INRS-INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

RÔLE DE LA GALECTINE-7 DANS LES MÉLANOMES ET LIEN AVEC MMP-9 DANS LA RELATION HÔTE-TUMEUR.

Par

KATHERINE BIRON-PAIN

THÈSE PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

PHILOSOPHIAE DOCTOR (PH.D)

JURY D'ÉVALUATION

PRÉSIDENT DU JURY : DR. THOMAS SANDERSON

EXAMINATEURS EXTERNES : DR. BENOIT BARBEAU ET DR. BORHANE ANNABI

DIRECTEUR DE RECHERCHE : DR. YVES ST-PIERRE

® DROITS RÉSERVÉS DE KATHERINE BIRON-PAIN, 2013

i

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je remercie mon directeur de recherche, le Dr. Yves St-Pierre, pour m'avoir donné la chance de participer à la recherche contre le cancer dans son laboratoire. Merci pour tout le support et la confiance que tu m'as accordé durant toutes ces années. De plus, j'apprécie beaucoup le fait d'avoir appris une multitude de techniques dans le cadre de mon projet.

Je remercie aussi les étudiant(e)s anciens et actuels du laboratoire. J'ai beaucoup apprécié vos bons conseils autant scientifiques que personnels et notre bon travail d'équipe. De plus, je remercie particulièrement Mélanie Demers qui m'a dirigé au début de ma maîtrise et m'a appris plusieurs techniques de biologie moléculaire.

Je dis aussi un gros merci à Diane Tremblay, la technicienne du laboratoire, qui a pris sa retraite récemment. J'ai apprécié ta patience, ta générosité et ta bonne humeur. Avec toi, les expériences à l'animalerie étaient beaucoup plus agréables.

Merci aux étudiants, professeurs et techniciens de l'INRS- Institut Armand-Frappier pour les échanges qu'on a eus et la formation offerte par le programme de doctorat.

Je remercie les évaluateurs de ma thèse pour leurs commentaires constructifs. Je remercie également le Dr. Thomas Sanderson pour nous avoir permis d'utiliser le système d'imagerie IVIS subventionné par la Fondation Canadienne de l'Innovation. Cet outil a joué un rôle crucial dans la production de cette thèse et dans les publications qui ont résulté de ces travaux.

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

Merci à M. Paquin, mon patron actuel au laboratoire Certilab, pour son soutient lors de la rédaction de ma thèse.

Finalement, je remercie ma famille et mes amis qui ont toujours su avoir le bon mot pour m'encourager et me soutenir. Je sais que vous serez toujours là pour moi.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES TABLEAUX	x
LISTE DES ANNEXES	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xii
RÉSUMÉ GÉNÉRAL	xiv
CONTRIBUTION DES AUTEURS	xvi

CHAPITRE 1

Revue de littérature

1.	Galectin	es
1.	1. Struc	eture et distribution
	1.1.	1. La famille des galectines divisée en trois sous-types
	1.1.	2. Sécrétion des galectines
	1.1.	3. Distribution tissulaire
1.	2. Régi	llation de l'expression6
	1.2.	1. Éléments transcriptionnels impliqués dans l'expression de galectine-1 6
	1.2.	2. Éléments transcriptionnels impliqués dans l'expression de galectine-38
	1.2.	3. Éléments transcriptionnels impliqués dans l'expression des autres
		galectines9
1.	3. Fonc	tions
	1.3.	1. Intracellulaire
		1.3.1.1. Cycle cellulaire et régulation de gènes 11
		1.3.1.2. Apoptose
		1.3.1.3. Rôle dans l'épissage alternatif 13
		1.3.1.4. Autres fonctions des galectines 14

	1.3.2. Extracellulaire	14
	1.3.2.1. Adhésion	14
	1.3.2.2. Migration	17
	1.3.2.3. Inflammation et système immunitaire	18
	1.3.2.4. Apoptose	21
	1.3.2.5. Infection virale	23
	1.3.3. Implication dans le cancer	24
	1.3.3.1. Transformation néoplasique	25
	1.3.3.2. Métastasie	26
	1.3.3.3. Survie	29
	1.3.3.4. Invasion tumorale	30
	1.3.3.5. Échappement du système immunitaire	30
1.4.	Potentiel thérapeutique	31
	1.4.1. Ligands naturels	31
	1.4.2. Composés basés sur la structure	32
	1.4.3. Composés qui ciblent les interactions protéines-protéines	CRD-
	indépendantes	33
2. G	alectine-7	34
2.1.	Structure et distribution	34
2.2.	Régulation de l'expression	35
2.3.	Fonctions	38
	2.3.1. Migration cellulaire	38
	2.3.2. Prolifération	39
	2.3.3. Apoptose	39
	2.3.4. Interaction protéine-protéine	41

3. Ga	llectine-7 et cancer
3.1.	Propriétés anti-tumorales
3.2.	Propriétés pro-tumorales
3.3.	Lien avec MMP-9
4. M	étalloprotéase de la matrice-9 (MMP-9) 45
4.1.	Structure et distribution
4.2.	Régulation de l'expression 46
	4.2.1. Régulation transcriptionnelle 46
	4.2.1.1. Régulateurs de la transcription
	4.2.1.2. Voies de signalisation
	4.2.2. Régulation post-traductionnelle 50
	4.2.2.1. Activation de la protéine MMP-9 50
	4.2.2.2. Inhibiteurs 50
	4.2.2.3. Glycosylation
4.3.	Fonctions physiologiques
	4.3.1. Dégradation de la MEC et fonction pro-inflammatoire
	4.3.2. Chimiotaxie et migration
	4.3.3. Rôle dans le développement squelettique et l'angiogénèse 54
	4.3.4. Reproduction 54
4.4.	Fonctions pathologiques 54
4.5.	Implication dans le cancer
	4.5.1. Angiogénèse 55
	4.5.2. Invasion, migration, extravasation
	4.5.3. Système immunitaire
	4.5.4. Expression de MMP-9 par les cellules tumorales et stromales
	4.5.4.1. Expression par les cellules tumorales
	4.5.4.2. Expression par les cellules stromales
	4.5.5. MMP-9 dans le mélanome 60
5. Hy	pothèses et objectifs de recherche63

CHAPITRE 2

Article : Monitoring *mmp-9* gene expression in stromal cells using a novel transgenic mouse model.

1. Résumé	65
2. Abstract	67
3. Introduction	68
4. Material and Methods	69
5. Results	
6. Discussion	
7. Acknowledgements	
8. Figure legends	
9. Figures	
10. Conclusion	87

CHAPITRE 3

Article : Expression and functions of galectin-7 in human and murine melanomas.

1. Résumé	89
2. Abstract	
3. Introduction	
4. Material and Methods	
5. Results	
6. Discussion	100
7. Acknowledgements	101
8. Figure legends	102
9. Figures	104
10. Conclusion	113

Discussion générale et perspectives	3 1	114	4
-------------------------------------	-----	-----	---

Conclusion générale	130
ANNEXES	132
BIBLIOGRAPHIE	146
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	170

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTÉRATURE

Figure 1.1: Les 15 membres de la famille des galectines sont classés en trois sous-types
selon leur structure
Figure 1.2: Propriétés adhésives et anti-adhésives des galectines lors d'interaction
cellule-cellule ou cellule-matrice
Figure 1.3: Analyse in silico du promoteur de la galectine-7 murin et
humain
Figure 1.4: Structure de MMP-9 46
Figure 1.5: Sites de liaison pour les facteurs de transcription dans le promoteur du gène
<i>mmp-9</i> murin
Figure 1.6: Rôles des MMP au niveau de la métastasie

Figure 2.1: Generation of Tg mice containing the mmp-9 promoter-driven luciferase
reporter transgene
Figure 2.2: In vivo activation of the proMMP9-Luc transgene by LPS
Figure 2.3: Activation of the <i>proMMP9-Luc</i> transgene in the lung
Figure 2.4: Activation of the proMMP9-Luc transgene in the spleen of tumor-bearing
animals
Figure 2.5: In vitro stimulation of the proMMP9-Luc transgene in splenocytes
Figure 2.6: Effect of dexamethasone (DXM) on MMP-9 expression in paws

Figure	3.1: G	alectin-7 e	xpression in	human mela	anoi	na tissue	es	• • • • • • • • • • • •		. 104
Figure	3.2:	Increased	galectin-7	expression	in	B16F1	primary	tumors	and	lung
metastas	ses				•••••	•••••	•••••			105
Figure	3.3: V	alidation o	f B16F1 tra	nsfectants ov	/ere	xpressin	g luciferas	se and/or	galec	tin-7
•••••	•••••	•••••								. 106
Figure	3.4: E	ffect of gal	ectin-7 on H	B16F1 cell m	igra	tion		•••••		. 107
Figure	3.5: E	Effect of qu	uercetin on	B16F1 cells	ov	erexpres	sing gale	ctin-7 or	apop	otosis
and EG	R-1 ex	pression	•••••		••••				•••••	108
Figure	3.6: E	ffect of gal	ectin-7 in B	16F1 cells o	n su	rvival a	nd metasta	asis in lu	ngs	109

Figure supplémentaire S3.1: Expression of galectin-7 in murine and human melanoma
cell lines 110
Figure supplémentaire S3.2: Galectin-7 concentration in culture supernatant of B16F1
transfectants cells
Figure supplémentaire S3.3: Effect of galectin-7 on cellular proliferation of B16F1
melanoma cells

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTÉRATURE

Tableau 1.1: La galectine-7 a des fonctions pro- ou anti-tumorales dépendamment du	
type de cancer	4
Tableau 1.2: Facteurs qui régulent l'expression de MMP-9	1
Tableau 1.3: Substrats de MMP-9 5	3
Tableau 1.4: MMP-9 a des fonctions pro- ou anti-tumorales dépendamment du type d	e
cancer et de sa localisation	1

LISTE DES ANNEXES

Annexe A: Potential directions for drug development against galectin-7 in cancer 133
Annexe B : Induction de l'expression du gène galectine-7 dans les cellules B16F1 suite à
un traitement à la 5'-aza-Cdr
Annexe C : Effet de la surexpression de galectine-7 dans les cellules de mélanome sur
l'expression de MMP-9 dans les cellules péritumorales

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique ADNc : ADN complémentaire ARN : Acide ribonucléique ARNm : ARN messager

5'-aza-Cdr: 5'-aza-2'-deoxycytidine

B-myb: *Myb-related protein B*

C2GnT: N-acetylglucosaminyltransferase

CDDP: cis-diamminedichloroplatinum

C/EBPa : CCAAT/enhancer-binding protein a

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

COL1A : Collagène de type I

COX-2: Cyclooxygénase-2

CRD : Domaine de reconnaissance des hydrates de carbone

Cre: cyclic AMP-response element

EDG : endothelial differentiation gene

EGF : *Epithelial growth factor*

EGR-1: Early growth response protein 1

EMSA : electromobility shift assay

EZH2 : enhancer of zest homolog-2

FGF : fibroblast growth factor

Gal: Galectine

HIF : hypoxia inducible factor

IFN : interféron

IGF : insulin-like growth factor

IL : Interleukine

kDa: Kilodalton

Lac-L-Leu: Lactulosyl-L-Leucine

LAMP-1 : lysosomal-associated membrane protein

LPS: Lipopolysaccharide **MEC** : Matrice extracellulaire MerTK : c-mer proto-oncogene tyrosine kinase ml: Millilitre **mM:** Millimolaire MMP : Métalloprotéase de la matrice NG2 : neuron-glial antigen NK : Natural killer nM: Nanomolaire PAI-1 : inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 **PAR** : protease-activated receptor PARP-1: Poly [ADP-ribose] polymerase 1 PCM : pectine de citron modifiée PCR : réaction de polymérisation en chaîne PMA: Phorbol 12-myristate 13-acetate shRNA : short hairpin RNA TCR : récepteur antigénique des cellules T **TGF** : transforming growth factor Th : Cellule T auxiliaire **TIM** : *T* cell immunoglobulin mucin Treg : Cellule T régulatrice **TNF** : tumor necrosis factor Treg: Cellule T régulatrice **µg** : Microgramme **µl** : Microlitre **µM**: Micromolaire **VEGF**: Vascular endothelial growth factor

RÉSUMÉ GÉNÉRAL

La galectine-7 est une protéine surtout reconnue pour être exprimée au niveau des épithéliums stratifiés, dont l'épiderme de la peau. De façon surprenante, la galectine-7 est exprimée de façon anormalement élevée dans plusieurs types de cancer, comme le lymphome et le cancer du sein. Au contraire, son expression semble supprimée dans d'autres cancers, comme le cancer du colon. Ce rôle anti- ou pro-tumoral pourrait être relié à sa capacité à moduler de façon positive ou négative l'apoptose. D'autres études suggèrent que la galectine-7 pourrait moduler l'agressivité des cellules cancéreuses en augmentant l'expression de la métalloprotéase de la matrice (MMP)-9 dans les cellules tumorales et possiblement dans les cellules péritumorales. Les MMP sont des enzymes extracellulaires qui jouent un rôle important dans l'invasion tumorale. Elles peuvent être sécrétées à la fois par les cellules tumorales et les cellules péritumorales de l'hôte, notamment en réponse aux signaux émis par les cellules tumorales. La galectine-7 et MMP-9 semblent donc jouer un rôle clé dans la relation hôte-tumeur et dans la progression tumorale.

L'objectif général de mon projet de doctorat est d'étudier l'expression et les fonctions de la galectine-7 dans les mélanomes et le lien avec MMP-9 dans la relation hôte-tumeur. Mes travaux ont permis de démontrer que la galectine-7 ne semble pas exprimée dans les biopsies de mélanomes malins humains. Cependant, la galectine-7 est surexprimée dans les tumeurs primaires de mélanome murin B16F1 ainsi que dans les métastases aux poumons. Ceci suggère que la galectine-7 pourrait avoir un rôle à jouer dans la progression tumorale du mélanome. Nous avons développé des modèles cellulaires surexprimant la galectine-7 et/ou la luciférase, cette dernière facilitant la détection des métastases. Des expériences *in vitro* ont permis de démontrer que la surexpression de galectine-7 dans les cellules B16F1 diminue la motilité, augmente la résistance à l'apoptose et l'expression du gène *egr-1* dans les cellules de mélanome. Par contre, contrairement à d'autres types de cancer, comme le cancer du colon ou le lymphome, l'expression de la galectine-7 dans les cellules de mélanomes n'aurait aucune

xiv

influence sur la croissance de la tumeur ou son pouvoir invasif. De plus, la surexpression de galectine-7 dans les cellules B16F1 ne permet pas d'augmenter l'expression du gène *mmp-9* dans les cellules péritumorales. Ceci a été étudié grâce à un nouveau modèle de souris transgénique développé afin de faciliter la détection de l'expression du gène *mmp-9* dans les cellules de l'hôte, entre autre lors du développement d'un cancer. Ce modèle comprend le promoteur du gène *mmp-9* murin fusionné au gène rapporteur de luciférase.

Dans l'ensemble, ces résultats représentent une avancée sur nos connaissances des fonctions de la galectine-7 et démontre que la galectine-7 n'a pas une aussi grande importance au niveau de la progression tumorale dans les mélanomes que dans les autres types de cancers épithéliaux. D'autre part, même si notre modèle murin *proMMP-9-Luc* n'a pas démontré de relation entre l'expression de la galectine-7 dans les cellules tumorales et celle de *mmp-9* dans les cellules stromales, ce modèle reste d'une très grande utilité pour des études pré-cliniques, que ce soit pour tester des modulateurs pharmacologiques qui inhiberaient la surexpression de MMP-9 dans les cellules péritumorales ou pour tester si des facteurs de croissance, produits par les cellules tumorales, induisent l'expression du gène *mmp-9* dans les cellules péritumorales.

CONTRIBUTION DES AUTEURS

J'ai effectué tous mes travaux de thèse sous la direction du Dr. Yves St-Pierre. J'ai réalisé la majorité des expériences et participé à l'analyse et à l'interprétation des résultats. J'ai également rédigé les manuscrits décrits dans les chapitres 2 et 3.

Dans le deuxième chapitre, traitant d'un nouveau modèle murin développé afin d'étudier l'expression de MMP-9 dans les cellules stromales, j'ai effectué toutes les expériences et la rédaction du manuscrit sous la supervision du Dr. Yves St-Pierre.

Dans le troisième chapitre, étudiant la galectine-7 dans le mélanome, j'ai réalisé la majorité des expériences et la rédaction du manuscrit sous la supervision de Dr. Yves St-Pierre. Andrée-Anne Grosset, étudiante aux études supérieures dans le laboratoire du Dr. Yves St-Pierre, a réalisé l'imagerie par microscopie confocale de la galectine-7 dans les cellules de mélanome B16F1 transformées. La rédaction du manuscrit s'est faite conjointement avec le Dr. Françoise Poirier et le Dr. Louis Gaboury, ainsi que par la lecture critique de tous les intervenants.

