of gastric cancers*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(18): p. 6479-88.
  123. Gitt, M.A., Y.R. Xia, R.E. Atchison, *et al.*, *Sequence, structure, and chromosomal mapping of the mouse Lgals6 gene, encoding galectin-6*. J Biol Chem, 1998. **273**(5): p. 2961-70.
  124. Bidon, N., F. Brichory, D. Thomas, *et al.*, *Sodium butyrate induces growth inhibition and modulates galectin-8 expression in human lung carcinoma cells*. Anticancer Res, 2001. **21**(2A): p. 1049-55.
  125. Yoshida, H., T. Imaizumi, M. Kumagai, *et al.*, *Interleukin-1beta stimulates galectin-9 expression in human astrocytes*. Neuroreport, 2001. **12**(17): p. 3755-8.
  126. Chabot, S., Y. Kashio, M. Seki, *et al.*, *Regulation of galectin-9 expression and release in Jurkat T cell line cells*. Glycobiology, 2002. **12**(2): p. 111-8.
  127. Imaizumi, T., M. Kumagai, N. Sasaki, *et al.*, *Interferon-gamma stimulates the expression of galectin-9 in cultured human endothelial cells*. J Leukoc Biol, 2002. **72**(3): p. 486-91.
  128. Ishikawa, A., T. Imaizumi, H. Yoshida, *et al.*, *Double-stranded RNA enhances the expression of galectin-9 in vascular endothelial cells*. Immunol Cell Biol, 2004. **82**(4): p. 410-4.
  129. Dyer, K.D. and H.F. Rosenberg, *Shared features of transcription: mutational analysis of the eosinophil/basophil Charcot-Leyden crystal protein gene promoter*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(5): p. 691-8.
  130. Liu, F.T. and G.A. Rabinovich, *Galectins as modulators of tumour progression*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(1): p. 29-41.

131. Liu, F.T., R.J. Patterson, and J.L. Wang, *Intracellular functions of galectins*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1572**(2-3): p. 263-73.
132. Wang, J.L., R.M. Gray, K.C. Haudek, and R.J. Patterson, *Nucleocytoplasmic lectins*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1673**(1-2): p. 75-93.
133. Kim, H.R., H.M. Lin, H. Biliran, and A. Raz, *Cell cycle arrest and inhibition of anoikis by galectin-3 in human breast epithelial cells*. Cancer Res, 1999. **59**(16): p. 4148-54.
134. Lin, H.M., R.G. Pestell, A. Raz, and H.R. Kim, *Galectin-3 enhances cyclin D(1) promoter activity through SP1 and a cAMP-responsive element in human breast epithelial cells*. Oncogene, 2002. **21**(52): p. 8001-10.
135. Paron, I., A. Scalonì, A. Pines, et al., *Nuclear localization of Galectin-3 in transformed thyroid cells: a role in transcriptional regulation*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **302**(3): p. 545-53.
136. Shalom-Feuerstein, R., T. Cooks, A. Raz, and Y. Kloog, *Galectin-3 regulates a molecular switch from N-Ras to K-Ras usage in human breast carcinoma cells*. Cancer Res, 2005. **65**(16): p. 7292-300.
137. Shimura, T., Y. Takenaka, T. Fukumori, et al., *Implication of galectin-3 in Wnt signaling*. Cancer Res, 2005. **65**(9): p. 3535-7.
138. Fischer, C., H. Sanchez-Ruderisch, M. Welzel, et al., *Galectin-1 interacts with the  $\alpha_5\beta_1$  fibronectin receptor to restrict carcinoma cell growth via induction of p21 and p27*. J Biol Chem, 2005. **280**(44): p. 37266-77.
139. Arbel-Goren, R., Y. Levy, D. Ronen, and Y. Zick, *Cyclin-dependent kinase inhibitors and JNK act as molecular switches, regulating the choice between growth arrest and apoptosis induced by galectin-8*. J Biol Chem, 2005. **280**(19): p. 19105-14.
140. Yang, R.Y., D.K. Hsu, L. Yu, J. Ni, and F.T. Liu, *Cell cycle regulation by galectin-12, a new member of the galectin superfamily*. J Biol Chem, 2001. **276**(23): p. 20252-60.
141. Fukumori, T., N. Oka, Y. Takenaka, et al., *Galectin-3 regulates mitochondrial stability and antiapoptotic function in response to anticancer drug in prostate cancer*. Cancer Res, 2006. **66**(6): p. 3114-9.
142. Hoyer, K.K., M. Pang, D. Gui, et al., *An anti-apoptotic role for galectin-3 in diffuse large B-cell lymphomas*. Am J Pathol, 2004. **164**(3): p. 893-902.
143. Fukumori, T., Y. Takenaka, T. Yoshii, et al., *CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis*. Cancer Res, 2003. **63**(23): p. 8302-11.
144. Lee, Y.J., Y.K. Song, J.J. Song, et al., *Reconstitution of galectin-3 alters glutathione content and potentiates TRAIL-induced cytotoxicity by dephosphorylation of Akt*. Exp Cell Res, 2003. **288**(1): p. 21-34.
145. Oka, N., S. Nakahara, Y. Takenaka, et al., *Galectin-3 inhibits tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by activating Akt in human bladder carcinoma cells*. Cancer Res, 2005. **65**(17): p. 7546-53.
146. Califice, S., V. Castronovo, M. Bracke, and F. van den Brule, *Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer: tumor suppression of nuclear galectin-3 vs tumor promotion of cytoplasmic galectin-3*. Oncogene, 2004. **23**(45): p. 7527-36.

147. Perillo, N.L., C.H. Uittenbogaart, J.T. Nguyen, and L.G. Baum, *Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of human thymocytes*. J Exp Med, 1997. **185**(10): p. 1851-8.
148. Perillo, N.L., K.E. Pace, J.J. Seilhamer, and L.G. Baum, *Apoptosis of T cells mediated by galectin-1*. Nature, 1995. **378**(6558): p. 736-9.
149. Perone, M.J., A.T. Larregina, W.J. Shufesky, et al., *Transgenic galectin-1 induces maturation of dendritic cells that elicit contrasting responses in naive and activated T cells*. J Immunol, 2006. **176**(12): p. 7207-20.
150. He, J. and L.G. Baum, *Presentation of galectin-1 by extracellular matrix triggers T cell death*. J Biol Chem, 2004. **279**(6): p. 4705-12.
151. Stillman, B.N., D.K. Hsu, M. Pang, et al., *Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induce T cell death*. J Immunol, 2006. **176**(2): p. 778-89.
152. Hadari, Y.R., R. Arbel-Goren, Y. Levy, et al., *Galectin-8 binding to integrins inhibits cell adhesion and induces apoptosis*. J Cell Sci, 2000. **113** ( Pt 13): p. 2385-97.
153. Wada, J. and Y.S. Kanwar, *Identification and characterization of galectin-9, a novel beta-galactoside-binding mammalian lectin*. J Biol Chem, 1997. **272**(9): p. 6078-86.
154. Dagher, S.F., J.L. Wang, and R.J. Patterson, *Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(4): p. 1213-7.
155. Vyakarnam, A., S.F. Dagher, J.L. Wang, and R.J. Patterson, *Evidence for a role for galectin-1 in pre-mRNA splicing*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(8): p. 4730-7.
156. Paushkin, S., A.K. Gubitz, S. Massenet, and G. Dreyfuss, *The SMN complex, an assemblysome of ribonucleoproteins*. Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(3): p. 305-12.
157. Park, J.W., P.G. Voss, S. Grabski, J.L. Wang, and R.J. Patterson, *Association of galectin-1 and galectin-3 with Gemin4 in complexes containing the SMN protein*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(17): p. 3595-602.
158. Camby, I., M. Le Mercier, F. Lefranc, and R. Kiss, *Galectin-1: a small protein with major functions*. Glycobiology, 2006. **16**(11): p. 137R-157R.
159. Wang, W., J.W. Park, J.L. Wang, and R.J. Patterson, *Immunoprecipitation of spliceosomal RNAs by antisera to galectin-1 and galectin-3*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(18): p. 5166-74.
160. Elola, M.T., C. Wolfenstein-Todel, M.F. Troncoso, G.R. Vasta, and G.A. Rabinovich, *Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival*. Cell Mol Life Sci, 2007.
161. Bornstein, P. and E.H. Sage, *Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function*. Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(5): p. 608-16.
162. van den Brule, F.A., C. Buicu, M. Baldet, et al., *Galectin-1 modulates human melanoma cell adhesion to laminin*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **209**(2): p. 760-7.
163. van den Brule, F., S. Califice, F. Garnier, et al., *Galectin-1 accumulation in the ovary carcinoma peritumoral stroma is induced by ovary carcinoma cells and affects both cancer cell proliferation and adhesion to laminin-1 and fibronectin*. Lab Invest, 2003. **83**(3): p. 377-86.