CHAPITRE 1

Revue de littérature

1. Galectines.

Plusieurs études ont démontré que les galectines ont plusieurs fonctions, que ce soit dans le cancer, l'immunité, l'inflammation ou le développement (1,2). Ces protéines peuvent être impliquées dans différents processus biologiques dépendamment de leur localisation, puisqu'elles peuvent être sécrétées ou s'accumuler dans différents organelles intracellulaires, tels que le noyau ou les mitochondries. Les galectines sont définies comme des lectines de type S. Elles font parties de la classe des lectines puisqu'elles se lient avec plus ou moins de spécificité aux hydrates de carbone présents sur leurs ligands grâce à leur domaine CRD (*carbohydrate recognition domain*). De plus, elles ont un groupement thiol libre, ce qui les distingue des sélectines, une famille de lectine de type C. Jusqu'à maintenant, 15 protéines ont été identifiées comme faisant parties de la famille des galectines. Cependant, plusieurs aspects de ces galectines sont encore méconnus, comme la spécificité de leur récepteur, leur mécanisme de régulation et leurs rôles biologiques.

1.1. Structure et distribution.

Originalement, les galectines étaient connues sous le nom de β -galactoside binding animal lectins. C'est en 1994 que le groupe de Barondes a introduit le terme galectine afin de regrouper les lectines animales ayant une affinité pour les β -galactosides et une similarité de séquence dans le domaine de reconnaissance des hydrates de carbone (CRD) (3). La structure du CRD a été résolue par cristallographie de rayon X (4). Les 15 membres de la famille des galectines ont tous un CRD avec une séquence et une structure secondaire conservées qui forme un feuillet β en forme de sandwich d'environ 135 acides aminés. Les deux feuillets β sont légèrement voûtés avec six brins formant le côté concave et cinq brins formant le côté convexe. La structure quaternaire diffère entre les galectines (4-6). Le CRD permet aux galectines de lier les résidus β -galactoses des glycoconjugués.

1.1.1. La famille des galectines divisée en trois sous-types.

Les 15 membres de la famille des galectines chez les mammifères sont généralement classés selon leur structure (Figure 1.1). On peut les retrouver sous forme monomérique, dimérique ou oligomérique. Les galectines-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 et -15 font parties du groupe des prototypes et peuvent former des dimères. Par exemple, la galectine-1 se retrouve en dimère en solution, mais se dissocie spontanément sous forme monomérique à faible concentration (7,8). Lorsque la galectine-l se présente sous forme monomérique, son association à des hydrates de carbone est de plus faible affinité (9). Les galectines-4, -6, -8, -9 et -12 forment un deuxième groupe dont les protéines sont formées de deux domaines lectines en tandem situés en C- et N-terminal, reliés par une séquence peptidique de taille variable appelée peptide de liaison ou peptide linker. Le troisième groupe de galectines contient un seul membre, la galectine-3, qui est constituée d'un seul domaine lectine en position C-terminale, mais qui se distingue par une extrémité Nterminale plus longue qui peut être phosphorylée (10). La galectine-3 peut former des pentamères en se liant à des hydrates de carbone multivalents. Il a été démontré in vitro que le CRD et le domaine N-terminal sont impliqués dans la formation de multimères (11-14).

1.1.2. Sécrétion des galectines.

La majorité des galectines sont généralement localisées à l'intérieur de la cellule (cytoplasme, noyau ou autres organelles intracellulaires). Toutefois, certaines d'entre elles peuvent être sécrétées et se retrouver dans l'environnement extracellulaire. C'est le cas de la galectine-1 à qui on attribue des rôles intra- et extracellulaires (15). Cette sécrétion de galectine semble se produire par une voie non-classique, puisqu'elles ne possèdent pas de peptide-signal typique permettant son passage à travers le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (16,17). Selon certaines études, les galectines pourraient être transportées de façon directe, comme dans le cas du facteur de croissance des fibroblastes (*fibroblast growth factor-2*, FGF-2) (18), et ce à travers la membrane plasmique avec l'aide de protéines membranaires ou de facteurs cytosoliques encore inconnus (15). Alternativement, comme dans le cas de la galectine-3, elles pourraient être transportées par des exosomes dérivés de corps multivésiculaires (19).

1.1.3. Distribution tissulaire.

L'expression des galectines varie dépendamment du type cellulaire, du niveau de développement et de différentiation. Les galectines-1, -3, -4, -6 et -7 sont impliquées à des stades spécifiques du développement (20). La galectine-1 est exprimée tout au long du processus embryogénique, mais son expression est restreinte aux tissus d'origine mésodermiques. La galectine-3 est exprimée lors du processus de formation osseuse, alors que les galectines-4 et -6 sont exprimées lors de la morphogenèse intestinale (21). Par contre, les galectines ne sont pas essentielles à la survie, étant donné que l'ablation génétique des galectines chez la souris n'affecte pas significativement leur développement (20,22).

Chez l'adulte, la galectine-1 est exprimée dans les cellules B et T activées, l'épithélium olfactif, les ostéoblastes, les cellules des muscles lisses et squelettiques (23-27). La galectine-3 est exprimée dans les cellules du système immunitaire (cellules T activées, cellules T CD4+/CD25+, monocytes, macrophage et mastocyte), du système digestif, de la peau (kératinocytes), des poumons, de la rate, de l'estomac, du colon, de l'utérus, des ovaires et des ostéoblastes (28-34). Les galectines-1, -3 et -9 sont aussi exprimées dans les cellules de Langerhans (35). Les galectine-1 et -9 sont aussi fortement exprimées dans les cellules dendritiques myéloïdes périphériques (35). D'autres galectines ont un motif d'expression plus restreint. Par exemple, la galectine-4 est exprimée principalement par les neurones (36). La galectine-8 est surtout exprimée par les mégakaryocytes (cellules précurseurs de plaquettes) (37). La galectine-10 est exprimée dans les leucocytes (éosinophiles, basophiles et lymphocytes) (38,39), la galectine-12 dans les tissus adipeux et les cellules des glandes sébacées (40,41) et la galectine-14 dans les éosinophiles (42). De son côté, la galectine-15 est exprimée uniquement dans l'utérus des moutons et des chèvres (43). Ces patrons d'expression sont cependant fortement modulés dans des conditions pathologiques, comme un cancer. Ce sujet sera discuté dans les sections suivantes.

CHAPITRE 1

Figure 1.1: Les 15 membres de la famille des galectines sont généralement classés en trois sous-types selon leur structure. Ils ont au moins un domaine de reconnaissance des hydrates de carbone (CRD) et une affinité pour les β -galactosides.

Sous-type	Membres	Caractéristique	Structure
Proto-type	Galectine-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 et -15	l CRD	monomère dimère
Chimère	Galectine-3	région N- terminale non glycine connectée à un CRD	~~~
Tandem répété	Galectine-4, -6, -8, -9 et -12	2 CRD non identiques liés par une petite séquence polypeptidique	

1.2. Régulation de l'expression.

L'expression des galectines est hautement régulée et coordonnée lors du développement, de la différenciation et de différentes conditions physiologiques et pathologiques (44). Par exemple, lors de la différenciation placentaire, la diminution de la galectine-3 dans les trophoblastes corrèle avec le changement d'un phénotype prolifératif vers un phénotype migratoire (45). Nous allons aborder, dans cette section, les mécanismes transcriptionnels impliqués dans l'expression des galectines.

1.2.1. Éléments transcriptionnels impliqués dans l'expression de galectine-1.

Les études sur les mécanismes moléculaires qui régulent l'expression des galectines ont débuté avec la galectine-1. En 1995, il a été démontré, par transfections transitoires, que la séquence minimale pour l'activité du promoteur murin du gène codant pour la galectine-1 (lgals1) variait de -50/+50 relativement au site d'initiation de la transcription (46). Cependant, quelques années plus tard, l'équipe de De Gregorio a identifié un deuxième site d'initiation de la transcription situé à -31 nucléotides, régulant la transcription d'un autre ARNm codant pour la même protéine (47). Ce phénomène d'initiation de la transcription alternatif semble être régulé par le recoupement de l'élément initiateur (Inr) et de la boîte TATA. Le même groupe identifia aussi deux sites Sp1 localisés entre les nucléotides -50 et -60 et qui augmentent modérément l'activité transcriptionnelle, ce qui suggérait que d'autres éléments étaient impliqués dans la transcription basale. D'autres études ont ensuite démontré, à l'aide de plusieurs fragments du promoteur *lgals1*, que le site SpI à la position -57 était responsable de l'induction de la galectine-1 par l'acide butyrique (48). D'autre part, l'induction de la galectine-1 par l'acide rétinoïque impliquerait une région plus éloignée, soit entre -1578 et -1448 nucléotides (49). En 2007, une étude in silico du promoteur de lgals l a identifié plusieurs sites de liaison potentiels à des facteurs de transcription. Par exemple, on retrouve des sites de liaison aux facteurs de transcription suivants : AML-1, C/EBP α et β , GATA-3, MZF-1, PAX-2, PAX-6, SP1 (50). Il a été démontré que C/EBPa (CCAAT/enhancer-binding protein α) et HIF-1 (hypoxia inducible factor-1) augmentent en synergie l'expression transcriptionnelle de la galectine-1 (51). C/EBPa se lie à la séquence consensus GCAAT dans le promoteur de lgals l entre -48 et -42, alors que HIF-1 se lie à deux sites consensus

entre -441 et -423 (52), ce qui a été démontré par un ChIP-reChIP (51). Cette synergie entre ces deux facteurs de transcription a été démontrée dans la lignée cellulaire d'un carcinome gastrique (SGC7901). De plus, la suppression de la galectine-1 par des shRNA ou du lactose empêche la différenciation cellulaire de leucémie myéloïde aigue induite par ces facteurs de transcription, ce qui est restauré par l'ajout de galectine-1 recombinante (51). Une autre étude a démontré, par un essai d'immunoprécipitation de la chromatine, que NF-κB/p50 se lie sur une région du gène codant pour la galectine-1 sur la séquence taGGGActttccc située à la position +1185 (53). NF-κB contrôle donc l'expression de la galectine-1 qui à son tour régule négativement la signalisation de NF-κB. Ceci suggère que l'expression de galectine-1 dépendante de NF-κB dans les cellules T effectrices pourrait jouer un rôle dans l'atténuation de la réponse immunitaire et des processus autoimmunitaires (53).

La méthylation de l'ADN est aussi impliquée dans la régulation du gène de la galectine-1. L'extrémité 5' du promoteur (-499 à -614pb) est riche en GC (environ 60%) et est hyperméthylée sur plusieurs sites (54). De plus, le promoteur peut se replier en épingle à cheveux, ce qui peut aussi influencer la transcription (44,54). L'implication de la méthylation de l'ADN dans la régulation de la galectine-1 a été démontrée de plusieurs façons : avec un agent inhibiteur de méthylation (5'-aza-2'-deoxycytidine) (55), des enzymes sensibles à la méthylation ou des traitements au bisulfite (56-58) et des inhibiteurs d'histones déacétylases (reliées à la régulation épigénétique via la méthylation de l'ADN) (59).

1.2.2. Éléments transcriptionnels impliqués dans l'expression de galectine-3.

L'identification des mécanismes moléculaires qui régulent l'expression des galectines a largement profité des études sur la galectine-3. Le gène codant pour la galectine-3 (lgals3) humaine diffère légèrement du gène murin puisque les deux sites d'initiation de la transcription sont séparés par environ 30 nucléotides chez la souris, alors qu'ils sont séparés seulement par deux nucléotides chez l'humain (60,61). Chez la souris, cela mène à la transcription de deux ARNm distincts (60,62). La présence d'un promoteur à l'intérieur du deuxième intron du gène lgals3 produirait le transcrit alternatif galig (galectin-3 internal gene) (63,64). Chez le rat, il a été démontré que la séquence minimale pour l'activité du promoteur de *lgals3* variait de -161/+40 relativement au site d'initiation de la transcription (65). Le promoteur de *lgals3*, humain et murin, ne contient pas de boîte TATA en amont du site d'initiation de la transcription. Il contient des sites de liaison pour les facteurs de transcription suivants : Sp1, AP-1 et Pur β (liaison aux éléments riches en purine) (65). De plus, il y a des sites de liaisons pour les éléments de réponse à l'AMP cyclique (CRE), des sites ressemblant aux sites de liaison pour le facteur de transcription NF-κB et un élément cis-inductible (60-62). D'ailleurs, l'AMP cyclique et NF-κB semblent impliqués dans l'augmentation rapide de l'expression de la galectine-3 suite à une stimulation au sérum (61). De plus, l'implication de NF- κ B dans la régulation de l'expression de la galectine-3 a été confirmée suite à un stress chez les macrophages (66,67) et dans un modèle de cancer du sein où l'inhibition de NF- κ B par le DHMEO inhibe l'expression de la galectine-3 et l'adhésion cellulaire (68). Toutefois, lorsque des cellules T sont infectées par le virus T lymphotropique humain de type 1 (HTLV-1), l'activation de l'expression de la galectine-3 par la protéine Tax est indépendante des voies impliquant l'AMP cyclique et NF-KB (69). D'un autre côté, les facteurs de transcription RUNX1 et RUNX2 jouent aussi un rôle dans la régulation du gène lgals3 (30,70). La liaison directe de ces facteurs de transcription à des séquences spécifiques du promoteur permet la surexpression de ce gène dans les tumeurs pituitaires humaines, ce qui contribue à la régulation de la croissance de ces tumeurs (70). De plus, l'expression de la galectine-3 est diminuée dans les souris déficientes en RUNX2 (30).

Comme dans le cas du gène qui code pour la galectine-1, la méthylation de l'ADN est aussi impliquée dans la régulation de l'expression de la galectine-3. Il a été démontré que le promoteur de *lgals3* est déméthylé dans plusieurs tumeurs exprimant la galectine-3, comme c'est le cas dans la majorité des tumeurs de glandes pituitaires (71). De plus, le traitement à la 5'-aza-2'-deoxycytidine (5'-aza-Cdr), un inhibiteur de méthylases de l'ADN, induit l'expression constitutive de la galectine-3 dans des lignées cellulaires qui n'expriment pas normalement cette protéine (71). Dans un même ordre d'idée, le séquençage du promoteur de *lgals3*, suite à un traitement au bisulfite, a permis d'identifier 50 dinucléotides CpG déméthylés dans les cellules humaines du cancer de la prostate LNCaP, qui n'expriment pas la galectine-3 et qui avaient été traitées à la 5'-aza-Cdr (72).

L'expression de la galectine-3 peut aussi être régulée par des modifications posttranscriptionelles, tel le clivage et la phosphorylation (le clivage de la galectine-3 par les MMPs sera discuté dans la section 1.3.2.2). La phosphorylation de la galectine-3 au niveau de la sérine 6, par la caséine kinase 1, est associée à l'exportation de cette protéine du noyau vers le cytoplasme et à sa fonction anti-apoptotique (73-75). De plus, la phosphorylation de la galectine-3 est aussi associée à la transformation maligne et à l'activation de gènes spécifiques, comme celui codant pour la cycline D1 (76). Les tyrosines aux positions 79, 107 et 118 peuvent être phosphorylées *in vitro* et *in vivo* par la kinase c-Abl. D'ailleurs, la phosphorylation de la galectine-3 régule sa capacité à lier les β -galactosides (77).

1.2.3. Éléments transcriptionnels impliqués dans la régulation des autres galectines.

Le promoteur du gène codant pour la galectine-2 (*lgals2*) contient deux boîtes TATA consécutives, un site Sp1 et un site potentiel pour AP-1 (78,79). Quant au promoteur du gène codant pour la galectine-4 (*lgals4*), du point de vue fonctionnel, il n'a pas été caractérisé à ce jour. Cependant, il a été démontré que le facteur de transcription Runx3 était impliqué dans l'expression de cette galectine, suite à la transfection de ce facteur dans une lignée humaine de cancer gastrique (80). D'autre part, le promoteur du gène codant pour la galectine-6 (*lgals6*) diffère des autres galectines. Il contient une boîte TATA, six boîtes E (*E box*) et un élément de régulation similaire à celui de

l'apolipoprotéine B qui est impliqué dans l'expression de cette galectine au niveau intestinal (81). Les régions régulatrices des gènes des galectines-8 et -9 (lgals8 et lgals9) sont encore peu connues. Toutefois, la galectine-8 peut être induite par le sodium butyrate dans les cellules de carcinome du colon humain (82) et la galectine-9 peut être induite par le PMA, l'IL-1β, l'interféron gamma et l'ARN double brin (83-86). Récemment, il a été démontré que l'expression de la galectine-9 est régulée par les histories déacétylases 3, dans les cellules endothéliales, via l'interaction avec la voie de signalisation PI3K-IRF3 (87). Pour ce qui est de la galectine-10, la boîte GC (-44 à -50 nucléotides) et le site Oct (-255 à -261 nucléotides) sont essentiels à l'activation du promoteur de son gène (38). D'ailleurs, des études de liaisons par EMSA (electromobility shift assay) ont démontré que les facteurs de transcription Sp1 et Oct1 se lient à leur site consensus, soit la boîte GC et le site Oct, respectivement (38). Au contraire, les éléments AML3 et YY1, qui se lient respectivement aux séquences consensus AML et Inr, agissent comme des éléments répresseurs (38). L'expression de la galectine-10 est similaire à la galectine-1 dans ce sens où leur expression est induite par l'acide butyrique et que le facteur de transcription Spl serait nécessaire à cette induction (38). En ce qui à trait à la région régulatrice du gène codant pour la galectine-12 (lgals12), deux sites de reconnaissance potentiels pour le facteur de transcription Sp1 et quatre sites pour le facteur de transcription AP-2 ont été identifiés. Le promoteur des gènes pour les galectines-13, -14 et -15 n'ont pas encore été caractérisés.