164. Horiguchi, N., K. Arimoto, A. Mizutani, *et al.*, *Galectin-1 induces cell adhesion to the extracellular matrix and apoptosis of non-adherent human colon cancer Colo201 cells*. J Biochem (Tokyo), 2003. **134**(6): p. 869-74.
165. Gu, M., W. Wang, W.K. Song, D.N. Cooper, and S.J. Kaufman, *Selective modulation of the interaction of alpha 7 beta 1 integrin with fibronectin and laminin by L-14 lectin during skeletal muscle differentiation*. J Cell Sci, 1994. **107** ( Pt 1): p. 175-81.
166. Rabinovich, G.A., A. Ariel, R. Hershkovich, *et al.*, *Specific inhibition of T-cell adhesion to extracellular matrix and proinflammatory cytokine secretion by human recombinant galectin-1*. Immunology, 1999. **97**(1): p. 100-6.
167. Kuwabara, I. and F.T. Liu, *Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin*. J Immunol, 1996. **156**(10): p. 3939-44.
168. Matarrese, P., O. Fusco, N. Tinari, *et al.*, *Galectin-3 overexpression protects from apoptosis by improving cell adhesion properties*. Int J Cancer, 2000. **85**(4): p. 545-54.
169. Ochieng, J., M.L. Leite-Browning, and P. Warfield, *Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **246**(3): p. 788-91.
170. Levy, Y., R. Arbel-Goren, Y.R. Hadari, *et al.*, *Galectin-8 functions as a matricellular modulator of cell adhesion*. J Biol Chem, 2001. **276**(33): p. 31285-95.
171. Kasamatsu, A., K. Uzawa, D. Nakashima, *et al.*, *Galectin-9 as a regulator of cellular adhesion in human oral squamous cell carcinoma cell lines*. Int J Mol Med, 2005. **16**(2): p. 269-73.
172. Irie, A., A. Yamauchi, K. Kontani, *et al.*, *Galectin-9 as a prognostic factor with antimetastatic potential in breast cancer*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(8): p. 2962-8.
173. Tinari, N., I. Kuwabara, M.E. Huflejt, *et al.*, *Glycoprotein 90K/MAC-2BP interacts with galectin-1 and mediates galectin-1-induced cell aggregation*. Int J Cancer, 2001. **91**(2): p. 167-72.
174. Inohara, H., S. Akahani, K. Kohts, and A. Raz, *Interactions between galectin-3 and Mac-2-binding protein mediate cell-cell adhesion*. Cancer Res, 1996. **56**(19): p. 4530-4.
175. Glinsky, V.V., M.E. Huflejt, G.V. Glinsky, S.L. Deutscher, and T.P. Quinn, *Effects of Thomsen-Friedenreich antigen-specific peptide P-30 on beta-galactoside-mediated homotypic aggregation and adhesion to the endothelium of MDA-MB-435 human breast carcinoma cells*. Cancer Res, 2000. **60**(10): p. 2584-8.
176. Baum, L.G., M. Pang, N.L. Perillo, *et al.*, *Human thymic epithelial cells express an endogenous lectin, galectin-1, which binds to core 2 O-glycans on thymocytes and T lymphoblastoid cells*. J Exp Med, 1995. **181**(3): p. 877-87.
177. Khaldoyanidi, S.K., V.V. Glinsky, L. Sikora, *et al.*, *MDA-MB-435 human breast carcinoma cell homo- and heterotypic adhesion under flow conditions is mediated in part by Thomsen-Friedenreich antigen-galectin-3 interactions*. J Biol Chem, 2003. **278**(6): p. 4127-34.

178. Krishnan, V., S.M. Bane, P.D. Kawle, K.N. Naresh, and R.D. Kalraiya, *Altered melanoma cell surface glycosylation mediates organ specific adhesion and metastasis via lectin receptors on the lung vascular endothelium*. Clin Exp Metastasis, 2005. **22**(1): p. 11-24.
179. Swarte, V.V., R.E. Mebius, D.H. Joziase, D.H. Van den Eijnden, and G. Kraal, *Lymphocyte triggering via L-selectin leads to enhanced galectin-3-mediated binding to dendritic cells*. Eur J Immunol, 1998. **28**(9): p. 2864-71.
180. Matsumoto, R., H. Matsumoto, M. Seki, *et al.*, *Human ecalectin, a variant of human galectin-9, is a novel eosinophil chemoattractant produced by T lymphocytes*. J Biol Chem, 1998. **273**(27): p. 16976-84.
181. Kageshita, T., Y. Kashio, A. Yamauchi, *et al.*, *Possible role of galectin-9 in cell aggregation and apoptosis of human melanoma cell lines and its clinical significance*. Int J Cancer, 2002. **99**(6): p. 809-16.
182. Fulcher, J.A., S.T. Hashimi, E.L. Levroney, *et al.*, *Galectin-1-matured human monocyte-derived dendritic cells have enhanced migration through extracellular matrix*. J Immunol, 2006. **177**(1): p. 216-26.
183. Moiseeva, E.P., E.L. Spring, J.H. Baron, and D.P. de Bono, *Galectin 1 modulates attachment, spreading and migration of cultured vascular smooth muscle cells via interactions with cellular receptors and components of extracellular matrix*. J Vasc Res, 1999. **36**(1): p. 47-58.
184. Camby, I., N. Belot, F. Lefranc, *et al.*, *Galectin-1 modulates human glioblastoma cell migration into the brain through modifications to the actin cytoskeleton and levels of expression of small GTPases*. J Neuropathol Exp Neurol, 2002. **61**(7): p. 585-96.
185. Rorive, S., N. Belot, C. Decaestecker, *et al.*, *Galectin-1 is highly expressed in human gliomas with relevance for modulation of invasion of tumor astrocytes into the brain parenchyma*. Glia, 2001. **33**(3): p. 241-55.
186. Thijssen, V.L., R. Postel, R.J. Brandwijk, *et al.*, *Galectin-1 is essential in tumor angiogenesis and is a target for antiangiogenesis therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(43): p. 15975-80.
187. He, J. and L.G. Baum, *Endothelial cell expression of galectin-1 induced by prostate cancer cells inhibits T-cell transendothelial migration*. Lab Invest, 2006. **86**(6): p. 578-90.
188. Delbrouck, C., I. Doyen, N. Belot, *et al.*, *Galectin-1 is overexpressed in nasal polyps under budesonide and inhibits eosinophil migration*. Lab Invest, 2002. **82**(2): p. 147-58.
189. Hittlet, A., H. Legendre, N. Nagy, *et al.*, *Upregulation of galectins-1 and -3 in human colon cancer and their role in regulating cell migration*. Int J Cancer, 2003. **103**(3): p. 370-9.
190. Fukushi, J., I.T. Makagiansar, and W.B. Stallcup, *NG2 proteoglycan promotes endothelial cell motility and angiogenesis via engagement of galectin-3 and alpha3beta1 integrin*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(8): p. 3580-90.
191. Sano, H., D.K. Hsu, L. Yu, *et al.*, *Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages*. J Immunol, 2000. **165**(4): p. 2156-64.
192. Savino, W., D.A. Mendes-Da-Cruz, S. Smaniotto, E. Silva-Monteiro, and D.M. Villa-Verde, *Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined*

- role of chemokines and extracellular matrix.* J Leukoc Biol, 2004. **75**(6): p. 951-61.
193. Le Marer, N. and R.C. Hughes, *Effects of the carbohydrate-binding protein galectin-3 on the invasiveness of human breast carcinoma cells.* J Cell Physiol, 1996. **168**(1): p. 51-8.
194. Maeda, N., N. Kawada, S. Seki, *et al.*, *Stimulation of proliferation of rat hepatic stellate cells by galectin-1 and galectin-3 through different intracellular signaling pathways.* J Biol Chem, 2003. **278**(21): p. 18938-44.
195. Camby, I., N. Belot, S. Rorive, *et al.*, *Galectins are differentially expressed in supratentorial pilocytic astrocytomas, astrocytomas, anaplastic astrocytomas and glioblastomas, and significantly modulate tumor astrocyte migration.* Brain Pathol, 2001. **11**(1): p. 12-26.
196. Matsushita, N., N. Nishi, M. Seki, *et al.*, *Requirement of divalent galactoside-binding activity of ecalectin/galectin-9 for eosinophil chemoattraction.* J Biol Chem, 2000. **275**(12): p. 8355-60.
197. Daniels, M.A., K.A. Hogquist, and S.C. Jameson, *Sweet 'n' sour: the impact of differential glycosylation on T cell responses.* Nat Immunol, 2002. **3**(10): p. 903-10.
198. Rabinovich, G.A., G. Daly, H. Dreja, *et al.*, *Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis.* J Exp Med, 1999. **190**(3): p. 385-98.
199. Santucci, L., S. Fiorucci, F. Cammilleri, *et al.*, *Galectin-1 exerts immunomodulatory and protective effects on concanavalin A-induced hepatitis in mice.* Hepatology, 2000. **31**(2): p. 399-406.
200. Santucci, L., S. Fiorucci, N. Rubinstein, *et al.*, *Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice.* Gastroenterology, 2003. **124**(5): p. 1381-94.
201. Toscano, M.A., A.G. Commodaro, J.M. Ibarregui, *et al.*, *Galectin-1 suppresses autoimmune retinal disease by promoting concomitant Th2- and T regulatory-mediated anti-inflammatory responses.* J Immunol, 2006. **176**(10): p. 6323-32.
202. Endharti, A.T., Y.W. Zhou, I. Nakashima, and H. Suzuki, *Galectin-1 supports survival of naive T cells without promoting cell proliferation.* Eur J Immunol, 2005. **35**(1): p. 86-97.
203. Matarrese, P., A. Tinari, E. Mormone, *et al.*, *Galectin-1 sensitizes resting human T lymphocytes to Fas (CD95)-mediated cell death via mitochondrial hyperpolarization, budding, and fission.* J Biol Chem, 2005. **280**(8): p. 6969-85.
204. Pace, K.E., H.P. Hahn, M. Pang, J.T. Nguyen, and L.G. Baum, *CD7 delivers a pro-apoptotic signal during galectin-1-induced T cell death.* J Immunol, 2000. **165**(5): p. 2331-4.
205. Sugimoto, N., T. Oida, K. Hirota, *et al.*, *Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25+CD4+ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis.* Int Immunol, 2006. **18**(8): p. 1197-209.
206. Garin, M.I., C.C. Chu, D. Golshayan, *et al.*, *Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells.* Blood, 2007. **109**(5): p. 2058-65.
207. Vespa, G.N., L.A. Lewis, K.R. Kozak, *et al.*, *Galectin-1 specifically modulates TCR signals to enhance TCR apoptosis but inhibit IL-2 production and proliferation.* J Immunol, 1999. **162**(2): p. 799-806.

208. Levroney, E.L., H.C. Aguilar, J.A. Fulcher, *et al.*, *Novel innate immune functions for galectin-1: galectin-1 inhibits cell fusion by Nipah virus envelope glycoproteins and augments dendritic cell secretion of proinflammatory cytokines.* J Immunol, 2005. **175**(1): p. 413-20.
209. Barrionuevo, P., M. Beigier-Bompadre, J.M. Ibarregui, *et al.*, *A novel function for galectin-1 at the crossroad of innate and adaptive immunity: galectin-1 regulates monocyte/macrophage physiology through a nonapoptotic ERK-dependent pathway.* J Immunol, 2007. **178**(1): p. 436-45.
210. Yang, R.Y., D.K. Hsu, and F.T. Liu, *Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(13): p. 6737-42.
211. Demetriou, M., M. Granovsky, S. Quaggin, and J.W. Dennis, *Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation.* Nature, 2001. **409**(6821): p. 733-9.
212. Cortegano, I., V. del Pozo, B. Cardaba, *et al.*, *Galectin-3 down-regulates IL-5 gene expression on different cell types.* J Immunol, 1998. **161**(1): p. 385-9.
213. Hsu, D.K., R.Y. Yang, Z. Pan, *et al.*, *Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses.* Am J Pathol, 2000. **156**(3): p. 1073-83.
214. Colnot, C., M.A. Ripoche, G. Milon, *et al.*, *Maintenance of granulocyte numbers during acute peritonitis is defective in galectin-3-null mutant mice.* Immunology, 1998. **94**(3): p. 290-6.
215. Sato, S., N. Ouellet, I. Pelletier, *et al.*, *Role of galectin-3 as an adhesion molecule for neutrophil extravasation during streptococcal pneumonia.* J Immunol, 2002. **168**(4): p. 1813-22.
216. Fernandez, G.C., J.M. Ibarregui, C.J. Rubel, *et al.*, *Galectin-3 and soluble fibrinogen act in concert to modulate neutrophil activation and survival: involvement of alternative MAPK pathways.* Glycobiology, 2005. **15**(5): p. 519-27.
217. Nieminen, J., C. St-Pierre, and S. Sato, *Galectin-3 interacts with naive and primed neutrophils, inducing innate immune responses.* J Leukoc Biol, 2005. **78**(5): p. 1127-35.
218. Sano, H., D.K. Hsu, J.R. Apgar, *et al.*, *Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages.* J Clin Invest, 2003. **112**(3): p. 389-97.
219. Lopez, E., V. del Pozo, T. Miguel, *et al.*, *Inhibition of chronic airway inflammation and remodeling by galectin-3 gene therapy in a murine model.* J Immunol, 2006. **176**(3): p. 1943-50.
220. Zuberi, R.I., D.K. Hsu, O. Kalayci, *et al.*, *Critical role for galectin-3 in airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in a murine model of asthma.* Am J Pathol, 2004. **165**(6): p. 2045-53.
221. Zhu, C., A.C. Anderson, A. Schubart, *et al.*, *The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity.* Nat Immunol, 2005. **6**(12): p. 1245-52.
222. Dai, S.Y., R. Nakagawa, A. Itoh, *et al.*, *Galectin-9 induces maturation of human monocyte-derived dendritic cells.* J Immunol, 2005. **175**(5): p. 2974-81.

223. Matsumoto, R., M. Hirashima, H. Kita, and G.J. Gleich, *Biological activities of ecalectin: a novel eosinophil-activating factor*. J Immunol, 2002. **168**(4): p. 1961-7.
224. Hokama, A., E. Mizoguchi, K. Sugimoto, *et al.*, *Induced reactivity of intestinal CD4(+) T cells with an epithelial cell lectin, galectin-4, contributes to exacerbation of intestinal inflammation*. Immunity, 2004. **20**(6): p. 681-93.
225. Nishi, N., H. Shoji, M. Seki, *et al.*, *Galectin-8 modulates neutrophil function via interaction with integrin alphaM*. Glycobiology, 2003. **13**(11): p. 755-63.
226. Danguy, A., I. Camby, and R. Kiss, *Galectins and cancer*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1572**(2-3): p. 285-93.
227. van den Brule, F., S. Califice, and V. Castronovo, *Expression of galectins in cancer: a critical review*. Glycoconj J, 2004. **19**(7-9): p. 537-42.
228. Yamaoka, K., S. Ohno, H. Kawasaki, and K. Suzuki, *Overexpression of a beta-galactoside binding protein causes transformation of BALB3T3 fibroblast cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1991. **179**(1): p. 272-9.
229. Yamaoka, K., K. Mishima, Y. Nagashima, *et al.*, *Expression of galectin-1 mRNA correlates with the malignant potential of human gliomas and expression of antisense galectin-1 inhibits the growth of 9 glioma cells*. J Neurosci Res, 2000. **59**(6): p. 722-30.
230. Yoshii, T., H. Inohara, Y. Takenaka, *et al.*, *Galectin-3 maintains the transformed phenotype of thyroid papillary carcinoma cells*. Int J Oncol, 2001. **18**(4): p. 787-92.
231. Takenaka, Y., H. Inohara, T. Yoshii, *et al.*, *Malignant transformation of thyroid follicular cells by galectin-3*. Cancer Lett, 2003. **195**(1): p. 111-9.
232. Honjo, Y., P. Nangia-Makker, H. Inohara, and A. Raz, *Down-regulation of galectin-3 suppresses tumorigenicity of human breast carcinoma cells*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(3): p. 661-8.
233. Paz, A., R. Haklai, G. Elad-Sfadia, E. Ballan, and Y. Kloog, *Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation*. Oncogene, 2001. **20**(51): p. 7486-93.
234. Lin, H.M., B.K. Moon, F. Yu, and H.R. Kim, *Galectin-3 mediates genistein-induced G(2)/M arrest and inhibits apoptosis*. Carcinogenesis, 2000. **21**(11): p. 1941-5.
235. Moon, B.K., Y.J. Lee, P. Battle, *et al.*, *Galectin-3 protects human breast carcinoma cells against nitric oxide-induced apoptosis: implication of galectin-3 function during metastasis*. Am J Pathol, 2001. **159**(3): p. 1055-60.
236. Pacis, R.A., M.J. Pilat, K.J. Pienta, *et al.*, *Decreased galectin-3 expression in prostate cancer*. Prostate, 2000. **44**(2): p. 118-23.
237. van den Brule, F.A., D. Waltregny, F.T. Liu, and V. Castronovo, *Alteration of the cytoplasmic/nuclear expression pattern of galectin-3 correlates with prostate carcinoma progression*. Int J Cancer, 2000. **89**(4): p. 361-7.
238. Prieto, V.G., A.A. Mourad-Zeidan, V. Melnikova, *et al.*, *Galectin-3 expression is associated with tumor progression and pattern of sun exposure in melanoma*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(22): p. 6709-15.

239. Takenaka, Y., T. Fukumori, T. Yoshii, *et al.*, *Nuclear export of phosphorylated galectin-3 regulates its antiapoptotic activity in response to chemotherapeutic drugs*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(10): p. 4395-406.
240. Lotan, R., P.N. Belloni, R.J. Tressler, *et al.*, *Expression of galectins on microvessel endothelial cells and their involvement in tumour cell adhesion*. *Glycoconj J*, 1994. **11**(5): p. 462-8.
241. Baum, L.G., J.J. Seilhamer, M. Pang, *et al.*, *Synthesis of an endogeneous lectin, galectin-1, by human endothelial cells is up-regulated by endothelial cell activation*. *Glycoconj J*, 1995. **12**(1): p. 63-8.
242. Clause, N., F. van den Brule, D. Waltregny, F. Garnier, and V. Castronovo, *Galectin-1 expression in prostate tumor-associated capillary endothelial cells is increased by prostate carcinoma cells and modulates heterotypic cell-cell adhesion*. *Angiogenesis*, 1999. **3**(4): p. 317-25.
243. Nangia-Makker, P., Y. Honjo, R. Sarvis, *et al.*, *Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis*. *Am J Pathol*, 2000. **156**(3): p. 899-909.
244. Nakamura, M., H. Inufusa, T. Adachi, *et al.*, *Involvement of galectin-3 expression in colorectal cancer progression and metastasis*. *Int J Oncol*, 1999. **15**(1): p. 143-8.
245. O'Driscoll, L., R. Linehan, Y.H. Liang, *et al.*, *Galectin-3 expression alters adhesion, motility and invasion in a lung cell line (DLKP), in vitro*. *Anticancer Res*, 2002. **22**(6A): p. 3117-25.
246. Rossi, B., M. Espeli, C. Schiff, and L. Gauthier, *Clustering of pre-B cell integrins induces galectin-1-dependent pre-B cell receptor relocalization and activation*. *J Immunol*, 2006. **177**(2): p. 796-803.
247. Lagana, A., J.G. Goetz, P. Cheung, *et al.*, *Galectin binding to Mgat5-modified N-glycans regulates fibronectin matrix remodeling in tumor cells*. *Mol Cell Biol*, 2006. **26**(8): p. 3181-93.
248. Carcamo, C., E. Pardo, C. Oyanadel, *et al.*, *Galectin-8 binds specific beta1 integrins and induces polarized spreading highlighted by asymmetric lamellipodia in Jurkat T cells*. *Exp Cell Res*, 2006. **312**(4): p. 374-86.
249. Hood, J.D. and D.A. Cheresh, *Role of integrins in cell invasion and migration*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(2): p. 91-100.
250. Ochieng, J., R. Fridman, P. Nangia-Makker, *et al.*, *Galectin-3 is a novel substrate for human matrix metalloproteinases-2 and -9*. *Biochemistry*, 1994. **33**(47): p. 14109-14.
251. Fry, S.A., P.E. Steen, L. Royle, *et al.*, *Cancer-Associated Glycoforms of Gelatinase B Exhibit a Decreased Level of Binding to Galectin-3*. *Biochemistry*, 2006. **45**(51): p. 15249-15258.
252. Rabinovich, G.A., M.A. Toscano, J.M. Ilarregui, and N. Rubinstein, *Shedding light on the immunomodulatory properties of galectins: novel regulators of innate and adaptive immune responses*. *Glycoconj J*, 2004. **19**(7-9): p. 565-73.
253. Chung, C.D., V.P. Patel, M. Moran, L.A. Lewis, and M.C. Miceli, *Galectin-1 induces partial TCR zeta-chain phosphorylation and antagonizes processive TCR signal transduction*. *J Immunol*, 2000. **165**(7): p. 3722-9.
254. Rubinstein, N., M. Alvarez, N.W. Zwirner, *et al.*, *Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A*