1.3. Fonctions.

Lorsqu'elles se retrouvent au niveau intracellulaire, dans le noyau et/ou le cytoplasme, les galectines peuvent interagir avec des protéines intracellulaires. Ainsi, elles peuvent jouer un rôle dans les processus cellulaires, tels la croissance cell laire, l'apoptose et le cycle cellulaire (88,89). Au niveau extracellulaire, elles peuvent se lier à des glycoconjugués à la surface de plusieurs types cellulaires et entraîner une cascade de signaux transmembranaires pouvant causer l'activation cellulaire ou l'apoptose, moduler l'adhésion cellulaire ou induire la migration cellulaire. L'oligomérisation de ces protéines peut entraîner la liaison de récepteurs à la surface d'une même cellule ou permettre la liaison cellule-cellule ou cellule-matrice (1).

1.3.1 Fonctions intracellulaires.

1.3.1.1. Cycle cellulaire et régulation d'expression de gènes.

Le contrôle du cycle cellulaire est important au niveau du développement et de la différenciation cellulaire. Lors de stress cellulaire, l'arrêt du cycle cellulaire permet d'empêcher la transmission de matériel génétique endommagé afin de prévenir, entre autre, le développement d'un cancer (90). Une étude a démontré que la surexpression de la galectine-3, par transfection transitoire, permet de réguler le cycle cellulaire dans une lignée de cancer du sein humaine (91). Cela favorise, en particulier, l'arrêt du cycle cellulaire en G1 suite à la perte d'interaction cellule-matrice. En fait, la galectine-3 diminue l'expression des cyclines D1 et augmente celle de p21 et p27 (91). Il est connu que les cellules épithéliales sont dépendantes d'ancrage et requièrent des interactions cellule-matrice pour leur survie et leur croissance (91). D'un autre côté, la galectine-3 peut intéragir avec l'homéodomaine du facteur de transcription TTF1 (thyroid-specific transcription factor 1), ce qui augmente l'activité transcriptionnelle de ce facteur et favorise la prolifération des cellules thyroïdiennes (92). La stimulation de la prolifération, la croissance indépendante d'ancrage et l'activité anti-apoptotique semble impliquer la voie K-Ras/MEK (93). Dans les cellules humaines de cancer du sein surexprimant la galectine-3 phosphorylée, certains gènes sont induits (exemple : cycline D1, MAP3K10, MAP2K1, kératines-18 et -19, insulin-like growth factor binding protein 5, MUC5 et y*filamine*), alors que d'autres sont régulés à la baisse (exemple : MUC1, intégrines $\alpha 10$ et $\alpha 6$ et plusieurs gènes qui codent pour les collagènes et VEGF) (76,94). La galectine-3 intéragit aussi avec le complexe de transcription dépendant du facteur de cellules T (Tcf). La liaison de la galectine-3 avec Tcf et \beta-caténine dans le noyau induit l'activité transcriptionnelle de Tcf-4 et affecte la stimulation de la cycline D1 et l'expression de cmyc, ce qui induit la croissance et la prolifération (95). De plus, la galectine-3 peut se lier à la protéine Alix, qui est impliquée dans le transport des protéines et dans la régulation de l'expression de certains récepteurs à la surface des cellules. Cette interaction est d'ailleurs impliquée dans la diminution de l'expression des récepteurs de cellules T (96).

L'interaction de la galectine-1 avec l'intégrine α 5 inhibe la croissance via l'induction de p21 et p27 en stimulant la liaison et la transactivation des facteurs de transcriptions Sp1 et Sp3 (97). Cet effet antiprolifératif résulte de l'inhibition des voies de signalisations Ras/MEK/ERK et de l'induction transcriptionnelle consécutive de p27 (97). D'un autre coté, la liaison de la galectine-1 à l'actine dans les plaquettes joue un rôle dans la polymérisation et la dépolymérisation de l'actine, ce qui affecte l'agrégation des plaquettes (98). De plus, la galectine-8 peut inhiber la croissance cellulaire par sa capacité à induire l'accumulation de l'inhibiteur dépendant des cyclines p21 suite à l'activation de JKN et PKB, dans certaines lignées humaines de cancer du poumon (99). La galectine-12, qui est normalement indétectable dans plusieurs tissus et lignées cellulaires, est surexprimée dans les cellules Jurkat synchronisées en phase G1 ou G1/S du cycle cellulaire. De plus, sa surexpression ectopique dans des cellules cancéreuses cause l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et mène à la suppression de la croissance cellulaire (100).

1.3.1.2. Apoptose.

Les galectines peuvent avoir des activités pro- et/ou anti-apoptotiques dépendamment du type cellulaire, de la nature des stimuli qui les induisent et de sa localisation cellulaire. Par exemple, la galectine-3 a une fonction pro- ou anti-apoptotique dépendamment du type cellulaire. Cette galectine est anti-apoptotique dans les cellules du cancer de la prostate, puisqu'elle rend ces cellules moins sensibles à l'apoptose induite chimiquement, c'est-à-dire qu'elle diminue l'expression de Bad et stabilise la membrane mitochondriale, ce qui inhibe le relâchement de cytochrome c et l'activation de caspase-3 (101). La galectine-3 a aussi une fonction anti-apoptotique dans le lymphome de Burkitt et les cellules T induits en apoptose par Fas ou par des agents pharmacologiques (102,103), et dans les cellules du cancer de la vessie en activant Akt (104). D'un autre côté, la galectine-3 a une fonction pro-apoptotique dans le cancer du sein puisqu'elle inactive Akt suite à l'induction de l'apoptose par TRAIL (105). Lorsque la galectine-3 est localisée dans le cytoplasme, celle-ci protège les cellules de l'apoptose induite, alors qu'au niveau nucléaire elle augmente la sensibilité à l'apoptose (106).

La galectine-1 a une fonction pro-apoptotique. Cette protéine induit l'apoptose des thymocytes, des cellules T activées et de lignées de cellules leucémiques humaines (107,108). L'expression de la galectine-1 par les cellules endothéliales et dendritiques induit l'apoptose des cellules T qui s'y attachent (109). La présentation de la galectine-1 par la matrice extracellulaire (MEC) favorise aussi l'apoptose des cellules T (110). De plus, la galectine-1 au niveau intracellulaire induit l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose des cellules du cancer du colon avec une diminution de Wnt et NF- κ B (54). L'induction des cellules T par les galectines-1 et -3 serait modulée par l'utilisation de différents récepteurs de surfaces (111).

La galectine-2 est pro-apoptotique puisque la liaison de cette galectine avec des lymphocytes T activées induit l'apoptose de ces cellules en favorisant l'expression des caspases-3 et -9, le clivage du facteur de fragmentation de l'ADN, le relâchement du cytochrome c, la déstabilisation de la membrane mitochondriale et l'augmentation du ratio bax/bcl-2 (79). Les galectines-8, -9 et -12 ont aussi une fonction pro-apoptotique (40,112,113).

1.3.1.3. Rôle dans l'épissage alternatif.

La galectine-3 a été la première galectine à être associée à une fonction dans l'épissage des ARN messagers. Par la suite, l'équipe de Patterson a aussi identifié la galectine-1 comme protéine impliquée dans ce processus. Cette équipe a démontré que la galectine-3 et la galectine-1 se retrouvent dans les extraits nucléaires et que l'élimination de l'une ou l'autres de ces galectines est suffisante pour inhiber l'activité d'épissage (114). De plus, les galectines-1 et -3 sont associées avec Gemin4, un membre du complexe de survie des neurones moteurs qui est impliqué dans l'assemblage du spliceosome et des ribonucléoprotéines micro-ARN (115-117). Une étude a aussi démontré par immunoprécipitation que les galectines-1 et -3 peuvent se lier directement sur le complexe d'épissage (118).

1.3.1.4. Autres fonctions des galectines.

Récemment, la galectine-8 a été identifiée comme une protéine interagissant avec le facteur de coagulation des plaquettes V (FV), ce qui induit l'endocytose de ce co-facteur dans les mégakaryocytes (37). De plus, cette galectine a un rôle à jouer dans la défense du système immunitaire contre les infections bactériennes puisqu'elle reconnait des glycans exposés à la surface des vacuoles endommagées contenant des bactéries et recrute NDP52, ce qui active l'autophagie anti-bactérienne (119). La galectine-10 est constitutivement exprimée dans les cellules T régulatrices CD25(+) alors qu'elle est pratiquement absente des cellules T CD4(+) activées (39). Cette protéine est un nouveau marqueur essentiel aux fonctions d'anergie et de suppression des cellules T régulatrices (39). La galectine-12 est exprimée par les adipocytes et est un régulateur négatif de la lipolyse. L'ablation de la galectine-12 dans les souris induit l'augmentation de la respiration mitochondriale des adipocytes, diminue l'adiposité, améliore la résistance à l'insuline et l'intolérance au glucose (120).

1.3.2 Fonctions extracellulaires.

1.3.2.1. Adhésion.

Les galectines peuvent avoir des propriétés adhésives en agissant comme ligands pour la reconnaissance d'un récepteur ou anti-adhésives en bloquant l'accès aux récepteurs (Figure 1.2). Ce sont des protéines « matricellulaires » (nouvelle classe de protéines modulatrices de l'adhésion) (16,121). La galectine-1 peut avoir des propriétés adhésives ou anti-adhésives. Par exemple, il a été démontré que l'ajout de galectine-1 recombinante à des cellules de mélanomes humains et de cancers ovariens augmente l'attachement de ces cellules à la laminine et/ou la fibronectine (122,123). De plus, la transfection du gène *lgals1* dans les cellules du cancer du colon augmente l'adhésion de ces cellules à la laminine, la fibronectine et le collagène (124). D'un autre côté, il a été démontré par chromatographie d'affinité que la galectine-1 inhibe la liaison de l'intégrine α 1 β 7 à la laminine, mais n'affecte pas la liaison à la fibronectine (125). La galectine-3 a aussi des fonctions proet anti-adhésives. Cette galectine induit l'adhésion des polymorphonucléaires humains à la laminine (126). De plus, la transfection du gène codant pour la galectine-3 dans les cellules de cancers du sein favorise l'adhésion de ces cellules à la laminine, la fibronectine et la vitronectine (127). Cependant, l'ajout de fortes concentrations de galectine-3 recombinante à des cellules de cancers du sein inhibe l'attachement au collagène de type IV (128). La galectine-3 peut se lier à une variété de composantes de la matrice extracellulaire, comme la laminine, la fibronectine, l'élastine, le collagène IV et la tenascin-C et –R (129), ce qui module les processus biologiques dépendant de la matrice, comme l'adhésion et la migration des cellules normales ou tumorales. La galectine-2 est aussi associée à des fonctions pro- et anti-adhésives. La pré-incubation des cellules T avec la galectine-2 inhibe la liaison au collagène et augmente la liaison à la fibronectine (79). La galectine-8 et -9 possède aussi ces propriétés (130-132). La galectine-8 sécrétée est un modulateur de l'adhésion cellulaire (130). Lorsqu'elle est immobilisée sur la cellule, elle permet l'adhésion à des intégrines à la surface cellulaire. D'un autre côté, lorsque la galectine-8 est présente en excès comme ligand soluble, elle forme un complexe avec les intégrines qui régule négativement l'adhésion (133).

Il est connu que les galectines se lient aux β -galactosides des glycocongugués présents dans la MEC et sur les molécules d'adhésion à la surface des cellules (3,23). Ce faisant, il a été démontré que les galectines-1 et -3 induisent l'agrégation homotypique de plusieurs types cellulaires. Par exemple, les galectines favorisent l'adhésion des cellules de mélanome entre elles par l'interaction avec la glycoprotéine 90K (134,135). Ces galectines sont aussi impliquées dans l'agrégation homotypique des cellules de cancer du sein et dans l'adhésion de ces cellules aux cellules endothéliales via l'interaction avec l'antigène Thomsen-Friedenreich (136). La galectine-1 induit également l'adhésion des cellules lymphoblastoïdes à l'épithélium thymique, ce qui est bloqué par l'ajout de lactose (137). Il a été démontré que la galectine-3 peut servir d'ancrage aux cellules tumorales. Cette galectine est impliquée dans l'interaction des cellules de cancer du sein avec les cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC) et dans l'interaction des cellules de mélanome avec les cellules du poumon (138,139). La surexpression de la galectine-3 dans les cellules dendritiques permet l'interaction de ces cellules avec des lymphocytes activés exprimant la L-sélectine (140). D'un autre côté, la galectine-4 a été identifiée comme un nouveau régulateur neuronal de la myéline (36). Les auteurs ont démontré que l'expression de la galectine-4 est diminuée juste avant le processus de myélinisation dans

les cerveaux de rat en développement. En ce qui a trait à la galectine-9, cette protéine a des propriétés d'adhésion puisqu'elle entraîne l'adhésion des éosinophiles à l'endothélium vasculaire (86). De plus, son addition exogène induit l'agrégation des éosinophiles et des cellules de mélanome (141,142). La transfection du gène de la galectine-9 dans les cellules de cancer du sein permet aussi l'agrégation de ces dernières (132).

Figure 1.2 : Propriétés adhésives et anti-adhésives des galectines lors d'interaction cellule-cellule ou cellule-matrice. Les galectines ont des propriétés adhésives lorsqu'elles lient les glycoconjugués à la surface des cellules ou de la MEC. Cependant, une expression excessive des galectines peut aussi entraver l'accès à certains récepteurs.



Légende

00



Oligosaccharides contenant du galactose

1.3.2.2. Migration.

Des études ont démontré que plusieurs galectines jouent un rôle dans la migration cellulaire. Ce processus implique l'attachement et le détachement des cellules, la modification du cytosquelette et la dégradation de la matrice extracellulaire. Des expériences in vitro sur matrigel (matrice artificielle constituée d'un mélange de protéines structurales comme le collagène) ont démontré que la galectine-1 stimule la migration des cellules dendritiques à travers la MEC en favorisant la maturation de ces cellules et en induisant l'expression de plusieurs gènes, dont ceux codant pour MMP-1, MMP-10 et MMP-12 (143). Ces enzymes protéolytiques sont connues pour être impliquées dans la dégradation de la MEC (144). De plus, la galectine-1 se lie à CD43/CD45 sur les cellules dendritiques et induit l'activation et la migration cellulaire via Syc et la protéine kinase C (145). L'ajout de galectine-1 à des membranes contenant de la laminine ou de la fibronectine induit la migration de cellules de muscle lisse vasculaire sur la laminine, mais pas sur la fibronectine (146). Cette protéine induit aussi la migration de glioblastomes et de cellules endothéliales activées (147-149). Ceci a été confirmé grâce à l'utilisation d'oligonucléotides antisens. Elle induit aussi la migration de péricytes spécifiques du foie (Hepatic stellate cells) (150). D'un autre côté, la galectine-1 peut inhiber la migration d'autres types cellulaires. Il a été démontré que la galectine-1 inhibe la migration transendothéliale des cellules T, ainsi que la migration des éosinophiles et des cellules de cancer du colon (151-153).