- potential mechanism of tumor-immune privilege. Cancer Cell, 2004. 5(3): p. 241-51.*
255. Le, Q.T., G. Shi, H. Cao, *et al.*, *Galectin-1: a link between tumor hypoxia and tumor immune privilege. J Clin Oncol, 2005. 23(35): p. 8932-41.*
  256. Zubieta, M.R., D. Furman, M. Barrio, *et al.*, *Galectin-3 expression correlates with apoptosis of tumor-associated lymphocytes in human melanoma biopsies. Am J Pathol, 2006. 168(5): p. 1666-75.*
  257. Bresalier, R.S., N. Mazurek, L.R. Sternberg, *et al.*, *Metastasis of human colon cancer is altered by modifying expression of the beta-galactoside-binding protein galectin 3. Gastroenterology, 1998. 115(2): p. 287-96.*
  258. Inufusa, H., M. Nakamura, T. Adachi, *et al.*, *Role of galectin-3 in adenocarcinoma liver metastasis. Int J Oncol, 2001. 19(5): p. 913-9.*
  259. Pienta, K.J., H. Naik, A. Akhtar, *et al.*, *Inhibition of spontaneous metastasis in a rat prostate cancer model by oral administration of modified citrus pectin. J Natl Cancer Inst, 1995. 87(5): p. 348-53.*
  260. Nangia-Makker, P., V. Hogan, Y. Honjo, *et al.*, *Inhibition of human cancer cell growth and metastasis in nude mice by oral intake of modified citrus pectin. J Natl Cancer Inst, 2002. 94(24): p. 1854-62.*
  261. Zou, J., V.V. Glinsky, L.A. Landon, L. Matthews, and S.L. Deutscher, *Peptides specific to the galectin-3 carbohydrate recognition domain inhibit metastasis-associated cancer cell adhesion. Carcinogenesis, 2005. 26(2): p. 309-18.*
  262. Glinsky, G.V., J.E. Price, V.V. Glinsky, *et al.*, *Inhibition of human breast cancer metastasis in nude mice by synthetic glycoamines. Cancer Res, 1996. 56(23): p. 5319-24.*
  263. Rabinovich, G.A., A. Cumashi, G.A. Bianco, *et al.*, *Synthetic lactulose amines: novel class of anticancer agents that induce tumor-cell apoptosis and inhibit galectin-mediated homotypic cell aggregation and endothelial cell morphogenesis. Glycobiology, 2006. 16(3): p. 210-20.*
  264. Huflejt, M.E. and H. Leffler, *Galectin-4 in normal tissues and cancer. Glycoconj J, 2004. 20(4): p. 247-55.*
  265. Madsen, P., H.H. Rasmussen, T. Flint, *et al.*, *Cloning, expression, and chromosome mapping of human galectin-7. J Biol Chem, 1995. 270(11): p. 5823-9.*
  266. Magnaldo, T., F. Bernerd, and M. Darmon, *Galectin-7, a human 14-kDa S-lectin, specifically expressed in keratinocytes and sensitive to retinoic acid. Dev Biol, 1995. 168(2): p. 259-71.*
  267. Hughes, R.C., *Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. Biochim Biophys Acta, 1999. 1473(1): p. 172-85.*
  268. Kopitz, J., S. Andre, C. von Reitzenstein, *et al.*, *Homodimeric galectin-7 (p53-induced gene 1) is a negative growth regulator for human neuroblastoma cells. Oncogene, 2003. 22(40): p. 6277-88.*
  269. Leonidas, D.D., E.H. Vatzaki, H. Vorum, *et al.*, *Structural basis for the recognition of carbohydrates by human galectin-7. Biochemistry, 1998. 37(40): p. 13930-40.*
  270. Sato, M., N. Nishi, H. Shoji, *et al.*, *Quantification of galectin-7 and its localization in adult mouse tissues. J Biochem (Tokyo), 2002. 131(2): p. 255-60.*

271. Kuwabara, I., Y. Kuwabara, R.Y. Yang, *et al.*, *Galectin-7 (PIG1) exhibits pro-apoptotic function through JNK activation and mitochondrial cytochrome c release*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(5): p. 3487-97.
272. Timmons, P.M., C. Colnot, I. Cail, F. Poirier, and T. Magnaldo, *Expression of galectin-7 during epithelial development coincides with the onset of stratification*. *Int J Dev Biol*, 1999. **43**(3): p. 229-35.
273. Magnaldo, T., D. Fowlis, and M. Darmon, *Galectin-7, a marker of all types of stratified epithelia*. *Differentiation*, 1998. **63**(3): p. 159-68.
274. Young, P.P., V. Modur, A.A. Teleron, and J.H. Ladenson, *Enrichment of genes in the aortic intima that are associated with stratified epithelium: implications of underlying biomechanical and barrier properties of the arterial intima*. *Circulation*, 2005. **111**(18): p. 2382-90.
275. Delbrouck, C., C. Souchay, H. Kaltner, *et al.*, *Regulation of expression of galectin-7 in human nasal polyps by budesonide*. *B-Ent*, 2005. **1**(3): p. 137-44.
276. Moisan, S., M. Demers, J. Mercier, *et al.*, *Upregulation of galectin-7 in murine lymphoma cells is associated with progression toward an aggressive phenotype*. *Leukemia*, 2003. **17**(4): p. 751-9.
277. Matsui, Y., S. Ueda, J. Watanabe, *et al.*, *Sensitizing effect of galectin-7 in urothelial cancer to cisplatin through the accumulation of intracellular reactive oxygen species*. *Cancer Res*, 2007. **67**(3): p. 1212-20.
278. Shen, J., P.K. Riggs, S.C. Hensley, *et al.*, *Differential expression of multiple anti-apoptotic proteins in epidermis of IGF-1 transgenic mice as revealed by 2-dimensional gel electrophoresis/mass spectrometry analysis*. *Mol Carcinog*, 2007. **46**(5): p. 331-40.
279. Polyak, K., Y. Xia, J.L. Zweier, K.W. Kinzler, and B. Vogelstein, *A model for p53-induced apoptosis*. *Nature*, 1997. **389**(6648): p. 300-5.
280. Bernerd, F., A. Sarasin, and T. Magnaldo, *Galectin-7 overexpression is associated with the apoptotic process in UVB-induced sunburn keratinocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(20): p. 11329-34.
281. Cao, Z., H.K. Wu, A. Bruce, K. Wollenberg, and N. Panjwani, *Detection of differentially expressed genes in healing mouse corneas, using cDNA microarrays*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002. **43**(9): p. 2897-904.
282. Shen, J., A. Pavone, C. Mikulec, *et al.*, *Protein expression profiles in the epidermis of cyclooxygenase-2 transgenic mice by 2-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry*. *J Proteome Res*, 2007. **6**(1): p. 273-86.
283. Fuchs, E., *Scratching the surface of skin development*. *Nature*, 2007. **445**(7130): p. 834-42.
284. Brouard, M. and Y. Barrandon, *Controlling skin morphogenesis: hope and despair*. *Curr Opin Biotechnol*, 2003. **14**(5): p. 520-5.
285. Bernerd, F., T. Magnaldo, and M. Darmon, *Delayed onset of epidermal differentiation in psoriasis*. *J Invest Dermatol*, 1992. **98**(6): p. 902-10.
286. Ueda, S., I. Kuwabara, and F.T. Liu, *Suppression of tumor growth by galectin-7 gene transfer*. *Cancer Res*, 2004. **64**(16): p. 5672-6.
287. Fred Brewer, C., *Binding and cross-linking properties of galectins*. *Biochim Biophys Acta*, 2002. **1572**(2-3): p. 255-62.

288. Hughes, R.C., *Galectins as modulators of cell adhesion*. Biochimie, 2001. **83**(7): p. 667-76.
289. Cao, Z., N. Said, H.K. Wu, *et al.*, *Galectin-7 as a potential mediator of corneal epithelial cell migration*. Arch Ophthalmol, 2003. **121**(1): p. 82-6.
290. Cao, Z., N. Said, S. Amin, *et al.*, *Galectins-3 and -7, but not galectin-1, play a role in re-epithelialization of wounds*. J Biol Chem, 2002. **277**(44): p. 42299-305.
291. Ostergaard, M., H.H. Rasmussen, H.V. Nielsen, *et al.*, *Proteome profiling of bladder squamous cell carcinomas: identification of markers that define their degree of differentiation*. Cancer Res, 1997. **57**(18): p. 4111-7.
292. Chen, J., Q.Y. He, A.P. Yuen, and J.F. Chiu, *Proteomics of buccal squamous cell carcinoma: the involvement of multiple pathways in tumorigenesis*. Proteomics, 2004. **4**(8): p. 2465-75.
293. Lu, J., H. Pei, M. Kaeck, and H.J. Thompson, *Gene expression changes associated with chemically induced rat mammary carcinogenesis*. Mol Carcinog, 1997. **20**(2): p. 204-15.
294. Lahm, H., S. Andre, A. Hoeflich, *et al.*, *Comprehensive galectin fingerprinting in a panel of 61 human tumor cell lines by RT-PCR and its implications for diagnostic and therapeutic procedures*. J Cancer Res Clin Oncol, 2001. **127**(6): p. 375-86.
295. Rorive, S., B. Eddafali, S. Fernandez, *et al.*, *Changes in galectin-7 and cytokeratin-19 expression during the progression of malignancy in thyroid tumors: diagnostic and biological implications*. Mod Pathol, 2002. **15**(12): p. 1294-301.
296. Saussez, S., D.R. Cucu, C. Decaestecker, *et al.*, *Galectin 7 (p53-induced gene 1): a new prognostic predictor of recurrence and survival in stage IV hypopharyngeal cancer*. Ann Surg Oncol, 2006. **13**(7): p. 999-1009.
297. Saussez, S., F. Lorfevre, T. Lequeux, *et al.*, *The determination of the levels of circulating galectin-1 and -3 in HNSCC patients could be used to monitor tumor progression and/or responses to therapy*. Oral Oncol, 2007.
298. Zucker, S. and J. Vacirca, *Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2004. **23**(1-2): p. 101-17.
299. Demers, M., J. Couillard, S. Belanger, and Y. St-Pierre, *New roles for matrix metalloproteinases in metastasis*. Crit Rev Immunol, 2005. **25**(6): p. 493-523.
300. Greenlee, K.J., Z. Werb, and F. Kheradmand, *Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted*. Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 69-98.
301. Nagase, H. and J.F. Woessner, Jr., *Matrix metalloproteinases*. J Biol Chem, 1999. **274**(31): p. 21491-4.
302. Overall, C.M. and C. Lopez-Otin, *Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(9): p. 657-72.
303. Sopata, I., E. Wojtecka-Lukasik, and A.M. Dancewicz, *Solubilization of collagen fibrils by human leucocyte collagenase activated by rheumatoid synovial fluid*. Acta Biochim Pol, 1974. **21**(3): p. 283-9.
304. Wilhelm, S.M., I.E. Collier, B.L. Marmer, *et al.*, *SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages*. J Biol Chem, 1989. **264**(29): p. 17213-21.

305. Devarajan, P., J.J. Johnston, S.S. Ginsberg, H.E. Van Wart, and N. Berliner, *Structure and expression of neutrophil gelatinase cDNA. Identity with type IV collagenase from HT1080 cells.* J Biol Chem, 1992. **267**(35): p. 25228-32.
306. Masure, S., P. Proost, J. Van Damme, and G. Opdenakker, *Purification and identification of 91-kDa neutrophil gelatinase. Release by the activating peptide interleukin-8.* Eur J Biochem, 1991. **198**(2): p. 391-8.
307. Opdenakker, G., S. Masure, P. Proost, A. Billiau, and J. van Damme, *Natural human monocyte gelatinase and its inhibitor.* FEBS Lett, 1991. **284**(1): p. 73-8.
308. Welgus, H.G., E.J. Campbell, J.D. Cury, *et al.*, *Neutral metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes. Enzyme profile, regulation, and expression during cellular development.* J Clin Invest, 1990. **86**(5): p. 1496-502.
309. Ohno, I., H. Ohtani, Y. Nitta, *et al.*, *Eosinophils as a source of matrix metalloproteinase-9 in asthmatic airway inflammation.* Am J Respir Cell Mol Biol, 1997. **16**(3): p. 212-9.
310. Kanbe, N., A. Tanaka, M. Kanbe, *et al.*, *Human mast cells produce matrix metalloproteinase 9.* Eur J Immunol, 1999. **29**(8): p. 2645-9.
311. Weeks, B.S., H.W. Schnaper, M. Handy, E. Holloway, and H.K. Kleinman, *Human T lymphocytes synthesize the 92 kDa type IV collagenase (gelatinase B).* J Cell Physiol, 1993. **157**(3): p. 644-9.
312. Albertsson, P., M.H. Kim, L.E. Jonges, *et al.*, *Matrix metalloproteinases of human NK cells.* In Vivo, 2000. **14**(1): p. 269-76.
313. Bartholome, E.J., I. Van Aelst, E. Koyen, *et al.*, *Human monocyte-derived dendritic cells produce bioactive gelatinase B: inhibition by IFN-beta.* J Interferon Cytokine Res, 2001. **21**(7): p. 495-501.
314. Yao, P.M., J.M. Buhler, M.P. d'Ortho, *et al.*, *Expression of matrix metalloproteinase gelatinases A and B by cultured epithelial cells from human bronchial explants.* J Biol Chem, 1996. **271**(26): p. 15580-9.
315. Atkinson, J.J. and R.M. Senior, *Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2003. **28**(1): p. 12-24.
316. Schnaper, H.W., D.S. Grant, W.G. Stetler-Stevenson, *et al.*, *Type IV collagenase(s) and TIMPs modulate endothelial cell morphogenesis in vitro.* J Cell Physiol, 1993. **156**(2): p. 235-46.
317. Johnatty, R.N., D.D. Taub, S.P. Reeder, *et al.*, *Cytokine and chemokine regulation of proMMP-9 and TIMP-1 production by human peripheral blood lymphocytes.* J Immunol, 1997. **158**(5): p. 2327-33.
318. Zhou, H., E.J. Bernhard, F.E. Fox, and P.C. Billings, *Induction of metalloproteinase activity in human T-lymphocytes.* Biochim Biophys Acta, 1993. **1177**(2): p. 174-8.
319. Xia, M., D. Leppert, S.L. Hauser, *et al.*, *Stimulus specificity of matrix metalloproteinase dependence of human T cell migration through a model basement membrane.* J Immunol, 1996. **156**(1): p. 160-7.
320. Chan, P.Y. and A. Aruffo, *VLA-4 integrin mediates lymphocyte migration on the inducible endothelial cell ligand VCAM-1 and the extracellular matrix ligand fibronectin.* J Biol Chem, 1993. **268**(33): p. 24655-64.

321. Hu, K., J. Yang, S. Tanaka, *et al.*, *Tissue-type plasminogen activator acts as a cytokine that triggers intracellular signal transduction and induces matrix metalloproteinase-9 gene expression*. J Biol Chem, 2006. **281**(4): p. 2120-7.
322. Ismail, M.G., C. Ries, F. Lottspeich, *et al.*, *Autocrine regulation of matrix metalloproteinase-9 gene expression and secretion by tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in NB4 leukemic cells: specific involvement of TNF receptor type I*. Leukemia, 1998. **12**(7): p. 1136-43.
323. Leber, T.M. and F.R. Balkwill, *Regulation of monocyte MMP-9 production by TNF-alpha and a tumour-derived soluble factor (MMPSF)*. Br J Cancer, 1998. **78**(6): p. 724-32.
324. Locati, M., U. Deuschle, M.L. Massardi, *et al.*, *Analysis of the gene expression profile activated by the CC chemokine ligand 5/RANTES and by lipopolysaccharide in human monocytes*. J Immunol, 2002. **168**(7): p. 3557-62.
325. Robinson, S.C., K.A. Scott, and F.R. Balkwill, *Chemokine stimulation of monocyte matrix metalloproteinase-9 requires endogenous TNF-alpha*. Eur J Immunol, 2002. **32**(2): p. 404-12.
326. Mach, F., U. Schonbeck, R.P. Fabunmi, *et al.*, *T lymphocytes induce endothelial cell matrix metalloproteinase expression by a CD40L-dependent mechanism: implications for tubule formation*. Am J Pathol, 1999. **154**(1): p. 229-38.
327. Schonbeck, U., F. Mach, G.K. Sukhova, *et al.*, *Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T lymphocytes: a role for CD40 signaling in plaque rupture?* Circ Res, 1997. **81**(3): p. 448-54.
328. Malik, N., B.W. Greenfield, A.F. Wahl, and P.A. Kiener, *Activation of human monocytes through CD40 induces matrix metalloproteinases*. J Immunol, 1996. **156**(10): p. 3952-60.
329. Di Girolamo, N., I. Indoh, N. Jackson, *et al.*, *Human mast cell-derived gelatinase B (matrix metalloproteinase-9) is regulated by inflammatory cytokines: role in cell migration*. J Immunol, 2006. **177**(4): p. 2638-50.
330. Corcoran, M.L., W.G. Stetler-Stevenson, P.D. Brown, and L.M. Wahl, *Interleukin 4 inhibition of prostaglandin E2 synthesis blocks interstitial collagenase and 92-kDa type IV collagenase/gelatinase production by human monocytes*. J Biol Chem, 1992. **267**(1): p. 515-9.
331. Lacraz, S., L.P. Nicod, R. Chicheportiche, H.G. Welgus, and J.M. Dayer, *IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes*. J Clin Invest, 1995. **96**(5): p. 2304-10.
332. Wahl, L.M., M.E. Corcoran, S.E. Mergenhagen, and D.S. Finbloom, *Inhibition of phospholipase activity in human monocytes by IFN-gamma blocks endogenous prostaglandin E2-dependent collagenase production*. J Immunol, 1990. **144**(9): p. 3518-22.
333. Mertz, P.M., D.L. DeWitt, W.G. Stetler-Stevenson, and L.M. Wahl, *Interleukin 10 suppression of monocyte prostaglandin H synthase-2. Mechanism of inhibition of prostaglandin-dependent matrix metalloproteinase production*. J Biol Chem, 1994. **269**(33): p. 21322-9.