La galectine-3 induit également la migration de plusieurs types cellulaires. L'expression de galectine-3 dans les cellules endothéliales favorise la migration en se liant au protéoglycan NG2 exprimé par les péricytes (154). Des expériences *in vitro* et *in vivo*, utilisant la méthode de la poche d'air chez la souris, ont démontré que la galectine-3 favorise la migration des monocytes et des macrophages (155). Une autre étude a démontré que la galectine-3 agit comme chimioattractant en induisant la migration des thymocytes (156). L'activité de migration de la galectine-3 est associée avec la phosphorylation de AKT et est dépendante de PI3-kinase puisqu'elle peut être inhibée par la wortmannin (157). L'interaction de la galectine-3 avec les N-glycans modifiés de Golgi β 1,6N-acetylglucosaminyltransferase V (MGAT5) à la surface des cellules de carcinome mammaire forme un treillis membranaire qui augmente l'activation des intégrines α 5 β 1 et la mobilité cellulaire (158). La galectine-3 augmente également la migration des cellules épithéliales lors de la réparation de la cornée en initiant la formation de lamellipodes par l'interaction avec les complexes N-glycans sur les intégrines β 1 (159). De plus, cette galectine induit la chimiotaxie des monocytes humains via un signal impliquant une protéine G sensible à la toxine de *Pertussis* (28), alors qu'elle inhibe la chimiotaxie des neutrophiles *in vitro* (160). Le clivage de la galectine-3 par MMP-7 inhibe la réparation de blessures dans les maladies intestinal chroniques (161). Cependant, la galectine-3 a des effets contradictoires, tout comme la galectine-1. En fait, une étude a démontré que l'ajout de galectine-3, exogène en solution ou liée à du matrigel, augmentait la migration de cellules provenant de carcinomes mammaires primaires exprimant faiblement la galectine-3. Par contre, les cellules de carcinomes mammaires malins qui expriment fortement la galectine-3 n'étaient pas invasives dans ces conditions et n'étaient pas sensibles à l'ajout exogène de cette galectine (162).

Les galectines-8 et -9 ont un rôle dans la migration de certains types cellulaires. Par exemple, la galectine-8 augmente la migration des cellules d'ovaires de hamster et des astrocytes tumoraux, alors qu'elle diminue la migration des cellules de cancer du colon (16,130,163). De même, l'interaction de forte affinité entre la galectine-8 et les intégrines β 1 module l'interaction cellule-matrice et augmente la migration cellulaire en activant GTPases Rho et PI3K (130,164,165). En ce qui à trait à la galectine-9, elle a la capacité d'attirer les éosinophiles (141,166,167).

1.3.2.3. Inflammation et système immunitaire.

De nombreuses études ont démontré que les galectines ont un rôle important dans la régulation de l'inflammation et de la réponse immunitaire. Ce rôle s'explique notamment par le fait que la réponse immunitaire est caractérisée par des changements aux niveaux des motifs de glycosylation des effecte rs. Certaines galectines peuvent avoir un rôle pro-inflammatoire alors que d'autres ont un rôle anti-inflammatoire. D'ailleurs quelques-unes d'entres elles peuvent avoir un effet pro- et anti-inflammatoire dépendamment des cellules testées et du microenvironnement extracellulaire (168). Parmi les galectines qui ont des propriétés anti-inflammatoires, on retrouve la galectine-1. Ceci a été démontré dans plusieurs modèles d'inflammation chronique et de maladies auto-immunes comme l'encéphalomyélite auto-immune, l'arthrite, les colites, la rétinopathie autoimmune, le psoriasis, l'hépatite et le diabète (35,169-174). Plusieurs études sur l'arthrite rhumatoïde, les maladies de la rétine et le psoriasis ont rapporté qu'un traitement avec la galectine-1 menait à un changement de la réponse immunitaire Th1 vers Th2 (35,170,175,176). Comme la galectine-1 augmente la tolérance des cellules immunitaires dans plusieurs maladies auto-immunes en agissant comme une cytokine anti-inflammatoire et immunorégulatrice, cela suggère qu'elle pourrait avoir un potentiel thérapeutique dans le traitement des maladies inflammatoires.

Pour ce qui est de la galectine-3, elle est généralement considérée comme une cytokine pro-inflammatoire, bien qu'elle puisse avoir des activités anti-inflammatoires dans certains cas. Les souris déficientes en galectine-3 ont une réponse inflammatoire atténuée et une réduction du nombre de granulocytes dans la cavité péritonéale induite par l'injection intrapéritonéale de thioglycollate (177,178). Cette galectine a aussi un rôle proinflammatoire dans le cerveau, puisqu'elle induit dans les microglies la transcription de médiateurs pro-inflammatoires, incluant TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-12p40, IL-10 et IFN- γ (179). Contrairement à la galectine-1, la galectine-3 réduit la sécrétion d'IL-5 dans certaines lignées de cellules T (180). De façon paradoxale, le potentiel thérapeutique de la galectine-3 a été étudié dans un modèle d'asthme chronique. Les auteurs ont démontré que l'administration intranasale d'un plasmide codant pour la galectine-3 diminuait les signes cliniques et immunologiques de l'asthme chronique en diminuant l'IL-5 et en réduisant le recrutement d'éosinophiles aux poumons (181). Cette étude suggère que la galectine-3 empêcherait la réponse allergique Th2 in vivo. Cependant, ces résultats contredisent ceux d'une étude démontrant que les souris déficientes en galectine-3 développaient une réponse Th2 réduite et une réponse Th1 supérieure dans un modèle d'asthme chronique induit par l'ovalbumine (182). Cette contradiction entre ces deux études peut possiblement s'expliquer par la méthodologie utilisée afin d'évaluer le rôle de la galectine-3 in vivo.

Il existe plusieurs évidences que les galectines peuvent influencer la réponse immunitaire acquise. Par exemple, la galectine-1 peut contrôler l'expression de complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)-II à la surface des macrophages (183). Hors, la galectine-1 est surexprimée dans les cellules T régulatrices (184) et l'abolition de son expression réduit significativement l'effet suppresseur des cellules T régulatrices CD4+ CD25+ (185). La galectine-1 peut aussi moduler l'activation des cellules T en phosphorylant partiellement une chaîne du récepteur de cellules T, ce qui empêche la réception d'un signal via ce récepteur (186). Bien que la galectine-1 semblerait jouer un rôle clé dans la tolérance des cellules T, les souris déficientes en galectine-1 ne présentent pas de défauts majeurs à ce niveau, ce qui pourrait refléter une certaine redondance au niveau des différents membres de la famille des galectines (1,187). La galectine-1 produite par les cellules stromales pourrait aussi moduler la réponse immunitaire acquise via les cellules B en se liant au récepteur pré-B (pre-BCR). Elle serait ainsi impliquée dans la formation synaptique entre les cellules pré-B et les cellules stromales (188) et contribuerait à l'activation des cellules pré-B (189).

La galectine-3 augmente la phagocytose des neutrophiles apoptotiques par les macrophages (190). De plus, cette protéine a été identifiée comme un nouveau ligand pour la phagocytose. La galectine-3, localisée à la surface des cellules apoptotiques, se lie à MerTK (*c-mer proto-oncogene tyrosine kinase*), localisé à la surface des macrophages, ce qui stimule la phagocytose. L'interaction entre ces deux protéines a été démontré par co-immunoprécipitation (191). Elle module aussi la réponse inflammatoire des macrophages, en coopération avec la dectin-1, dans un contexte de reconnaissance de champignons (192). La galectine-3 reconnait les β -1,2 oligomannanes sur la paroi cellulaire de certains champignons et s'associe avec la dectin-1 qui reconnait les β -glucanes. Ceci permet aux cellules de distinguer les champignons pathogènes, comme *Candida albicans*, des non pathogènes, comme *S. cerevisiae*, qui ne possèdent pas d'oligomannanes spécifiques dans leur paroi cellulaire (177,193,194).
Le rôle des autres galectines dans la réponse immunitaire est relativement moins connu. Dans le cas de la galectine-2, elle peut réguler la sécrétion de lymphotoxine- α , ce qui affecte le degré d'inflammation lors d'un infarctus du myocarde (195). Pour ce qui est de la galectine-4, qui est exprimée par les cellules épithéliales intestinales, elle semblerait favoriser l'activation des cellules T CD4+ et induirait la production de cytokines proinflammatoire, comme l'IL-6 (196). Quant à elle, la galectine-9 peut améliorer les réactions auto-immunitaires en supprimant les cellules Th17 et en augmentant les cellules Treg (197). La galectine-8 induit l'adhésion réversible des neutrophiles et stimule la production de superoxide, ce qui est essentiel à la fonction bactéricide des neutrophiles. Ces résultats suggèrent que la galectine-8 régule les fonctions des neutrophiles (198).

1.3.2.4 Apoptose.

Sans aucun doute, une des principales fonctions traditionnellement associées aux galectines est la régulation de l'apoptose. Ce rôle a été particulièrement bien étudié pour la galectine-1, qui peut induire l'apoptose des lymphocytes T activés ou non (107,108). Plusieurs glycoprotéines à la surface des cellules T sont des récepteurs de la galectine-1, tels CD45, CD43, CD2, CD3 et CD7 (199-202). La liaison de la galectine-1 aux cellules T mènerait à une redistribution de ces glycoprotéines. De plus, le statut de glycosylation de certains récepteurs permet de réguler négativement ou positivement l'apoptose des cellules T. D'ailleurs, les lymphocytes T CD45+ sont résistants à l'apoptose induite par la galectine-1 lorsqu'elles n'expriment pas de 2 \beta-1,6 N-acetylglucosaminyltransferase (C2GnT) (enzyme responsable de créer les structures O-glycans des glycoprotéines de surface des cellules T) (202,203). La modification des N-glycans sur le récepteur CD45 par la ST6Gal I sialyltransferase affecte aussi l'induction de l'apoptose par la galectine-1 (204). La susceptibilité des thymocytes et des cellules T à l'apoptose induite par la liaison avec la galectine-1 est contrôlée par la glycosylation et par l'expression d'isoformes spécifiques de CD45 (205). D'un autre côté, la galectine-1 peut induire l'expression des chaînes α et β du récepteur IFN- γ sur les cellules T activées, ce qui les rend plus susceptibles à l'apoptose induite par l'IFN-y (206). Un autre récepteur, CD7, a été identifié comme étant un récepteur clé dans l'apoptose induite par la galectine-1 (199). Il a d'ailleurs été démontré que les cellules leucémiques CD4+CD7- sont protégées de l'apoptose induite par la galectine-1. L'apoptose médiée par la galectine-1 impliquerait plusieurs médiateurs intracellulaires, comme le facteur de transcription AP-1, la modulation de la production de la protéine BCL2, l'activation des caspases et des signaux comme p56lck et ZAP70 (207-210). Cependant, la galectine-1 n'a pas seulement un rôle pro-apoptotique. La sécrétion de la galectine-1 par les cellules stromales permet de maintenir en vie les cellules T naïves sans pour autant promouvoir la prolifération de ces cellules (211).

La galectine-3 aurait également des propriétés pro- ou anti-apoptotiques dépendamment de sa localisation cellulaire (extracellulaire ou intracellulaire). Ainsi, la surexpression de galectine-3 dans les cellules T les protègent contre l'apoptose (212), alors que son addition exogène l'induit (102). Une autre étude a démontré que l'induction de l'apoptose des cellules T par la galectine-1 est inhibée par l'expression de galectine-3 au niveau intracellulaire (209). À la surface de la cellule, la galectine-3 formerait des complexes multivalents avec les N-glycans sur le récepteur antigénique des cellules T (TCR), ce qui régulerait négativement l'activation des cellules T en restreignant l'initiation du complexe de transduction de signal du TCR (213). Tout comme la galectine-1, la galectine-3 peut se lier à plusieurs récepteurs à la surface des cellules T, tels CD45, CD71, CD7 et CD29, ce qui lui permettrait d'induire l'apoptose dans ces cellules (102,111).

La galectine-2 induit aussi l'apoptose des cellules T, probablement via sa liaison aux intégrines β à la surface des cellules et induit le changement de la réponse immunitaire Th1 vers Th2, comme la galectine-1 (79). La galectine-9 sécrétée induit l'apoptose des cellules T et des thymocytes via la reconnaissance de glycoprotéines de surface cellulaire (107,108,113). La galectine-9 peut interagir avec Tim-3 (*T-cell immunoglobulin mucin domain 3*) exprimée à la surface des cellules T auxiliaires de type 1 (Th1), ce qui induit la mort de ces cellules et la diminution de la réponse Th1 (214).

22

1.3.2.5. Infection virale.

Les galectines peuvent jouer un rôle important dans les infections virales de par leur rôle régulateur de la réponse immune ou plus directement en interférant avec le cycle viral, notamment lors de la reconnaissance des récepteurs viraux. Ainsi, lors d'une infection virale par le virus influenza, la galectine-1 peut induire la sécrétion de l'IL-6 (cytokine pro-inflammatoire) par les cellules dendritiques (215). D'autre part, la galectine-1 peut se lier directement aux glycoprotéines à la surface de l'enveloppe du virus influenza, ce qui inhibe son activité d'hémaglutination et son potentiel infectieux. D'ailleurs, il a été démontré que la galectine-1 pouvait avoir un potentiel thérapeutique contre l'influenza. Lorsqu'elle est administrée par voie intranasale dans des souris exposées à une dose virale létale, cela permettait d'augmenter le taux de survie des souris en réduisant la charge virale ainsi que l'inflammation et l'apoptose dans les poumons (216). La galectine-1 réduit aussi la sévérité des lésions oculaires induites par le virus de l'herpès simplex, en réduisant notamment la production de cytokines pro-inflammatoires (217). D'un autre côté, cette galectine peut aussi avoir un rôle dans l'augmentation du potentiel infectieux d'un virus, comme dans le cas du VIH (virus d'immunodéficience humaine)-1. En fait, la galectine-1 peut se lier directement au VIH-1 via sa liaison aux glycoprotéines de l'enveloppe virale gp120 et aux récepteurs CD4 exprimés sur les cellules T, favorisant ainsi l'attachement du virus à la surface des cellules hôtes (218).

En ce qui à trait à la galectine-9, cette protéine a plutôt une fonction antivirale. L'interaction entre la galectine-9 et TIM-3 rend les cellules T activées moins susceptibles à l'infection et à la réplication du VIH-1, entre autre en raison de la diminution de l'expression de co-récepteurs de VIH-1 et de l'augmentation de la *cyclin-dependent kinase inhibitor* p21 (219). Ceci suggère que cette galectine pourrait servir de microbicide afin de prévenir une infection au VIH-1.

1.3.3 Implication des galectines dans le cancer.

Le rôle des galectines dans le cancer a fait l'objet de nombreuses études, surtout dans le cas des galectines-1 et -3 qui sont souvent anormalement exprimées dans différents types de cancer. Par exemple, la galectine-1 est exprimée dans les astrocytes tumoraux, les mélanomes, les cancers de la prostate, thyroïdien, des ovaires, de la vessie, de même que des carcinomes hépatocellulaires (220-222). Souvent, cette expression corrèle avec l'agressivité tumorale et la métastasie (163,223-225). Dans le cancer des poumons, la surexpression de la galectine-1 est associée à une augmentation de la grosseur des tumeurs et du nombre de nodules métastatiques, ainsi qu'à la diminution de la survie (226). Dans le cas du lymphome hodgkinien, des analyses protéomiques ont démontré que la galectine-1 pourrait potentiellement devenir un nouveau marqueur puisque son expression corrèle avec un mauvais pronostique (227).

Comme dans le cas de la galectine-1, la galectine-3 est surexprimée dans plusieurs types de cancers, incluant des types spécifiques de lymphomes (69,228), des carcinomes thyroïdiens (229-231), hépatocellulaires (232), cancer des reins (233), du colon (234) et les mélanomes malins (235). Récemment, il a été démontré que la galectine-3 est surexprimée dans les tissus de cancer du pancréas et se retrouve à un niveau anormalement élevé dans le sérum de patients atteints de ce type de cancer (236). À l'inverse, son expression est diminuée dans d'autres types de cancers, comme dans le cas du carcinome du colon (237), du sein (238), de l'ovaire (239), utérin (240) et de la prostate (241-243). De plus, la galectine-3 est exprimée différemment selon les divers types de cancers du cerveau (244).

De plus en plus d'études ont depuis documenté les patrons d'expression des autres galectines dans le cancer. Notons ainsi que l'expression de la galectine-4 est diminuée dans le cancer colorectal (245), alors que la galectine-8 est surexprimée dans le cancer de la prostate (246), et que la diminution de son expression est associée au cancer urothélial (247). Quant à la galectine-9, elle est surtout connue pour être surexprimée dans les lymphomes Hodgkinien (248). Les lecteurs sont invités à consulter une excellente revue sur le sujet pour plus de détails (1).

1.3.3.1. Transformation néoplasique.

Un cancer se développe lorsqu'une cellule normale subit une transformation néoplasique, suite à une altération au niveau des mécanismes de régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose. La transfection du gène *lgals1* dans les fibroblastes a permis d'induire leur transformation en rendant leur croissance indépendante d'ancrage, diminue leur inhibition de contact, permet la formation de colonies en agar et la formation de tumeurs dans des souris *nude* (249). Des antisens spécifiques pour le gène de la galectine-1 dans les gliomes ont permis le retour au phénotype normal (250).

Il a été démontré que l'expression de la galectine-3 est nécessaire à la maintenance du phénotype transformé des carcinomes thyroïdiens (251). De plus, sa surexpression dans les cellules folliculaires provoque la transformation de ces cellules (92). L'utilisation d'antisens spécifiques contre la galectine-3 dans des cellules de cancer du sein a démontré que ces cellules revenaient à un phénotype normal, c'est-à-dire qu'elles perdaient la propriété de croissance indépendante d'ancrage et acquéraient la propriété d'inhibition de contact (252). Le mécanisme est encore inconnu, mais une étude suggère que la phosphorylation de la galectine-3 contribuerait à la transformation maligne des cellules épithéliales humaines par la modulation de gènes spécifiques (76).