334. Vu, T.H., J.M. Shipley, G. Bergers, *et al.*, *MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes*. *Cell*, 1998. **93**(3): p. 411-22.
335. Dubois, B., S. Masure, U. Hurtenbach, *et al.*, *Resistance of young gelatinase B-deficient mice to experimental autoimmune encephalomyelitis and necrotizing tail lesions*. *J Clin Invest*, 1999. **104**(11): p. 1507-15.
336. Dubois, B., B. Arnold, and G. Opdenakker, *Gelatinase B deficiency impairs reproduction*. *J Clin Invest*, 2000. **106**(5): p. 627-8.
337. Heissig, B., K. Hattori, S. Dias, *et al.*, *Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand*. *Cell*, 2002. **109**(5): p. 625-37.
338. Van den Steen, P.E., P. Proost, A. Wuyts, J. Van Damme, and G. Opdenakker, *Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact*. *Blood*, 2000. **96**(8): p. 2673-81.
339. Schonbeck, U., F. Mach, and P. Libby, *Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing*. *J Immunol*, 1998. **161**(7): p. 3340-6.
340. Opdenakker, G., P.E. Van den Steen, B. Dubois, *et al.*, *Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology*. *J Leukoc Biol*, 2001. **69**(6): p. 851-9.
341. Leppert, D., E. Waubant, R. Galaray, N.W. Bunnett, and S.L. Hauser, *T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration in vitro*. *J Immunol*, 1995. **154**(9): p. 4379-89.
342. Delclaux, C., C. Delacourt, M.P. D'Ortho, *et al.*, *Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1996. **14**(3): p. 288-95.
343. Okada, S., H. Kita, T.J. George, G.J. Gleich, and K.M. Leiferman, *Migration of eosinophils through basement membrane components in vitro: role of matrix metalloproteinase-9*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1997. **17**(4): p. 519-28.
344. Betsuyaku, T., Y. Fukuda, W.C. Parks, J.M. Shipley, and R.M. Senior, *Gelatinase B is required for alveolar bronchiolization after intratracheal bleomycin*. *Am J Pathol*, 2000. **157**(2): p. 525-35.
345. Legrand, C., C. Gilles, J.M. Zahm, *et al.*, *Airway epithelial cell migration dynamics. MMP-9 role in cell-extracellular matrix remodeling*. *J Cell Biol*, 1999. **146**(2): p. 517-29.
346. Abecassis, I., B. Olofsson, M. Schmid, G. Zalzman, and A. Karniguian, *RhoA induces MMP-9 expression at CD44 lamellipodial focal complexes and promotes HMEC-1 cell invasion*. *Exp Cell Res*, 2003. **291**(2): p. 363-76.
347. Spessotto, P., F.M. Rossi, M. Degan, *et al.*, *Hyaluronan-CD44 interaction hampers migration of osteoclast-like cells by down-regulating MMP-9*. *J Cell Biol*, 2002. **158**(6): p. 1133-44.
348. Bjorklund, M. and E. Koivunen, *Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells*. *Biochim Biophys Acta*, 2005. **1755**(1): p. 37-69.
349. Bergers, G., R. Brekken, G. McMahon, *et al.*, *Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis*. *Nat Cell Biol*, 2000. **2**(10): p. 737-44.

350. Lee, S., S.M. Jilani, G.V. Nikolova, D. Carpizo, and M.L. Iruela-Arispe, *Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors*. J Cell Biol, 2005. **169**(4): p. 681-91.
351. Heissig, B., S. Rafii, H. Akiyama, *et al.*, *Low-dose irradiation promotes tissue revascularization through VEGF release from mast cells and MMP-9-mediated progenitor cell mobilization*. J Exp Med, 2005. **202**(6): p. 739-50.
352. Johnson, C., H.J. Sung, S.M. Lessner, M.E. Fini, and Z.S. Galis, *Matrix metalloproteinase-9 is required for adequate angiogenic revascularization of ischemic tissues: potential role in capillary branching*. Circ Res, 2004. **94**(2): p. 262-8.
353. Bernhard, E.J., S.B. Gruber, and R.J. Muschel, *Direct evidence linking expression of matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/collagenase) to the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(10): p. 4293-7.
354. Hua, J. and R.J. Muschel, *Inhibition of matrix metalloproteinase 9 expression by a ribozyme blocks metastasis in a rat sarcoma model system*. Cancer Res, 1996. **56**(22): p. 5279-84.
355. Sehgal, G., J. Hua, E.J. Bernhard, *et al.*, *Requirement for matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) expression in metastasis by murine prostate carcinoma*. Am J Pathol, 1998. **152**(2): p. 591-6.
356. Kondraganti, S., S. Mohanam, S.K. Chintala, *et al.*, *Selective suppression of matrix metalloproteinase-9 in human glioblastoma cells by antisense gene transfer impairs glioblastoma cell invasion*. Cancer Res, 2000. **60**(24): p. 6851-5.
357. Sanceau, J., S. Truchet, and B. Bauvois, *Matrix metalloproteinase-9 silencing by RNA interference triggers the migratory-adhesive switch in Ewing's sarcoma cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(38): p. 36537-46.
358. Fiore, E., C. Fusco, P. Romero, and I. Stamenkovic, *Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9/gelatinase B) proteolytically cleaves ICAM-1 and participates in tumor cell resistance to natural killer cell-mediated cytotoxicity*. Oncogene, 2002. **21**(34): p. 5213-23.
359. Itoh, T., M. Tanioka, H. Matsuda, *et al.*, *Experimental metastasis is suppressed in MMP-9-deficient mice*. Clin Exp Metastasis, 1999. **17**(2): p. 177-81.
360. Coussens, L.M., C.L. Tinkle, D. Hanahan, and Z. Werb, *MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis*. Cell, 2000. **103**(3): p. 481-90.
361. Gorden, D.L., B. Fingleton, H.C. Crawford, *et al.*, *Resident stromal cell-derived MMP-9 promotes the growth of colorectal metastases in the liver microenvironment*. Int J Cancer, 2007. **121**(3): p. 495-500.
362. van Kempen, L.C., J.S. Rhee, K. Dehne, *et al.*, *Epithelial carcinogenesis: dynamic interplay between neoplastic cells and their microenvironment*. Differentiation, 2002. **70**(9-10): p. 610-23.
363. Giraudo, E., M. Inoue, and D. Hanahan, *An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis*. J Clin Invest, 2004. **114**(5): p. 623-33.

364. Huang, S., M. Van Arsdall, S. Tedjarati, *et al.*, *Contributions of stromal metalloproteinase-9 to angiogenesis and growth of human ovarian carcinoma in mice*. J Natl Cancer Inst, 2002. **94**(15): p. 1134-42.
365. Chantrain, C.F., H. Shimada, S. Jodele, *et al.*, *Stromal matrix metalloproteinase-9 regulates the vascular architecture in neuroblastoma by promoting pericyte recruitment*. Cancer Res, 2004. **64**(5): p. 1675-86.
366. Kossakowska, A.E., S.J. Urbanski, S.A. Huchcroft, and D.R. Edwards, *Relationship between the clinical aggressiveness of large cell immunoblastic lymphomas and expression of 92 kDa gelatinase (type IV collagenase) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) RNAs*. Oncol Res, 1992. **4**(6): p. 233-40.
367. Stetler-Stevenson, M., A. Mansoor, M. Lim, *et al.*, *Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in reactive and neoplastic lymphoid cells*. Blood, 1997. **89**(5): p. 1708-15.
368. Barille, S., C. Akhoundi, M. Collette, *et al.*, *Metalloproteinases in multiple myeloma: production of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), activation of proMMP-2, and induction of MMP-1 by myeloma cells*. Blood, 1997. **90**(4): p. 1649-55.
369. Aoudjit, F., P.O. Esteve, M. Desrosiers, E.F. Potworowski, and Y. St-Pierre, *Gelatinase B (MMP-9) production and expression by stromal cells in the normal and adult thymus and experimental thymic lymphoma*. Int J Cancer, 1997. **71**(1): p. 71-8.
370. Mori, N., H. Sato, T. Hayashibara, *et al.*, *Human T-cell leukemia virus type I Tax transactivates the matrix metalloproteinase-9 gene: potential role in mediating adult T-cell leukemia invasiveness*. Blood, 2002. **99**(4): p. 1341-9.
371. Bird, A., *DNA methylation patterns and epigenetic memory*. Genes Dev, 2002. **16**(1): p. 6-21.
372. Ehrlich, M., M.A. Gama-Sosa, L.H. Huang, *et al.*, *Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells*. Nucleic Acids Res, 1982. **10**(8): p. 2709-21.
373. Gardiner-Garden, M. and M. Frommer, *CpG islands in vertebrate genomes*. J Mol Biol, 1987. **196**(2): p. 261-82.
374. Galm, O., J.G. Herman, and S.B. Baylin, *The fundamental role of epigenetics in hematopoietic malignancies*. Blood Rev, 2006. **20**(1): p. 1-13.
375. Siedlecki, P. and P. Zielenkiewicz, *Mammalian DNA methyltransferases*. Acta Biochim Pol, 2006. **53**(2): p. 245-56.
376. Freitag, M. and E.U. Selker, *Controlling DNA methylation: many roads to one modification*. Curr Opin Genet Dev, 2005. **15**(2): p. 191-9.
377. Yoder, J.A., N.S. Soman, G.L. Verdine, and T.H. Bestor, *DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe*. J Mol Biol, 1997. **270**(3): p. 385-95.
378. Lei, H., S.P. Oh, M. Okano, *et al.*, *De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells*. Development, 1996. **122**(10): p. 3195-205.