Tout comme la galectine-1, la galectine-3 interagit avec l'oncogène *Ras*. Ceci pourrait expliquer leur fonction dans la transformation néoplasique (253,254). La galectine-1 permet à H-Ras de se localiser à la membrane afin de faciliter son activation. De plus, l'inhibition de la galectine-1 ou l'utilisation d'un dominant négatif de H-Ras empêche la transformation (255). La galectine-3 augmente quant à elle l'expression de K-Ras et leur colocalisation active la transformation néoplasique des cellules de cancer du sein (256).

1.3.3.2. Métastasie.

La métastasie implique plusieurs changements dans les cellules, en particulier aux niveaux des interactions cellule-cellule et cellule-matrice. En fait, la cellule cancéreuse doit se détacher de la tumeur primaire et se lier aux cellules endothéliales afin d'initier le processus d'intravasation. Sous certaines conditions, notamment via l'expression de molécules d'adhésion intercellulaires sur l'endothélium vasculaire, la cellule cancéreuse initiera sa sortie du système vasculaire (par extravasation). À partir de là, elle migre jusqu'à un environnement favorable à sa nidification en se liant aux protéines de la matrice ou à des cellules du nouveau microenvironnement tumoral.

De plus en plus d'évidences démontrent que certaines galectines sont impliquées dans la métastasie, notamment dans le processus d'adhésion et d'angiogénèse. La sécrétion de galectines par les cellules cancéreuses pourrait perturber les liaisons entre les cellules adjacentes, la MEC ou encore favoriser leur interaction avec le microenvironnement en formant des ponts entre la cellule cancéreuse et les autres cellules ou matrice extracellulaire (23). Les cellules environnantes peuvent aussi sécréter des galectines et favoriser la progression des cellules cancéreuses (257).

La galectine-1 est impliquée dans l'angiogénèse. Une étude a démontré que la liaison d'un peptide anti-angiogénique (Anginex) à la galectine-1, immobilisée à la surface des cellules endothéliales, mène à la réduction de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales (149). De plus, la croissance tumorale de tératocarcinomes et l'angiogénèse est affectée dans les souris déficientes en galectine-1, ce qui suggère que l'angiogénèse est une fonction importante de cette galectine dans la progression tumorale (149,258). L'activation des cellules endothéliales induit l'augmentation de l'expression de la galectine-1, ce qui pourrait favoriser l'extravasation des cellules cancéreuses. L'expression des galectines par les cellules endothéliales au niveau de certains organes suggère qu'elles pourraient aussi avoir un rôle dans l'attraction de cellules tumorales à un endroit propice à leur nidification. Les galectines exprimées par les cellules cancéreuses et endothéliales favorisent également leur interaction. Il a d'ailleurs été démontré, par microscopie confocale lors d'une étude sur l'adhésion de cellules de cancer du sein à une

monocouche de cellules HUVEC, que les galectines-1 et -3 se localisaient au site de contact entre ces deux types cellulaires (136). De plus, il été démontré dans un modèle expérimental murin de métastases aux poumons que l'inhibition de la galectine-1 par le thiodigalactoside ou des shARN (*short hairpin RNA*) spécifiques permettait de réduire l'adhérence des cellules cancéreuses, augmentait le nombre de cellules T, ce qui permettait de diminuer les métastases. Ceci démontre le rôle de la galectine-1 dans la métastasie et suggère que cette protéine serait une cible potentielle pour réduire le nombre de métastases (259).

La galectine-3 a aussi un rôle à jouer dans la métastasie. Par exemple, une étude a démontré que la protéine LAMP-1 (Lysosomal-associated membrane protein 1) possède un niveau élevé d'oligosaccharides, comme le N-acetyl lactosamine, un ligand de forte affinité pour la galectine-3. Étant donné que LAMP-1 est exprimé à la surface des cellules de mélanome murin hautement métastatique et que la galectine-3 est fortement exprimée dans les cellules endothéliales des poumons, cela suggère que la galectine-3 faciliterait la métastasie à des organes spécifiques (139). D'ailleurs, l'ajout de lactose à des coupes de poumons inhibe substantiellement l'adhésion des cellules tumorales (139). La galectine-3 pourrait elle aussi jouer un rôle dans l'angiogénèse en se liant avec NG2 (neuron-glial antigen 2), un protéoglycan transmembranaire exprimé par les péricytes dans les nouveaux vaisseaux sanguins. Il est connu que NG2 induit la migration des cellules endothéliales et stimule l'angiogénèse. D'ailleurs, il a été démontré que la formation d'un complexe entre la galectine-3, NG2 et l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ serait important pour la migration des cellules endothéliales (154). La galectine-3 est aussi un ligand du disaccharide Thomsen-Friedenreich qui se retrouve sur MUC1 (mucin 1), une protéine transmembranaire surexprimée et fortement glycosylée dans les cellules de cancers épithéliaux, favorisant ainsi l'adhésion des cellules cancéreuses à l'endothélium (260). Une étude récente dans un modèle de xénogreffe a démontré que l'inhibition de la galectine-3 par une molécule synthétique (lactulosyl-L-leucine) combinée avec le taxol réduit le nombre de métastases aux poumons (261). La galectine-3 se lie également à l'intégrine a5ß3 et induit l'angiogénèse via VEGF (vascular endothelial growth factor) et bFGF (basic fibroblast growth factor) (262). La comparaison des transcriptomes des cellules de mélanomes

déficientes ou non en galectine-3 a permis de démontrer que la galectine-3 induit l'expression de plusieurs gènes comme ceux codant pour VE-cadhérine, IL-18, EDG-1 (endothelial differentiation gene), MMP-2 et fibronectin-1. Ces gènes sont tous impliqués dans le processus de la métastasie et de l'angiogénèse (263). La VE-cadhérine est une molécule d'adhésion exprimée dans les jonctions adhérentes des cellules endothéliales et elle est dépendante du calcium (264). L'IL-8 est une chimiokine pro-angiogénique (265). L'activation de MMP-2 par l'IL-8 peut induire la métastasie en augmentant l'invasion des cellules et l'angiogénèse (266). Une immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) a démontré qu'il y avait un niveau plus élevé de liaison du facteur de transcription egr-1 (early growth response 1) sur les promoteurs de VE-cadhérine et IL-8 dans les cellules déficientes en galectine-3 (Gal-3shRNA) comparativement aux cellules témoins, mais aucune différence n'a été détectée concernant son expression dans les cellules en utilisant un immunobuvardage de type Western (263). EGR-1 est souvent décrit comme un suppresseur de tumeurs et est impliqué dans les processus de croissance et de différenciation en régulant la transcription de gènes cibles via des éléments riches en GC (267). Il a donc été suggéré que la galectine-3 agirait en amont d'EGR-1 afin de prévenir sa liaison aux promoteurs de VE-cadhérine et IL-8 et ainsi éviter la diminution de l'expression de ces gènes.

Le niveau de galectines -2,-3,-4 et -8 est supérieur dans le sérum de patients atteints d'un cancer du colon ou du sein comparativement aux personnes saines. Ces galectines pourraient favoriser l'adhésion des cellules cancéreuses à l'endothélium vasculaire (268). Au contraire, dans le cancer gastrique, une faible expression de galectine-2 est associée à l'agressivité et au développement de métastases aux ganglions (269). Dans le cancer colorectal, la galectine-4 est aussi faiblement exprimée. La surexpression de la galectine-4 induit d'ailleurs l'arrêt du cycle cellulaire et retarde la migration et la mobilité, alors que son abolition résulte en l'augmentation de la prolifération, de la migration et de la motilité cellulaire. L'expression de galectine-4 module négativement les gènes ciblent de la voie Wnt (245).

28

La galectine-8 a aussi des propriétés pro-angiogéniques. Elle est exprimée dans le cytoplasme et le noyau des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins normaux et associés aux tumeurs (270). Cette protéine régule la migration des cellules endothéliales et la formation de capillaires. L'injection de matrigel avec suppléments de galectine-8 ou VEGF induit l'angiogénèse *in vivo*. La galectine-8 est un ligand de CD166 (*activated leukocyte cell adhesion molecule*) dans les cellules endothéliales des vaisseaux normaux (270).

1.3.3.3. La survie.

Les cellules cancéreuses acquièrent souvent des propriétés de mobilité et de survie indépendantes des interactions cellule-cellule et cellule-matrice. Il a été démontré que la galectine-3 a un rôle à jouer à ce niveau. Cette protéine est exprimée dans plusieurs lymphomes B diffus et protège de l'apoptose induite par Fas dans les lymphomes B Raji et les lymphomes T Jurkat (103,212). Les fonctions de la galectine-3 dépendent aussi de sa localisation dans la cellule. Une expression élevée dans le cytoplasme corrèle avec un mauvais pronostique du cancer de la prostate et du mélanome, alors qu'une expression élevée dans le noyau corrèle avec une suppression tumorale du cancer de la prostate (106,271). De plus, une forte expression de galectine-3 dans les cellules de cancer de la prostate semble indiquer un stade précoce et à progression lente (243,272). La galectine-3 peut être clivée par des protéases pendant la progression du cancer de la prostate et la lignée cellulaire de prostate PC3, qui exprime peu de galectine-3, démontre une diminution de la croissance tumorale dans un modèle de xénogreffe (241). La surexpression de la galectine-3 protège les cellules de cancer thyroïdiens et leucémiques de l'apoptose induite (273,274). La galectine-8 module la survie des cellules tumorales en se liant aux intégrines β (112). D'un autre côté, la galectine-9 a plutôt un effet néfaste sur la survie des cellules cancéreuses. Une étude suggère que la galectine-9 induit la différentiation des macrophages en plasmacytoïd dendritic cell-like macrophage, ce qui favorise l'activation des cellules NK (Natural killer) et permet par le fait même une prolongation de la survie des souris atteintes du cancer du poumon (275). De plus, l'utilisation de galectine-9 recombinante inhibe la croissance des cellules de myélomes dans un modèle de xénogreffe (276).

1.3.3.4. Invasion tumorale.

Certaines galectines ont des fonctions promigratoires, ce qui met en évidence leur rôle potentiel lors de l'invasion tumorale. On retrouve d'ailleurs une forte expression des galectines-1, 3, 8 dans les parties invasives de xénogreffes de glioblastomes, ce qui est consistent avec leur implication dans l'invasion des astrocytes tumoraux (163). De plus, les galectines-1, -3 et -8 lient et activent les intégrines, qui jouent un rôle central dans la migration et l'invasion tumorale (125,128,130,154,158,189,198,277,278). La galectine-1 augmente également l'expression de MMP-2 et -9 et réorganise le cytosquelette d'actine dans le cancer oral et l'adénocarcinome des poumons (279). Les MMP sont connues pour être impliquées dans la dégradation de la MEC, ce qui favorise l'invasion des cellules. Certaines galectines, dont la galectine-3, sont clivées par des MMP (241,280). De plus, la liaison des galectines-3 et -8 à MMP-9 porte à croire que l'interaction pourrait moduler l'attraction ou l'activation de MMP lors de la dégradation de la matrice extracellulaire (198,281-285). L'abolition de l'expression de la galectine-3 dans un modèle d'embryon du poisson zèbre diminue la migration cellulaire dans les vaisseaux (286). De plus, il a été démontré que l'activation de l'induction de l'expression de fascin-1 (actin bundling protein), de PAR-1 (protease-activated receptor-1) ou de MMP-1 par la galectine-3 permet d'augmenter la mobilité et l'invasion des cellules de cancers gastriques et de mélanomes (286-288). En fait, la galectine-3 peut interagir directement avec le facteur de transcription AP-1 et ce complexe peut se lier au promoteur des gènes codant pour PAR-1 ou MMP-1, ce qui active la transcription de ces gènes (286,288).

1.3.3.5. Échappement du système immunitaire.

Nous avons discuté précédemment (section 1.3.2) de la modulation du système immunitaire par les galectines. Les galectines peuvent être sécrétées par plusieurs cellules du système immunitaire et/ou par les cellules tumorales (289). Cela suggère un rôle important des galectines dans la réponse immune induite par l'hôte contre la tumeur. Par exemple, la galectine-1 inhibe l'activation des cellules T (290,291), induit l'arrêt et la croissance des cellules T activées (292) et supprime la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (291,292). L'expression de galectine-1 par les cellules cancéreuses pourrait donc favoriser leur survie en diminuant sa reconnaissance par le système

immunitaire. Les galectines-1 et -3 sont aussi associées à l'apoptose des cellules T dans le cancer du poumon et du mélanome (293-295). La galectine-3 confère un privilège immunitaire aux cellules tumorales en affectant l'activation et la prolifération des cellules T, l'adhésion de ces cellules à la matrice extracellulaire, et régule les fonctions des monocytes et des macrophages (24,183,186,294,296).

1.4 Potentiel thérapeutique.

Les galectines pourraient être ciblées dans une thérapie anti-cancéreuse en utilisant des ligands naturels, des composés basés sur la structure ou des composés qui ciblent les interactions protéines-protéines CRD-indépendantes (Annexe A).

1.4.1. Ligands naturels.

Les études sur l'inhibition des galectines sont basées principalement sur le ciblage du CRD en utilisant des ligands naturels ou des hydrates de carbone. Il a été démontré, *in vitro*, que le lactose inhibe la capacité de la galectine-7 à induire MMP-9 dans les cellules de lymphomes (297). Comme MMP-9 est impliqué dans la métastasie, cela suggère que lorsque la galectine-7 est bloquée au niveau de son CRD, la formation de métastases serait affectée. De plus, le thiodigalactoside a permis d'inhiber la galectine-1 dans un modèle expérimental murin de métastases aux poumons, ce qui permettait de diminuer les métastases (259).

La pectine de citron modifiée (PCM), développée par l'équipe d'Avraham Raz, est l'inhibiteur le plus connu des galectines. La PCM inhibe les métastases spontanées dans un modèle du cancer de la prostate (298), du sein et du colon (299), lorsqu'elle est administrée par voie orale. Ainsi, les auteurs ont démontré que cette pectine peut inhiber l'angiogénèse *in vitro* et *in vivo* en bloquant l'association de la galectine-3 avec son ligand. De plus, cet inhibiteur permet de réduire la sévérité d'une maladie aigue des reins (300). La pectine de citron est un polysaccharide hétérogène de haute masse moléculaire capable d'inhiber la liaison de la galectine-3 aux cellules HUVEC (299). Une nouvelle forme de PCM, nommée GCS-100, induit l'apoptose de cellules humaines de myélome multiple (301). De plus, ce composé a été approuvé pour des études cliniques de phase II sur la leucémie lymphoïde chronique (<u>http://www.medicalnewstoday.com/articles/110217.php</u>), ainsi que dans des études sur des patients atteints de lymphome B diffus (DLBCL) et d'autres maladies hématologiques

(http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00776802?term=dexamethasone&rank=20).

1.4.2. Composés basés sur la structure.

Certains inhibiteurs spécifiques à chacun des membres de la famille des galectines ont été découverts en se basant sur l'information de la structure tridimensionnelle déterminée à partir d'études cristallographiques des galectines (302,303) et sur les données d'affinité des divers ligands (304). Par exemple, le N-acetyllactosamine a été identifié comme un inhibiteur stable se liant in vitro aux galectines-1 et -3 (305,306). In vivo, l'inhibition de la galectine-1 par le N-acetyllactosamine attenue la croissance tumorale en augmentant l'activité des cellules du système immunitaire dans des modèles de mélanomes et de lymphomes. Cet effet est aboli par le peracetylated 4-fluoroglucosamine (4-F-GlcNAc), un inhibiteur de la biosynthèse N-acetyllactosamine (306). D'un autre côté, le remplacement d'une partie du N-acetyl glucosamine par un aglycon, qui n'est pas un hydrate de carbone, lui a permis d'être spécifique pour la galectine-7 (307). Un test de compétition en phase solide a permis de démontrer que les glycodendrimères wedgelike, une structure multimérique contenant plusieurs molécules de lactoses, inhibent la fonction de liaison de la galectine-1 (308). Les amines lactuloses synthétiques (SLA) sont aussi des inhibiteurs spécifiques des galectines-1 et -3 (309,310). D'ailleurs, il existe trois sortes de SLA : 1) le N-lactulose-octamethylenediamine (LDO), 2) le N,N'-dilactulose-octamethylenediamine (D-LDO), et 3) le N,N'-dilactulosedodecamethylenediamine (D-LDD). In vitro, les molécules LDO et D-LDO inhibent la liaison des galectines-1 et -3 à une protéine hautement glycosylée exprimée à la surface des cellules T (309). D'un autre côté, le D-LDD interfère seulement avec la liaison de la galectine-1 (309). Cela indique qu'une certaine spécificité peut être obtenue. Récemment, il a été démontré que les inhibiteurs talosides, qui sont des épimères C2 du galactose, sont spécifiques aux galectines-1 et -3 (311). En ce qui a trait à la galectine-7, l'inhibiteur synthétique 2-O-benzylphosphate-galactoside est environ soixante fois plus efficace que le galactoside (312).