379. Jackson-Grusby, L., C. Beard, R. Possemato, *et al.*, *Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation*. *Nat Genet*, 2001. **27**(1): p. 31-9.
380. Binizskiewicz, D., J. Gribnau, B. Ramsahoye, *et al.*, *Dnmt1 overexpression causes genomic hypermethylation, loss of imprinting, and embryonic lethality*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(7): p. 2124-35.
381. Liang, G., M.F. Chan, Y. Tomigahara, *et al.*, *Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(2): p. 480-91.
382. Okano, M., S. Xie, and E. Li, *Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells*. *Nucleic Acids Res*, 1998. **26**(11): p. 2536-40.
383. Rhee, I., K.E. Bachman, B.H. Park, *et al.*, *DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells*. *Nature*, 2002. **416**(6880): p. 552-6.
384. Rhee, I., K.W. Jair, R.W. Yen, *et al.*, *CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1*. *Nature*, 2000. **404**(6781): p. 1003-7.
385. Bourc'his, D., G.L. Xu, C.S. Lin, B. Bollman, and T.H. Bestor, *Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints*. *Science*, 2001. **294**(5551): p. 2536-9.
386. Hata, K., M. Okano, H. Lei, and E. Li, *Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice*. *Development*, 2002. **129**(8): p. 1983-93.
387. Klose, R.J. and A.P. Bird, *Genomic DNA methylation: the mark and its mediators*. *Trends Biochem Sci*, 2006. **31**(2): p. 89-97.
388. Watt, F. and P.L. Molloy, *Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter*. *Genes Dev*, 1988. **2**(9): p. 1136-43.
389. Nan, X., F.J. Campoy, and A. Bird, *MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin*. *Cell*, 1997. **88**(4): p. 471-81.
390. Nan, X., H.H. Ng, C.A. Johnson, *et al.*, *Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex*. *Nature*, 1998. **393**(6683): p. 386-9.
391. Jones, P.A. and P.W. Laird, *Cancer epigenetics comes of age*. *Nat Genet*, 1999. **21**(2): p. 163-7.
392. Fuks, F., W.A. Burgers, A. Brehm, L. Hughes-Davies, and T. Kouzarides, *DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity*. *Nat Genet*, 2000. **24**(1): p. 88-91.
393. Fuks, F., W.A. Burgers, N. Godin, M. Kasai, and T. Kouzarides, *Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription*. *Embo J*, 2001. **20**(10): p. 2536-44.
394. Geiman, T.M., U.T. Sankpal, A.K. Robertson, *et al.*, *DNMT3B interacts with hSNF2H chromatin remodeling enzyme, HDACs 1 and 2, and components of the histone methylation system*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **318**(2): p. 544-55.
395. Robertson, K.D. and A.P. Wolffe, *DNA methylation in health and disease*. *Nat Rev Genet*, 2000. **1**(1): p. 11-9.

396. Lorincz, M.C., D.R. Dickerson, M. Schmitt, and M. Groudine, *Intragenic DNA methylation alters chromatin structure and elongation efficiency in mammalian cells*. Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(11): p. 1068-75.
397. Egger, G., G. Liang, A. Aparicio, and P.A. Jones, *Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy*. Nature, 2004. **429**(6990): p. 457-63.
398. Feinberg, A.P. and B. Vogelstein, *Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts*. Nature, 1983. **301**(5895): p. 89-92.
399. Gama-Sosa, M.A., V.A. Slagel, R.W. Trewyn, et al., *The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors*. Nucleic Acids Res, 1983. **11**(19): p. 6883-94.
400. Dodge, J.E., M. Okano, F. Dick, et al., *Inactivation of Dnmt3b in mouse embryonic fibroblasts results in DNA hypomethylation, chromosomal instability, and spontaneous immortalization*. J Biol Chem, 2005. **280**(18): p. 17986-91.
401. Eden, A., F. Gaudet, A. Waghmare, and R. Jaenisch, *Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation*. Science, 2003. **300**(5618): p. 455.
402. Gaudet, F., J.G. Hodgson, A. Eden, et al., *Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation*. Science, 2003. **300**(5618): p. 489-92.
403. Strichman-Almashanu, L.Z., R.S. Lee, P.O. Onyango, et al., *A genome-wide screen for normally methylated human CpG islands that can identify novel imprinted genes*. Genome Res, 2002. **12**(4): p. 543-54.
404. Vachtenheim, J., I. Horakova, and H. Novotna, *Hypomethylation of CCGG sites in the 3' region of H-ras protooncogene is frequent and is associated with H-ras allele loss in non-small cell lung cancer*. Cancer Res, 1994. **54**(5): p. 1145-8.
405. Nishigaki, M., K. Aoyagi, I. Danjoh, et al., *Discovery of aberrant expression of R-RAS by cancer-linked DNA hypomethylation in gastric cancer using microarrays*. Cancer Res, 2005. **65**(6): p. 2115-24.
406. Cho, B., H. Lee, S. Jeong, et al., *Promoter hypomethylation of a novel cancer/testis antigen gene CAGE is correlated with its aberrant expression and is seen in premalignant stage of gastric carcinoma*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **307**(1): p. 52-63.
407. Lorient, A., E. De Plaen, T. Boon, and C. De Smet, *Transient down-regulation of DNMT1 methyltransferase leads to activation and stable hypomethylation of MAGE-A1 in melanoma cells*. J Biol Chem, 2006. **281**(15): p. 10118-26.
408. Oshimo, Y., H. Nakayama, R. Ito, et al., *Promoter methylation of cyclin D2 gene in gastric carcinoma*. Int J Oncol, 2003. **23**(6): p. 1663-70.
409. Sato, N., N. Fukushima, H. Matsubayashi, and M. Goggins, *Identification of maspin and S100P as novel hypomethylation targets in pancreatic cancer using global gene expression profiling*. Oncogene, 2004. **23**(8): p. 1531-8.
410. Wang, Q., M. Williamson, S. Bott, et al., *Hypomethylation of WNT5A, CRIP1 and S100P in prostate cancer*. Oncogene, 2007.
411. Cho, M., K. Grabmaier, Y. Kitahori, et al., *Activation of the MN/CA9 gene is associated with hypomethylation in human renal cell carcinoma cell lines*. Mol Carcinog, 2000. **27**(3): p. 184-9.

412. Nakamura, N. and K. Takenaga, *Hypomethylation of the metastasis-associated S100A4 gene correlates with gene activation in human colon adenocarcinoma cell lines*. Clin Exp Metastasis, 1998. **16**(5): p. 471-9.
413. Nakayama, M., M. Wada, T. Harada, *et al.*, *Hypomethylation status of CpG sites at the promoter region and overexpression of the human MDR1 gene in acute myeloid leukemias*. Blood, 1998. **92**(11): p. 4296-307.
414. Chekhun, V.F., G.I. Kulik, O.V. Yurchenko, *et al.*, *Role of DNA hypomethylation in the development of the resistance to doxorubicin in human MCF-7 breast adenocarcinoma cells*. Cancer Lett, 2006. **231**(1): p. 87-93.
415. Ohtani-Fujita, N., T. Fujita, A. Aoike, *et al.*, *CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumor-suppressor gene*. Oncogene, 1993. **8**(4): p. 1063-7.
416. Merlo, A., J.G. Herman, L. Mao, *et al.*, *5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers*. Nat Med, 1995. **1**(7): p. 686-92.
417. Herman, J.G., F. Latif, Y. Weng, *et al.*, *Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(21): p. 9700-4.
418. Cunningham, J.M., E.R. Christensen, D.J. Tester, *et al.*, *Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability*. Cancer Res, 1998. **58**(15): p. 3455-60.
419. Veigl, M.L., L. Kasturi, J. Olechnowicz, *et al.*, *Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(15): p. 8698-702.
420. Graff, J.R., J.G. Herman, R.G. Lapidus, *et al.*, *E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas*. Cancer Res, 1995. **55**(22): p. 5195-9.
421. Suzuki, H., D.N. Watkins, K.W. Jair, *et al.*, *Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer*. Nat Genet, 2004. **36**(4): p. 417-22.
422. Baylin, S.B. and J.E. Ohm, *Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction?* Nat Rev Cancer, 2006. **6**(2): p. 107-16.
423. Ting, A.H., K.M. McGarvey, and S.B. Baylin, *The cancer epigenome--components and functional correlates*. Genes Dev, 2006. **20**(23): p. 3215-31.
424. McQuibban, G.A., G.S. Butler, J.H. Gong, *et al.*, *Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1*. J Biol Chem, 2001. **276**(47): p. 43503-8.
425. Mitsiades, C.S., S.P. Treon, N. Mitsiades, *et al.*, *TRAIL/Apo2L ligand selectively induces apoptosis and overcomes drug resistance in multiple myeloma: therapeutic applications*. Blood, 2001. **98**(3): p. 795-804.
426. Heppner, G.H., F.R. Miller, and P.M. Shekhar, *Nontransgenic models of breast cancer*. Breast Cancer Res, 2000. **2**(5): p. 331-4.
427. Barsky, S.H. and N.J. Karlin, *Myoepithelial cells: autocrine and paracrine suppressors of breast cancer progression*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2005. **10**(3): p. 249-60.