CHAPITRE 1

De petits pentapeptides basés sur le motif tyr-x-tyr de peptides glycomimétiques ont été identifiés par l'utilisation de librairie de phages. Ces peptides sont capables d'inhiber la liaison de plusieurs galectines (313,314). Par exemple, ces peptides inhibent la liaison de la galectine-3 aux glycoantigènes Thomsen–Friedenreich exprimés sur les cellules de carcinome (315). Le lactulosyl-L-Leucine (Lac-L-Leu), un inhibiteur synthétique de la galectine-3, augmente la sensibilité à l'apoptose induite par le Taxol dans les cellules humaines de cancer du sein MDA-MB-435 (261). Cette même étude a démontré que la combinaison de cet inhibiteur avec le Taxol permettait d'éradiquer les métastases aux poumons dans 56% des animaux et d'inhiber significativement les métastases spontanées dans un modèle de souris *nude* (261). Le potentiel de l'inhibiteur Lac-L-Leu a aussi été démontré dans un modèle de cancer de la prostate, où il inhibe l'adhésion des cellules cancéreuses à l'endothélium de la moelle osseuse, l'agrégation homotypique et la migration transendothéliale (316). De plus, l'administration quotidienne de cet inhibiteur, chez les souris, diminue significativement les métastases (236).

1.4.3. Composés qui ciblent les interactions protéines-protéines CRD-indépendantes.

Le développement de composés spécifiques aux galectines a surtout été basé sur le CRD. Cependant, l'activité nucléaire des galectines pourrait être indépendante de la reconnaissance des hydrates de carbone. Cette possibilité est supportée par une étude montrant que la galectine-1 et -3 se lient à des protéines nucléaires dans le complexe du spliceosome et sont impliqués dans l'épissage pre-ARNm (317). De plus, un mutant de la galectine-1 déficient pour son activité de liaison au saccharide conserve sa fonction dans l'activité d'épissage et son association au facteur de transcription TFII-I (318). Les galectines nucléaires, comme la galectine-3, peuvent être considérées comme des facteurs d'épissage qui peuvent interagir par des interactions protéine-protéine (319). La galectine-7 n'a pas encore été associé avec cette fonction nucléaire. Par contre, il a été démontré que cette galectine pouvait se retrouver dans le cytoplasme et le noyau (320). De plus, la majorité des gènes modulés par la galectine-7 sont associés à des fonctions intracellulaires, comme l'apoptose.

2. Galectine-7.

La galectine-7 a été identifiée en 1995 comme un marqueur de différenciation des kératinocytes (321). C'est en comparant le transcriptome de kératinocytes transformés par le virus SV40 (*Simian Virus 40*) et celui de kératinocytes primaires que Madsen et ses collègues découvrirent que l'expression de la galectine-7 était fortement diminuée dans les cellules cancéreuses. C'est grâce au séquençage, à la comparaison de séquence et à des études de liaisons aux β -galactosides, que cette équipe a pu identifier cette protéine comme faisant partie de la famille des galectines. Une autre équipe, celle de Thierry Magnaldo en France a aussi démontré que la galectine-7 est une protéine fortement exprimée par les kératinocytes normaux (322).

2.1. Structure et distribution.

La galectine-7 est une protéine de 136 acides aminés avec une masse moléculaire d'environ 15 kDa (321,322). Cette protéine est non glycosylée et peut former des complexes avec le galactose, la galactosamine, le lactose et la N-acétyl-lactosamine (6,323,324). Elle fait partie du groupe proto-type et on peut la retrouver sous forme de monomère et d'homodimère (6,321,324,325). La topologie de la molécule de la galectine-7 humaine consiste en un motif de «*jelly roll* » semblable aux galectines-1, -2 et -10. Seules quelques boucles sont différemment localisées entre les brins concaves et convexes des feuillets du β -sandwich de ces différentes galectines (6). Contrairement aux autres galectines, il y a peu d'évidences expérimentales qui démontrent que la galectine-7 peut être sécrétée. D'ailleurs, tout comme les autres galectines, elle ne possède pas de peptide signal. Selon certains, la galectine-7 pourrait être sécrétée par les kératinocytes, mais pas par les cellules COS ou HeLa (cellules épithéliales cervicales humaines) transfectées avec le gène codant pour la galectine-7 (321,326). Dans les cellules HaCat et les cellules HeLa et DLD-1 transfectées avec la galectine-7, il a été démontré que cette protéine est surtout localisée au niveau du noyau (326).

34

La galectine-7 est exprimée de façon préférentielle dans les épithéliums squameux stratifiés de la peau (321,322). D'ailleurs, elle est exprimée dans toutes les couches de l'épiderme. Cependant, chez le fœtus, elle est présente en plus grande quantité au niveau de la couche basale (321) et chez l'adulte, elle est fortement exprimée dans la couche basale et suprabasale aux sites de contact cellule-cellule (327). En fait, chez les humains, souris et/ou rats adultes, la galectine-7 est exprimée au niveau des épithéliums stratifiés, soit dans la peau, l'œsophage, la cornée, la langue, les lèvres et les corpuscules de Hassal du thymus, ainsi que dans l'*intima* aortique (328,329). De plus, chez la souris, il a été démontré que la galectine-7 est aussi exprimée dans les cellules épithéliales de la trachée et des ovaires (325).

2.2. Régulation de l'expression.

Les mécanismes de régulation transcriptionnels de la galectine-7 semblent hautement régulés puisque son expression est surtout restreinte aux épithéliums stratifiés en condition normale. Cependant, ces mécanismes sont peu connus. Par contre, il a été démontré que l'acide rétinoïque, un modulateur de la croissance cellulaire et de la différenciation des kératinocytes, diminue l'expression de la galectine-7 dans un modèle in vitro de reconstruction de l'épiderme (322). De plus, la galectine-7 est induite par la budesonide, un stéroïde glucocorticoïde, dans un modèle de réponse inflammatoire (330). Cette protéine est induite par un agent chimiothérapeutique, cis-diaminedichloroplatinum (CDDP), dans un modèle de cancer de la vessie (331). L'expression de galectine-7 augmente aussi dans l'épiderme des souris transgéniques qui surexpriment IGF-1 (insulin*like growth factor*) sous le contrôle du promoteur bovin de la kératine-5, ce qui mène à une hyperplasie et une hyperkératose qui s'atténuent avec l'âge (332). De plus, cette galectine est induite dans les cellules de carcinome du colon suite à leurs infections par un adénovirus exprimant la protéine p53, et ce sans lien avec l'apoptose (333). L'expression de la galectine-7 est aussi augmentée dans les souris transgéniques surexprimant la cyclooxygénase-2 (COX-2) dans l'épiderme (334). L'enzyme COX-2, qui convertie l'acide arachidonique en prostaglandine, n'est pas normalement exprimée dans l'épiderme normale, mais son expression augmente suite à l'exposition aigue ou chronique à des rayons UV-B (334). L'irradiation UV-B des kératinocytes induit aussi l'expression de la

galectine-7 dans ces cellules (335). Une étude récente a démontré que la prostaglandinc induit indirectement l'expression du gène galectine-7 via l'augmentation de l'expression du gène COX-2 (336). Il a été démontré par comparaison des transcriptomes par matrice différencielle d'ADN, que la galectine-7, ainsi que plusieurs facteurs de transcription, tels EZH2 (enhancer of zest homolog-2), B-myb (Myb-related protein B) et relB, sont surexprimés dans la cornée en cicatrisation (337). Notre laboratoire a aussi démontré que la méthylation est impliquée dans la régulation du gène de la galectine-7, puisqu'il peut être induit par un traitement avec un inhibiteur pharmacologique de la méthylation de l'ADN, le 5-Aza-dC (338). En comparant les promoteurs murin et humain du gène de la galectine-7, nous pouvons effectivement constater que ces promoteurs contiennent plusieurs dinucléotides CpG qui peuvent jouer un rôle dans les mécanismes de régulation épigénétiques. De plus, ces promoteurs possèdent une boîte TATA située à proximité de deux sites de reconnaissance du facteur de transcription Sp1 et plusieurs sites de reconnaissance pour les éléments Cre (cyclic AMP-response element) et AP-1. Une étude a révélé que le promoteur de la galectine-7 contenait des séquences spécifiques à la liaison de facteurs de transcription, tels AML-1, AP-1, C/EBPa et B, GATA-3, MZF-1, SP-1, PAX-2, STAT1, v-myb, p53 et NF-κB (50) (Figure 1.3).

CHAPITRE 1

Figure 1.3: Analyse in silico du promoteur du gène de la galectine-7 murin et humain. Analyse fonctionnelle de -2000 nucléotides en aval des sites théoriques d'initiation de la transcription (flèche) des promoteurs du gène de la galectine-7, A) murin et B) humain, établie à partir du programme informatique TFSEARCH (Searching Transcription factor Binding Site: www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html). L'identification des facteurs de transcription est basée sur la banque de données TRANSFAC. Les sites de liaisons des facteurs de transcription représentés par de larges lignes de couleurs ont une similitude de séquence supérieure à 85% avec les sites consensus.

A)



2.3. Fonctions.

La galectine-7 est exprimée, en condition normale, dans les épithéliums stratifiés. Hors, les cellules de l'épithélium sont en renouvellement constant (339,340). Il a donc été suggéré que cette galectine pouvait avoir un rôle au niveau du renouvellement cellulaire des épithéliums, lors du développement et dans les tissus adultes. Les sections suivantes discutent en détail les études concernant ces différents rôles.

2.3.1. Migration cellulaire.

Les galectines sont bien connues pour leur capacité à se lier aux β -galactosides, ce qui leur permet de moduler efficacement les interactions cellule-cellule ou cellule-matrice (341,342). Il a été démontré que la galectine-7 est localisée au niveau des aires de contact cellule-cellule au niveau de l'épiderme (321). De plus, son expression diminue dans les kératinocytes transformées et indépendantes d'ancrage (321). L'expression de la galectine-7 est également plus élevée aux sites d'interaction cellule-matrice au niveau de la cornée (343). Il a aussi été démontré que la galectine-7 a un rôle à jouer dans la migration des cellules épithéliales et la ré-épithélialisation de la cornée et/ou la réparation de l'épiderme (344-346). D'ailleurs, les auteurs de ces études ont suggéré que l'interaction de la galectine-7 avec les glycoprotéines et glycolipides de surface cellulaire et de la matrice extracellulaire pouvait influencer la migration des cellules épithéliales. Étant donné que le processus de migration implique l'attachement et le détachement des cellules avec les cellules adjacentes et la matrice, la galectine-7 pourrait servir de « pont » afin de faciliter la cicatrisation. Une autre étude a suggéré que la galectine-7 favorise le détachement cellulaire, puisque la transfection de ce gène dans les cellules adhérentes de carcinomes squameux mène à une augmentation de cellules flottantes (335). De plus, Gendronneau et ses collègues ont démontré par des études in vitro que la galectine-7 est localisée sur les podosomes des kératinocytes en migration et colocalise avec la cortactin et les microtubules au front de migration de ces cellules (347). Les podosomes sont des structures contractiles riche en actines et sont impliqués dans le processus d'adhésion des cellules à un substrat solide initiant l'activité migratoire et l'invasion des tissus (348).

2.3.2. Prolifération.

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 (327). Cette étude a permis de démontrer que lors du développement, il existe une relation inverse entre le niveau d'expression de la galectine-7 et le taux de prolifération. Ce phénomène a aussi été confirmé dans les cellules de carcinomes squameux et les kératinocytes transformées ayant échappés aux mécanismes de contrôle de la prolifération. Dans ces cellules, la galectine-7 est inhibée (321,328). De plus, la galectine-7 est très faiblement exprimée dans les kératinocytes dans les cas de psoriasis, une maladie cutanée caractérisée par une hyperprolifération de ces cellules (322,328,349). Au contraire, son expression augmente dans les kératinocytes en arrêt de croissance, dans des conditions de cultures confluentes ou post-confluentes (34). Les cellules HeLa transfectées avec le gène codant pour la galectine-7 ont un taux de croissance légèrement diminué comparativement au témoin, mais le cycle cellulaire n'est pas affecté (326). Le même phénomène a été observé dans les cellules de carcinome du colon où la transfection du gène de la galectine-7 diminue significativement la croissance de ces cellules, in vitro et in vivo (350). De plus, l'addition exogène de galectine-7 inhibe la prolifération des cellules de neuroblastome, ce qui est bloqué par l'ajout de lactose (324).

2.3.3. Apoptose.

La galectine-7 a un rôle ambiguë au niveau de l'apoptose, puisque cette protéine peut avoir une fonction pro- ou anti-apoptotique. Dans les cellules de cancer colorectal, le gène de la galectine-7 a été identifié comme un des 14 transcrits induit par la surexpression de p53, une protéine ayant comme fonction principale de contrôler l'apoptose (333). Ceci suggérait que la galectine-7 serait associée à un rôle proapoptotique. De plus, l'irradiation UVB de l'épiderme, menant à la stabilisation de p53, induit l'apoptose des kératinocytes ainsi que l'expression de la galectine-7 dans ces cellules (335). Le gène p53 semble important pour cette fonction, puisque la galectine-7 n'est pas induite dans les cellules de carcinomes squameux ou de cancer de la vessie ayant des mutations au niveau du gène p53, lorsqu'elles sont irradiées ou traitées avec l'agent

chimiothérapeutique CDDP (*cis-diamminedichloroplatinum*) (331,335). Des études ont suggéré que la surexpression de la galectine-7 dans les cellules HeLa peut sensibiliser ces cellules à l'apoptose induite par irradiation UV, l'actinomycine, l'étoposide, la camptothécine et une combinaison de TNF- α et de cycloheximide (351). La transfection du gène codant pour la galectine-7 dans les cellules de cancer du colon a permis d'augmenter l'activité caspase-3 et le clivage de PARP-1 (*Poly [ADP-ribose] polymerase -1*) suite à l'induction de l'apoptose par l'actinomycine D (326). Une autre étude a démontré que Bcl-2, une protéine anti-apoptotique, est un ligand de la galectine-7 (apparemment sans se lier via le CRD de la galectine-7) dans les cellules de carcinome du colon HCT116 (352). Cette interaction favoriserait la migration de la galectine-7 du cytoplasme vers les mitochondries et le relâchement de cytochrome c et de Smac/DIABLO suite à des signaux apoptotiques (352). Cette capacité à induire l'apoptose dans certains types de cellules cancéreuses n'est pas surprenante, étant donné que plusieurs galectines (ex : galectines-3, -8 et -9) possèdent cette même caractéristique (353-356).

D'un autre côté, cette protéine a aussi un rôle anti-apoptotique dans d'autres types cellulaires. Notre laboratoire a démontré que la surexpression de la galectine-7 dans une lignée cellulaire de cancer du sein murin diminue le clivage de PARP-1 suite à l'induction de l'apoptose par l'EGCG (*Epigallocatechin-3-gallate*) (320). De plus, les études associant la galectine-7 à la progression tumorale suggère aussi qu'elle aurait une fonction anti-apoptotique, par expemple dans les lymphomes murins (297). L'utilisation d'un modèle murin déficient en galectine-7 a permis de découvrir que la réponse apoptotique des cellules de l'épiderme suite à l'exposition aux UV était plus aigue et durait plus longtemps en absence de galectine-7 (22). Ce rôle ambigu de la galectine-7 dans l'apoptose n'est pas surprenant, puisque d'autres galectines, comme la galectine-3, peuvent avoir un rôle anti ou pro-apoptotique dépendamment du type cellulaire.

40

CHAPITRE 1

2.3.4. Interaction protéine-protéine.

Comme d'autres galectines, la galectine-7 peut avoir une fonction intracellulaire aux niveaux des interactions protéine-protéine. Hormis son interaction avec Bcl-2 discutée précédemment, une autre étude a démontré que la galectine-7 agit comme un régulateur transcriptionnel qui empêche la stimulation du collagène de type I (COL1A) par le TGF- β (*transforming growth factor* β) et l'expression de PAI-1 (*inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1*) en réponse au facteur de croissance des hépatocytes (HGF) via une interaction protéine-protéine avec Smad3 (357). Les auteurs ont démontré que des antisens spécifiques à la galectine-7 inhibent l'exportation nucléaire de Smad3 induit par HGF. Smad3 est un facteur de transcription lié à la cascade de signalisation de TGF- β . Dans le cancer, il agit comme un suppresseur de tumeurs et régule l'expression de plusieurs gènes, tels COL1A2 et PAI-1 (357).

3. Galectine-7 et cancer.

Tout comme les autres galectines, la galectine-7 a des fonctions qui peuvent être favorables ou défavorables aux cellules. Il en est de même dans le cancer. C'est-à-dire que la galectine-7 peut avoir un rôle anti- ou pro-tumorale dépendamment du type de cancer (**Tableau 1.1**).

3.1. Propriétés anti-tumorales.

L'équipe de Madsen et ses collègues ont été les premiers à attribuer à la galectine-7 un rôle dans le cancer. Ils ont démontré que son expression était diminuée dans les kératinocytes transformées (321). De plus, il a été démontré *in vitro* que la liaison de la galectine-7 aux gangliosides GM1 à la surface des cellules de neuroblastome inhibait leur prolifération (324). La surexpression de la galectine-7 a aussi un rôle anti-tumoral dans le cancer du colon, tel que démontré par un modèle de tumorigénèse *in vitro*, puisque cette surexpression avait pour effet de diminuer la division cellulaire et la croissance indépendante d'ancrage sur agar mou (350). De plus, l'équipe de Matsui a démontré que l'expression de la galectine-7 est significativement plus faible dans les cellules du cancer de la vessie en comparaison à l'urothélium normal (331). Cette équipe a aussi démontré que la transfection de galectine-7 dans une lignée cellulaire de cancer de la vessie permet

d'augmenter la susceptibilité à l'apoptose induite par l'agent chimiothérapeutique CDDP, *in vitro* (331). De plus, la galectine-7 est surexprimée dans les cancers cervicaux humains qui sont sensibles aux traitements de chimiothérapie et de radiothérapie combinés, comparativement aux cancers cervicaux qui sont résistants à ces traitements (358).

3.2. Propriétés pro-tumorales.

Il a été démontré que l'ARNm codant pour la galectine-7 était surexprimé dans les tumeurs mammaires induites chimiquement pour activer H-Ras chez le rat (359). Dans cette étude, l'expression de la galectine-7 était restreinte au tissu mammaire et n'était pas détectée dans les autres tissus examinés chez le rat adulte, ce qui était la première indication que la galectine-7 pouvait être associée avec la progression tumorale. Par la suite, il a été découvert que l'expression de galectine-7 était anormalement élevée dans les carcinomes thyroïdiens (360). Une expression élevée de galectine-7 est aussi associée à un mauvais pronostique de carcinome de cellules squameuses de l'hypopharynx de stade IV, de cancers agressifs de l'œsophage et de la langue (361-363). Notre laboratoire a démontré que la galectine-7 est constitutivement exprimée dans les lymphomes agressifs murins (297,338) et certains types de lymphomes et leucémies humaines à cellules B et T, tels les leucémies lymphoïdes chroniques et les lymphomes folliculaires (364). Par comparaison, l'expression de la galectine-7 n'est pas détectable dans les lymphocytes B et T normaux (364). Bien que plusieurs types de cancers expriment de hauts niveaux de galectine-7, cela ne prouve toutefois pas que cette protéine soit associée à la progression tumorale. Cependant, l'utilisation d'un modèle expérimental murin a permis à notre laboratoire de démontrer que la surexpression de la galectine-7 dans des cellules de lymphome non agressives augmentait le nombre de métastases dans le foie et les reins, comparativement aux cellules de lymphome témoins (297). De plus, l'expression de la galectine-7 permet d'outrepasser la résistance intrinsèque des souris icam-1-déficientes à la dissémination des lymphomes (365). D'ailleurs, l'utilisation d'antisens contre la galectine-7 dans les cellules de lymphomes agressifs permet d'augmenter la survie des souris en réduisant le potentiel métastatique de ces cellules (364). De même, la surexpression de la galectine-7 dans des cellules du cancer du sein augmente leur capacité à former des métastases osseuses et pulmonaires (320). Ce rôle est consistent avec sa surexpression dans les lignées murines

CHAPITRE 1

agressives du cancer du sein et de son expression exclusive dans les sous-types agressifs (Her-2-positif et basal-like) chez l'humain (324). De plus, la transfection du gène codant pour la galectine-7 dans les cellules épithéliales cervicales humaines (HeLa) augmente la capacité d'invasion de ces cellules dans un modèle d'invasion sur matrigel (366), ce qui diffère du rôle de la galectine-7 au niveau de la sensibilité des carcinomes cervicaux aux traitements chimio et radiothérapeutique (358). Cette différence pourrait s'expliquer par le type de modèle utilisé. Récemment, les résultats préliminaires de Tagaki et ses collègues suggéraient que l'expression de la galectine-7 au niveau de la matrice entourant un cancer de l'oreille (*cholestéatome*) pourrait servir de marqueur et faciliterait le retrait complet de la tumeur (367). Cependant, le rôle de la galectine-7 dans ce type de cancer n'est pas encore connu.

3.3. Lien avec MMP-9.

Plusieurs études ont démontré qu'il y a une corrélation positive entre la galectine-7 et MMP-9 dans plusieurs types de cancers. Notre laboratoire a démontré que la transfection d'antisens contre la galectine-7 inhibait l'expression de *MMP-9* dans les cellules de lymphomes agressifs (297). De plus, il a été proposé que le caractère agressif conféré aux cellules épithéliales cervicales humaines (HeLa) par la surexpression de galectine-7 serait aussi relié à la surexpression de MMP-9 (297,366). Cette induction de MMP-9 par la galectine-7 dans les cellules HeLa se ferait via l'activation p38 MAPK. De plus, une analyse quantitative morphométrique du marquage immunohistochimique a permis de démontrer une corrélation positive entre ces deux protéines dans les cellules de carcinome du larynx humain (368). Ainsi, l'agressivité des cellules cancéreuses conférée par la galectine-7 pourrait être modulée par l'induction de l'expression de MMP-9. Tableau 1.1: La galectine-7 a des fonctions pro- ou anti-tumorales dépendamment dutype de cancer.

Anti-tumorale	Pro-tumorale
Kératinocytes transformés (321) Neuroblastome (324)	Carcinome mammaire induit chimiquement (359)
Neuroblastome (324) Cancer du colon (350) Cancer de la vessie (331) Cancer cervical (358)	Cancer du sein murin et humain (320) Carcinome thyroïdien (360) Cancer agressif de l'hypopharynx (369) Cancer agressif de l'œsophage (362) Cancer agressif de la langue (363) Cellules HeLa (366)
	Lymphome murin agressif (297) Lymphomes et leucémies humaines (364)

4. Métalloprotéase de la matrice-9 (MMP-9).

La famille des métalloprotéases de la matrice (MMP) est composée d'au moins 25 membres (370). Les MMP sont des endopeptidases dépendantes du zinc qui ont la capacité de dégrader pratiquement toutes les composantes de la matrice extracellulaire (MEC) (371). Les MMP peuvent être classées en six sous-groupes selon leur homologie structurale, soit les collagénases (MMP-1, -8 et -13), les gélatinases (MMP-2 et -9), les stromélysines (MMP-3 et -10), les matrilysines (MMP-7 et -26), les MMP de type membranaire (MMP-14, -15, -16, -17, -24 et -25) et les autres MMP (MMP-12, -19, -20, -23 et -28) (372).

4.1. Structure et distribution.

Tous les membres des MMP sont structurellement similaires. Ils possèdent tous un peptide signal, qui dirige les MMP vers la voie de sécrétion classique, un domaine catalytique dépendant du zinc et un pro-domaine (373). Lorsque la protéine est dans la forme inactive, le pro-domaine est replié sur le domaine catalytique par une liaison entre un résidu cystéine du pro-domaine et l'atome de zinc du domaine catalytique (374). Le clivage protéolytique du pro-domaine rend le domaine catalytique accessible, rendant l'enzyme active au niveau protéolytique. La protéine MMP-9 sous forme latente fait 92kDa. Comme la majorité des autres MMP, MMP-9 possède aussi une région charnière riche en proline et un domaine hémopexine à l'extrémité carboxy-terminale qui régule la spécificité de ses substrats (375). MMP-9, tout comme MMP-2, fait partie du groupe des gélatinases qui se différencient des autres par une insertion de trois domaines d'homologie avec la fibronectine de type II dans le domaine catalytique, ce qui leur confère un pouvoir catalytique particulier pour certains substrats (gélatine (collagène dénaturé), collagènes de type I, II, IV, V, VII et X, élastine, acides gras, thrombospondine, fibronectine et laminine) (376). (**Figure 1.4**).

En condition normale, MMP-9 est exprimée dans les ostéoclastes des os, dans la moelle osseuse et le thymus (377-380); elle est faiblement exprimée dans les autres tissus normaux. Cependant, son expression peut être induite dans plusieurs types cellulaires, dont la majorité des cellules du système immunitaire suite à l'exposition à différents

stimuli. On peut alors retrouver MMP-9 dans les macrophages, éosinophiles, mastocytes, lymphocytes, cellules NK, cellules dendritiques, cellules épithéliales et endothéliales, fibroblastes et cellules musculaires lisses (381-390).



Figure 1.4 : Structure de MMP-9.

4.2. Régulation de l'expression.

4.2.1. Régulation transcriptionnelle.

La séquence régulatrice du promoteur du gène mmp-9, situées entre +1 et -670 nucléotides, comprend plusieurs sites de liaison pour les facteurs de transcription AP-1, AP-2, (PEA)3/E-Twenty-six (Ets), NF-κB, SP1 et EGR-1 (Figure 1.5) et ils sont conservés chez l'homme, le rat et la souris (391-393). Le site AP-1 est important au niveau de l'induction transcriptionnelle de MMP-9, puisque lorsqu'il est muté, l'induction de l'expression de MMP-9 par le TNF α est complètement inhibée (394). Cependant, l'induction maximale de l'expression de MMP-9 via AP-1 requiert la coopération des facteurs de transcription SP1 et NF- κB (391). En ce qui a trait au site AP-2, il est principalement associé à l'expression de MMP-9 dans les kératinocytes (395). Le site NF- κB régule la réponse à l'IL-1 β , au Bcl-2, à KiSS-1 et à certaines combinaisons synergiques de cytokines et de facteurs de croissance (396-398). Les sites PEA3 (GGAGAGGEEG) permettent la liaison des facteurs de transcription de type ETS (ex: ETS1, ETS2, EGR, ELK1 et ELK2) et agiraient comme un activateur sur l'expression basale de MMP-9 en synergie avec d'autres facteurs de transcription comme NF- κ B (-600 nucléotides), SPI (-563 nucleotides) et AP-1 (-79 nucléotides) (399,400). De plus, il a été démontré que les sites PEA3 (-540 nucléotides) et AP-1 (-533 nucléotides) augmentent l'activité transcriptionnelle de MMP-9 dans les cellules humaines de cancer du sein suite à l'induction par l'EGF (401).

Le facteur de transcription EGR-1 (early growth response protein 1), contenant un motif structural en forme de « doigt de zinc », peut se lier à la séquence 5'-GGCGGGGCG-3' localisé entre les nucléotides -553 et -589 dans le promoteur du gène *mmp-9* humain (393). Donc, les sites de liaison pour les facteurs de transcription EGR-1 et SPI se chevauchent. EGR-1 peut être exprimé par plusieurs types cellulaires, comme les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes et les leucocytes (402,403). L'expression de EGR-1 est induite rapidement, mais de façon transitoire, par plusieurs facteurs de croissance et cytokines, comme TNFa, EGF, FGFa, FGFB et PDGF- β (404-412). Notre laboratoire a démontré que l'expression du gène EGR-1 est induite dans les cellules stromales suite au contact avec des cellules de lymphome, ce qui est médiée par le facteur de croissance épidermique (EGF) (412). De plus, l'induction de EGR-1 par EGF inhibe l'expression de MMP-9 et diminue la croissance de lymphome thymique (412). Ces résultats ont suggéré que la compétition entre EGR-1 et SP1 pouvait affecter la transcription du gène *mmp-9*. De plus, une autre étude a démontré que la liaison des facteurs de transcription AP-1, NF-kB et EGR-1 est essentielle à l'induction maximale de la transcription du gène mmp-9 par le TNF-a (393). En fait, EGR-1 peut avoir des fonctions pro- ou anti-tumorales dépendamment du type de cancer. D'un côté, EGR-1 peut augmenter l'expression de plusieurs gènes jouant un rôle dans la tumorigénèse, comme IGF-II (insulin-like growth factor-II) et VEGF (413-415). De plus, l'inhibition de EGR-1 par ARN interférence affecte négativement l'invasion des cellules HeLa (393). D'autres études ont démontré que EGR-1 inhibe l'apoptose et augmente la croissance des cellules tumorales (416-418). La progression du cancer de la prostate et du sein est significativement diminuée dans les souris EGR-1-déficientes et par l'utilisation des DNAzymes spécifiques pour EGR-1 (419). D'un autre côté, EGR-1 diminue la croissance de fibrosarcomes en induisant TGF- β (420) et une expression soutenue d'EGR-1 dans les cellules endothéliales bloque l'angiogénèse et réprime la croissance tumorale (421).

La méthylation de l'ADN est aussi impliquée dans la régulation de l'expression de MMP-9. Chicoine et ses collègues ont démontré que le traitement à la 5'-aza-Cdr permettait d'induire l'expression de MMP-9 dans une lignée cellulaire de lymphome qui n'exprime pas constitutivement cette protéine. Ils ont d'ailleurs identifié un site SP1 (-615

nucléotides) déméthylé dans ces cellules traitées à la 5'-aza-Cdr suite à un traitement au bisulfite et au séquençage de ce promoteur (422). De plus, le traitement à la 5'-aza-Cdr induit aussi l'expression de MMP-9 dans les cellules de cancer de pancréas et de mélanome et augmente les métastases aux poumons (423-425).

Figure 1.5 : Sites de liaison pour les facteurs de transcription dans le promoteur du gène *mmp-9* murin.



4.2.1.1 Régulateurs de la transcription.

L'expression de MMP-9 peut être modulée par des cytokines (ex : IL-1, TNF α , IL-2, IL-4, TGF β), des facteurs de croissance (ex : EGF, PDGF, bFGF), des esters de phorbol, comme le PMA (*Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*) et par l'activation de récepteurs suite à des interactions cellule-cellule ou cellule-matrice (401,426) (**Tableau 1.2**). L'adhésion ferme cellule-cellule, principalement avec les cellules endothéliales, induit la production de MMP-9 dans plusieurs types cellulaires, comme les monocytes, les mastocytes et les lymphocytes T via l'interaction ICAM-1 / LFA-1, ce qui induit les MAPK (390,427,428). La liaison entre les monocytes et les lymphocytes via l'interaction CD40 / CD40L induit aussi la production de MMP-9 (429). La liaison des cellules aux composantes de la matrice peut se faire via les intégrines. Par exemple, les intégrines $\alpha\beta$ reconnaissent la séquence Arginine-Glycine-Asparagine de la fibronectine (430). De plus, la surexpression des sous-unités β 6, α M β 2 ou α 3 β 1 des intégrines augmente significativement l'expression de MMP-9 dans les cellules (431,432). L'intégrine α 3 β 1 serait aussi responsable du maintien de la production de MMP-9 dans les cellules (433,434).

4.2.1.2. Voies de signalisation.

Étant donné que MMP-9 peut être induit par plusieurs facteurs, cela suggère que plusieurs voies de signalisations peuvent être impliquées. En fait, les inducteurs de différentes classes peuvent agir en synergie. Par exemple, l'induction de l'expression de MMP-9 par le PDGF et le TNF α dans les fibroblastes humains permet d'induire, respectivement, l'expression d'AP-1 et de relâcher NF- κ B au noyau. Ainsi, la présence de ces deux facteurs de transcription augmente de façon marquée l'expression de MMP-9 (435).

Les protéines kinases C (PKC), classiques et atypiques, sont impliquées dans l'induction de l'expression de MMP-9 en libérant NF- κ B. Les PKC classiques (PKC α , β I, β II et γ) sont activées par le calcium, le diacylglycérol (DAG) et les esters de phorbol (analogues synthétiques du diacylglycérol) (401). Ces derniers induisent l'activation des PKC et la voie de signalisation des MAPK et requièrent la présence de plusieurs facteurs de transcription, comme AP-1, NF- κ B, SP1 et ETS (401,436). Par exemple, PKC β joue un rôle important dans l'induction de l'expression de MMP-9 par le PMA dans certaines lignées cellulaires de leucémies myéloïdes (437). Contrairement au PKC classiques, les PKC atypiques (PKC ζ et PKC λ chez l'humain / PKCt chez la souris) sont insensibles au calcium et au diacylglycérol. La PKC ζ est associée à l'activation de NF- κ B, en phosphorylant I κ B- α (438,439). De plus, l'oncogène Ras agirait sur la PKC ζ afin d'activer le NF- κ B dans les cellules néoplasiques (439). Cette PKC atypique est aussi la seule oie impliquée dans l'expression de MMP-9 via NF- κ B dans les cellules gliales lors de leur stimulation à l'IL-1 ou au TNF- α (440).