428. Yaziji, H., A.M. Gown, and N. Sneige, *Detection of stromal invasion in breast cancer: the myoepithelial markers*. *Adv Anat Pathol*, 2000. **7**(2): p. 100-9.
429. Sato, N., N. Maehara, G.H. Su, and M. Goggins, *Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on matrix metalloproteinase expression and pancreatic cancer cell invasiveness*. *J Natl Cancer Inst*, 2003. **95**(4): p. 327-30.
430. Roach, H.I., N. Yamada, K.S. Cheung, *et al.*, *Association between the abnormal expression of matrix-degrading enzymes by human osteoarthritic chondrocytes and demethylation of specific CpG sites in the promoter regions*. *Arthritis Rheum*, 2005. **52**(10): p. 3110-24.
431. Chicoine, E., P.O. Esteve, O. Robledo, *et al.*, *Evidence for the role of promoter methylation in the regulation of MMP-9 gene expression*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **297**(4): p. 765-72.
432. Hoffmann, M.J. and W.A. Schulz, *Causes and consequences of DNA hypomethylation in human cancer*. *Biochem Cell Biol*, 2005. **83**(3): p. 296-321.
433. Graff, J.R., E. Gabrielson, H. Fujii, S.B. Baylin, and J.G. Herman, *Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(4): p. 2727-32.
434. Jie, G., S. Zhixiang, S. Lei, L. Hesheng, and T. Xiaojun, *Relationship between expression and methylation status of p16(INK4a) and the proliferative activity of different areas' tumour cells in human colorectal cancer*. *Int J Clin Pract*, 2007. **61**(9): p. 1523-9.
435. Feuerstein, N., R. Firestein, N. Aiyar, *et al.*, *Late induction of CREB/ATF binding and a concomitant increase in cAMP levels in T and B lymphocytes stimulated via the antigen receptor*. *J Immunol*, 1996. **156**(12): p. 4582-93.
436. Apweiler, R., H. Hermjakob, and N. Sharon, *On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database*. *Biochim Biophys Acta*, 1999. **1473**(1): p. 4-8.
437. Toth, M., P. Osenkowski, D. Heseck, *et al.*, *Cleavage at the stem region releases an active ectodomain of the membrane type 1 matrix metalloproteinase*. *Biochem J*, 2005. **387**(Pt 2): p. 497-506.
438. Dean, R.A. and C.M. Overall, *Proteomics discovery of metalloproteinase substrates in the cellular context by iTRAQ labeling reveals a diverse MMP-2 substrate degradome*. *Mol Cell Proteomics*, 2007. **6**(4): p. 611-23.
439. Mattu, T.S., L. Royle, J. Langridge, *et al.*, *O-glycan analysis of natural human neutrophil gelatinase B using a combination of normal phase-HPLC and online tandem mass spectrometry: implications for the domain organization of the enzyme*. *Biochemistry*, 2000. **39**(51): p. 15695-704.
440. Rudd, P.M., T.S. Mattu, S. Masure, *et al.*, *Glycosylation of natural human neutrophil gelatinase B and neutrophil gelatinase B-associated lipocalin*. *Biochemistry*, 1999. **38**(42): p. 13937-50.
441. Ogata, Y., J.J. Enghild, and H. Nagase, *Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(6): p. 3581-4.

442. Farahani, R., W.G. Fong, R.G. Korneluk, and A.E. MacKenzie, *Genomic organization and primary characterization of miap-3: the murine homologue of human X-linked IAP*. *Genomics*, 1997. **42**(3): p. 514-8.
443. Deveraux, Q.L., R. Takahashi, G.S. Salvesen, and J.C. Reed, *X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases*. *Nature*, 1997. **388**(6639): p. 300-4.
444. Srinivasula, S.M., R. Hegde, A. Saleh, *et al.*, *A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis*. *Nature*, 2001. **410**(6824): p. 112-6.
445. Cummins, J.M., M. Kohli, C. Rago, *et al.*, *X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) is a nonredundant modulator of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis in human cancer cells*. *Cancer Res*, 2004. **64**(9): p. 3006-8.
446. Zhao, G. and X. Wang, *Advance in antitumor agents targeting glutathione-S-transferase*. *Curr Med Chem*, 2006. **13**(12): p. 1461-71.
447. Keyes, K.A., L. Mann, B. Teicher, and E. Alvarez, *Site-dependent angiogenic cytokine production in human tumor xenografts*. *Cytokine*, 2003. **21**(2): p. 98-104.
448. Terabe, M., J.M. Park, and J.A. Berzofsky, *Role of IL-13 in regulation of anti-tumor immunity and tumor growth*. *Cancer Immunol Immunother*, 2004. **53**(2): p. 79-85.
449. Gross, S. and D. Piwnica-Worms, *Spying on cancer: molecular imaging in vivo with genetically encoded reporters*. *Cancer Cell*, 2005. **7**(1): p. 5-15.
450. Edinger, M., Y.A. Cao, Y.S. Hornig, *et al.*, *Advancing animal models of neoplasia through in vivo bioluminescence imaging*. *Eur J Cancer*, 2002. **38**(16): p. 2128-36.
451. Wang, W. and W.S. El-Deiry, *Bioluminescent molecular imaging of endogenous and exogenous p53-mediated transcription in vitro and in vivo using an HCT116 human colon carcinoma xenograft model*. *Cancer Biol Ther*, 2003. **2**(2): p. 196-202.
452. Jenkins, D.E., Y. Oei, Y.S. Hornig, *et al.*, *Bioluminescent imaging (BLI) to improve and refine traditional murine models of tumor growth and metastasis*. *Clin Exp Metastasis*, 2003. **20**(8): p. 733-44.
453. Cumpstey, I., S. Carlsson, H. Leffler, and U.J. Nilsson, *Synthesis of a phenyl thio-beta-D-galactopyranoside library from 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene: discovery of efficient and selective monosaccharide inhibitors of galectin-7*. *Org Biomol Chem*, 2005. **3**(10): p. 1922-32.
454. Salameh, B.A., A. Sundin, H. Leffler, and U.J. Nilsson, *Thioureido N-acetyllactosamine derivatives as potent galectin-7 and 9N inhibitors*. *Bioorg Med Chem*, 2006. **14**(4): p. 1215-20.
455. Herranz, M., J. Martin-Caballero, M.F. Fraga, *et al.*, *The novel DNA methylation inhibitor zebularine is effective against the development of murine T-cell lymphoma*. *Blood*, 2006. **107**(3): p. 1174-7.
456. Ingrassia, L., I. Camby, F. Lefranc, *et al.*, *Anti-galectin compounds as potential anti-cancer drugs*. *Curr Med Chem*, 2006. **13**(29): p. 3513-27.

## LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

### PUBLICATIONS:

ROY J.S., VAN THEMSCHE C., **DEMERS M.**, OPDENAKKER G., ARNOLD B. AND ST-PIERRE Y. Triggering of T cell leukemia and dissemination T cell lymphoma in MMP-9-deficient mice. *Leukemia*. In Press.

**DEMERS M.**, BIRON-PAIN K., HEBERT J., LAMARRE A., MAGNALDO T. AND ST-PIERRE Y. 2007. Galectin-7 in lymphoma: elevated expression in human lymphoid malignancies and decreased lymphoma dissemination by antisense strategies in experimental model. *Cancer res.* 67(6): 2824-2829.

COUILLARD J., **DEMERS M.** AND ST-PIERRE Y. 2006. The role of DNA hypomethylation in the control of stromelysin gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342 (4): 1233-9.

**DEMERS, M.**, COUILLARD, J., BÉLANGER, S., ST-PIERRE, Y. 2005. Role of Metalloproteinases in Tumor Metastasis. *Crit. Review in Immunology.* 25(6):493-523.

**DEMERS, M.**, and ST-PIERRE, Y. 2005. La galectine-7: un nouveau gene associé au pouvoir métastatique [Galectin-7: a novel gene associated with metastasis]. *Med Sci (Paris).* 21(10):790-2.

**DEMERS, M.**, MAGNALDO, T., and ST-PIERRE, Y. 2005. A novel function for galectin-7: promoting tumorigenesis by up-regulating MMP-9 gene expression. *Cancer Res.* 65(12):5205-10.

MOISAN, S., **DEMERS, M.**, MERCIER, J., MAGNALDO, T., POTWOROWSKI, E. F. ST-PIERRE Y. 2003. Upregulation of galectin-7 in murine lymphoma cells is associated with progression toward an aggressive phenotype. *Leukemia* 17(4); 751-759.

### COMMUNICATIONS:

**DEMERS, M.**, BIRON-PAIN, K., MAGNALDO, T. and ST-PIERRE, Y. Galectin-7 plays a central role in tumorigenesis. [AACR abstract]. The 4<sup>th</sup> International Conference on Tumor Microenvironment, Progression, Therapy and Prevention. Florence, Italy, March 6-10<sup>th</sup>, 2007.

**DEMERS, M.**, VAN TEMSCHE, C., AOUDJIT, F., and ST-PIERRE, Y. The peritumoral environment dictates the role of galectin-7 in cancer. [AACR abstract].

Proceedings of the AACR spec. conf. Cancer, Proteases, and the tumor microenvironment. November 2005: Abstract A63. Bonita Spring, Florida.

COUILLARD, J., **DEMERS, M.**, and ST-PIERRE, Y. DNA methylation controls Stromelysin-1 expression in colon carcinoma cells. [AACR abstract]. Proceedings of the AACR spec. conf. Cancer, Proteases, and the tumor microenvironment. November 2005: Abstract B53. Bonita Spring, Florida.

**DEMERS, M.**, MOISAN, S., MAGNALDO, T. and ST-PIERRE, Y. 2003. Galectin-7, an attractive target for antitumoral therapy against lymphoma. Proceedings of the ATGQ. October 2003. Montreal, Canada.

**DEMERS, M.**, MOISAN, S., MAGNALDO, T. and ST-PIERRE, Y. 2003. Expression of galectin-7 in aggressive lymphomas. [AACR abstract]. Proceedings of the AACR. Vol. 44, July 2003: Abstract 365. Washington, D.C.

MOISAN, S., **DEMERS, M.**, MERCIER, J., MAGNALDO, T., ALAIN, T., KOSSAKOWSKA, A. E., POTWOROWSKI, E. F. ST-PIERRE Y. 2001. Galectin-7 et le lymphome: une relation agressive... [Proceeding of the Congrès INRS-Institut Armand-Frappier abstract]. Congrès INRS-Institut Armand-Frappier. November 2001, Abstract #3. Québec.

MOISAN, S., **DEMERS, M.**, MERCIER, J., MAGNALDO, T., ALAIN, T., KOSSAKOWSKA, A. E., POTWOROWSKI, E. F. ST-PIERRE Y. 2001. Galectin-7 overexpression correlates with increased aggressiveness of mouse lymphoma cells. [AACR abstract]. Proceedings of the AACR. Vol. 42, March 2001: Abstract 2766. New Orleans, LA.