Les MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) sont aussi impliquées dans l'induction de l'expression de MMP-9. Ces protéines peuvent être activées par des cytokines, des facteurs de croissance, des agents mitogènes, des hormones, le stress ou l'inflammation (441). Toutefois, les résidus tyrosine et thréonine des MAPK doivent être phosphorylés par des MAPK kinases (MAPKK) spécifiques afin que ces protéines soient activées et transportées au noyau, où elles peuvent à leur tour activer des facteurs de transcription en les phosphorylant (442). Il existe trois voies de signalisation différente

pour les MAPK, soit la voie classique, la voie JNK/SAPK et p38. La voie classique est régulée par certains signaux extracellulaires (ex : facteurs de croissance et esters de phorbol) et passe par ERK1/2 (*Extracellular Regulated Kinase*), alors que la voie JNK/SAPK est surtout induite suite a un stress métabolique et implique la protéine SAPK (*stress-activated protein kinase*) (401). Une étude a démontré que la voie ERK1/2 serait impliquée dans l'induction de l'expression de MMP-9 dans les cellules endothéliales suite à une stimulation au TNF α (436). Il a été démontré que certains facteurs de croissance, comme l'EGF, peuvent induire l'expression de MMP-9 en passant par les récepteurs tyrosine kinase (RTK), ce qui implique souvent les voies ERK1/2 et JNK (443,444). De plus, l'expression de MMP-9 dans les cellules tumorales de carcinome de la tête et du cou sc ferait principalement via la voie ERK1 (445). Il a aussi été démontré que l'IL-1 β et le TNF α induisent l'expression de MMP-9 via les MAPK des voies JNK/SAPK et p38, menant à la liaison des facteurs nucléaires NF- κ B et AP-1 (446). La voie p38 et ERK1/2 a un rôle à jouer dans l'induction de l'expression de MMP-9 dans certaines lignées cellulaires de carcinome épithéliale suite à la stimulation au TNF α et TGF β (447).

4.2.2. Régulation post-traductionnelle.

4.2.2.1 Activation de la protéine MMP-9.

Les formes inactives (proMMP-9) et actives (MMP-9) ne possèdent pas la même affinité de liaison à leur substrat (448). L'ablation par clivage du pro-domaine de la proMMP-9 permet d'activer MMP-9 (449). Ce clivage peut se produire par la trypsine, la cathepsine G, la chymase, la plasmine et les MMP-1, -2, -3, -7, -9, 13, -26 (450,451). La plasmine dérive du clivage du plasminogène par uPA (*urokinase plasminogen activator*) (451). La protéine MMP-9 peut aussi être activée par l'acide hypochlorique dans les neutrophiles (426).

4.2.2.2 Inhibiteurs.

L'activité enzymatique de MMP-9 peut être inhibée par des inhibiteurs nonspécifiques, comme l' α 2-macroglobuline (452) (**Tableau 1.2**). L' α 2-macroglobuline est un inhibiteur irréversible. Lorsque ces domaines « *bait* » sont clivés par des endoprotéases, comme MMP-9, cela cause un changement au niveau de sa conformation, ce qui lui permet de capturer l'endoprotéase (453). Le complexe α2-macroglobuline/MMP-9 se lie alors au récepteur LDL-RP (*low density lipoprotein receptor-related protein*) avant d'être internalisé et dégradé (454).

La MMP-9 peut aussi être inhibée par des inhibiteurs spécifiques, comme TIMP (*Tissue inhibitors of Metalloproteases*)-1 et TIMP-3 (**Tableau 1.2**). Ces TIMP naturels se lient au domaine catalytique et hémopexine de façon réversible (455). TIMP-1 est l'inhibiteur qui possède la plus grande affinité pour MMP-9 (456). De plus, ces protéines sont souvent induites en même temps, une façon de réguler finement l'activité protéolytique de MMP-9 *in vivo* (457).

4.2.2.3 Glycosylation.

De plus, la glycosylation peut aussi réguler l'expression de MMP-9 en modulant la capacité de TIMP-1 à se lier à MMP-9 et celle de MMP-9 à lier ses substrats (458). En fait, il existe trois sites de glycosylation (*N-linked glycans*) sur la protéine MMP-9, dont un est situé dans le pro-domaine et deux sont situés dans le domaine catalytique (401). Donc, l'activité catalytique de MMP-9 dépend de l'équilibre entre ses inhibiteurs et ses activateurs.

A HOLDHA AND I A HOLDHALD HALL I AND I CONTON OF I'M I'M I'M	T	ab	leau	1.2	: F	acteurs	qui	régu	lent l	'exp	oression	de	MMP-	9.
--	---	----	------	-----	-----	---------	-----	------	--------	------	----------	----	------	----

Inducteurs	Suppresseurs
PDGF, EGF, FGFβ, FGF3, GM-CSF, HGF, IGF, TGFα, TGFβ, VEGF, IFNα, IFNβ, IL-1α, IL-1β, IL-3, IL-8, IL-13, IL- 15, IL-17, TNFα, TNFβ, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, RANTES, LPS, PMA Contact cellule-cellule	TGFβ1, TGFβ2, IFNγ, IL-4, IL-6, II-10, élastine, TIMP, α2-macroglobuline
Contact Centrie-WIEC	

4.3. Fonctions physiologiques.

La MMP-9 est importante dans plusieurs processus biologiques, comme le développement embryonnaire, la morphogénèse, la reproduction et le remodelage tissulaire (426). La MMP-9 exerce des fonctions régulatrices sur l'homéostasie des tissus en libérant des peptides-signaux et des facteurs de croissance lors de la dégradation de la matrice extracellulaire, mais aussi en activant des cytokines, des facteurs de croissance et des chimiokines (459-461).

4.3.1. Dégradation de la MEC et fonction pro-inflammatoire.

L'enzyme MMP-9, comme les autres MMP, est principalement impliquée lors de la dégradation et du remodelage de la MEC. 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 et de ligand pour les facteurs de croissance et cytokines. C'est une matrice hétérogène de 50 à 200 mm d'épaisseur comprenant plusieurs protéines, comme le collagène de type IV, la laminine, le perlecan et l'entactine (372). D'ailleurs, la majorité des substrats de MMP-9 sont des protéines présentes dans la MEC (**Tableau 1.3**). En plus de dégrader la MEC, MMP-9 peut aussi cliver des molécules d'adhésion, des chimiokines, des cytokines et des facteurs de croissance. MMP-9 peut cliver la galectine-3, entre le CRD et le domaine terminal, ce qui affecte sa capacité d'homodimérisation (128,285). Le clivage du précurseur de l'IL-1 β et l'IL-8 mène à leur activation (461,462). La MMP-9 a donc une fonction pro-inflammatoire en favorisant la libération et l'activation de cytokines et de facteurs de croissance, ce qui permet le recrutement de cellules du système immunitaire (463).

Tableau 1.3 : Substrats de MMP-9.

Protéines de la matrice extracellulaire	Autres protéines
Gélatine, collagène (I, IV, V, VII, X, XI, XVII), élastine, fibronectine, laminine, aggrecan, entactine, ostéonectine, vitronectine, hyaluronidase treated versican, casein	α1-antitrypsine, galectine-3, MBP (<i>myelin</i> basic protein), plasminogène, pro-TNF-α, pro-IL-1α, pro-IL-8, IL-2Rα, amyloid B, FGF-R1, GROα, CTAP-III, Pro-TGFβ1, CXCL2, ET-1, TFP-1, ICAM, α1-P1, α2-macroglobuline, pro-MMP-2, pro-MMP-13

4.3.2. Chimiotaxie et migration.

La MMP-9 a un rôle dans la chimiotaxie et la migration des cellules du système immunitaire (464). Par exemple, lorsque l'IL-8 est induite par une infection, cela entraîne la chimiotaxie et l'activation des neutrophiles qui vont sécréter MMP-9. Par la suite, le clivage de l'1L-8 par MMP-9 rend cette cytokine plus active, ce qui favorise l'amplification de la chimiotaxie des neutrophiles et de la réponse immunitaire (465). Des études *in vitro* ont démontré que la présence de MMP-9 était nécessaire à la migration de plusieurs cellules du système immunitaire à travers le matrigel (466-468). Cette protéine est aussi impliquée dans la migration des cellules basales suite à une blessure de la trachée et lors de bronchiolisation alvéolaire (469,470). L'interaction entre MMP-9 et CD44 (récepteur transmembranaire) favorise la migration cellulaire (471,472). En fait, MMP-9 peut favoriser la migration des cellules en dégradant la MEC, en dégradant les liaisons cellule-cellule ou cellule-matrice et en libérant des facteurs de croissance. La MMP-9 est également impliquée dans la régénération des tissus suite à une ischémie (diminution de l'apport sanguin), puisqu'elle induit le recrutement des neutrophiles aux sites d'inflammation (473). En fait, la régénération des tissus dépend surtout de la néovascularisation (formation de nouveaux vaisseaux sanguins). Les cellules de la moelle osseuse, en particulier les neutrophiles, contribuent à la néovascularisation en produisant des facteurs de croissance angiogénique (ex : VEGF) et des protéases (473).

4.3.3. Rôle dans le développement squelettique et l'angiogénèse.

Il a été démontré grâce au développement de souris déficientes en MMP-9 que cette enzyme n'est pas nécessaire à la survie (474). Cependant, étant donné que ces souris ont une vascularisation et une ossification retardée, cela suggère que MMP-9 serait impliquée dans le développement squelettique, probablement via le processus d'angiogénèse (474). D'ailleurs, MMP-9 peut cliver et activer la majorité des isoformes de VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) en les libérant de la MEC, ce qui favorise le recrutement et l'invasion des cellules endothéliales et modifie le motif de néovascularisation en augmentant la grosseur des vaisseaux sanguins (475,476). Il a aussi été démontré que le recrutement de précurseurs de cellules endothéliales et l'angiogénèse sont retardés dans les souris déficientes en MMP-9 (477). De plus, l'expression de MMP-9 par les macrophages suite à une ischémie favorise la guérison du tissu suite à l'activation de c-kit (478).

4.3.4. Reproduction.

MMP-9 aurait un rôle à jouer au niveau de la reproduction, puisque l'absence de MMP-9 diminue légèrement la fertilité (479). En fait, les souris déficientes en MMP-9 donnent naissance à beaucoup moins de souris que les souris témoins. D'autres études ont suggéré que MMP-9 pouvait intervenir à différentes étapes du cycle de reproduction des souris femelles, comme au niveau du cycle menstruel, de l'ovulation, de l'implantation et des glandes mammaires après la lactation (480-482).

4.4. Fonctions pathologiques.

Étant donné son profil d'expression et ses diverses fonctions, il n'est pas étonnant que MMP-9 puisse jouer un rôle dans plusieurs processus pathologiques, comme l'inflammation, les maladies auto-immunes, cardiovasculaires et pulmonaires, ainsi que le cancer (426). MMP-9 est impliqué dans plusieurs maladies auto-immunes, comme le lupus érythémateux, le syndrome Sjögren, la sclérose systémique et multiple, l'arthrite rhumatoïde, la polymyositis et l'athérosclérose (426). Une autre équipe a suggéré que MMP-9 est impliquée dans le développement du système immunitaire, car les souris déficientes en MMP-9 sont résistantes à l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale chez les jeunes souris (483). Ce rôle dans les maladies dégénératives est aussi retrouvé dans l'arthrite rhumatoïde, caractérisée par de l'inflammation systémique et la dégradation des tissus au niveau des jointures. La dégradation du cartilage articulaire est connue pour être causée par l'augmentation de l'activité protéolytique (484). Hors, il a été démontré que le niveau de MMP-9 est plus élevé dans le sérum des patients atteints d'arthrite rhumatoïde (485,486). MMP-9 favoriserait l'inflammation en détruisant des tissus, en générant des signaux inflammatoires ou en recrutant des cellules inflammatoires (487). Il a été suggéré que la dégradation du collagène de type 4 par MMP-9 permettrait l'invasion des cellules immunitaires (incluant les cellules T) aux tissus atteints (426). Il serait aussi possible que des néo-épitopes soient produits suite au clivage de protéines par MMP-9 et ceux-ci pourraient induire une réponse immunitaire qui génèrerait la pathologie (426).

4.5. Implication dans le cancer.

Plusieurs études, utilisant la surexpression ou la suppression de MMP-9 dans les cellules tumorales ou péritumorales ont confirmé son rôle dans le développement tumoral et la métastasie, entre autre dans les gliomes, les carcinomes cervicaux, les cancers du poumon, et les lymphomes (488-496) (Figure 1.6). Cependant, MMP-9 peut aussi avoir un rôle anti-tumoral (Tableau 1.4).

4.5.1. Angiogénèse.

La protéine MMP-9 peut avoir un rôle pro- ou anti-angiogénique. Tels que discuté précédemment (section 4.3.3), MMP-9 peut favoriser la progression tumorale en libérant VEGF contenu dans la MEC (475). De plus, MMP-9 peut activer la cytokine proangiogénique et pro-inflammatoire IL-8 (497). Une étude sur le développement de neuroblastomes a démontré que les micro-vaisseaux dans les souris déficientes en MMP-9 étaient significativement plus petits que dans les souris témoins (498). Ces auteurs ont aussi démontré que MMP-9 joue un rôle important dans le recrutement des péricytes au niveau des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. D'un autre côté, MMP-9 peut aussi avoir un rôle anti-angiogénique en générant des inhibiteurs d'angiogénèse, comme l'angiostatine et le tumstatine. L'angiostatine est produite par le clivage du plasminogène par MMP-9 (499), mais aussi par MMP-12, MMP-3, MMP-2 et MMP-7 (499-503). Le tumstatine est un fragment de la chaîne α 3 du collagène de type IV produit suite au clivage par MMP-9 (460). L'effet suppresseur du tumstatine requiert la liaison à l'intégrine $\alpha V\beta$ 3 au niveau des cellules endothéliales et est associé à l'inhibition de la synthèse protéique médiée par mTOR (504,505).

4.5.2. Invasion, migration, extravasation.

La MMP-9 joue un rôle dans les processus métastatiques d'intravasation, d'extravasation et de colonisation des tissus secondaires (475). Par exemple, il a été démontré que l'absence de MMP-9 diminue significativement l'intravasation des cellules cancéreuses (506). La MMP-9 agirait avec les intégrines dans la dissémination des cellules cancéreuses (507,508). Lors de l'extravasation, MMP-9 joue un rôle au niveau de la perméabilisation de l'endothélium et de la diapédèse des cellules dans les tissus secondaires (509). Il s'agit du rôle le plus documenté des MMP. En fait, il existe près de 3000 études et 100 revues sur le sujet. Étant donné l'ampleur de ce sujet, il serait trop exhaustif à résumer, mais vous pouvez vous référer à certaines revues parues, entre autre, dans Nature Review (463,510,511). De plus la **figure 1.6** résume les fonctions de MMP-9 lors de la progression tumorale.

4.5.3. Système immunitaire.

La MMP-9 peut affecter la réponse immunitaire contre les tumeurs en activant le TGF- β , en clivant l'1L-2R α et en clivant ICAM-1 (512). Le clivage de l'1L-2R α diminue l'activité des cellules T associées aux tumeurs en diminuant leur prolifération (513). La surexpression de MMP-9 dans les cellules de cancer du sein est responsable du clivage de ICAM-1 et ceci a pour conséquence d'inhiber la cytotoxicité antitumorale des cellules T et NK (514). Le clivage d'ICAM-1 sur les cellules endothéliales empêche la liaison avec LFA-1, ce qui diminue l'entrée des leucocytes au site tumoral lors de l'extravasation (509). De plus, l'expression constitutive de MMP-9 dans les lymphomes agressifs ou la transfection du gène *mmp-9* dans les cellules de lymphome non agressif permet d'outrepasser la résistance des souris icam-1-déficientes qui sont génétiquement résistantes à la dissémination des lymphomes (365,496).
4.5.4. Expression de MMP-9 par les cellules tumorales et stromales.

L'expression de MMP-9 est associée au potentiel métastatique de plusieurs types de cancers, comme le cancer de la prostate, le cancer du sein et le mélanome (493,515,516). Cette fonction peut être conférée par les cellules tumorales et péritumorales (stromales) (**Tableau 1.4**). En fait, la sécrétion de MMP-9 par ces deux types de cellules complique les études sur l'expression spatio-temporelle de cette protéine.

4.5.4.1. Expression de MMP-9 par les cellules tumorales.

Plusieurs études ont démontré que l'expression de MMP-9 corrèle avec un phénotype agressif dans différents types de cellules tumorales (463). La première indication de l'implication de MMP-9 dans l'invasion des tumeurs provient d'une étude qui a démontré que la surexpression de MMP-9 dans les cellules d'embryon de rat non métastatique conférait un phénotype métastatique à ces cellules (517). De plus, l'inhibition de l'expression de MMP-9, par des ribozymes spécifiques, diminuait le potentiel métastatique de cellules embryonnaires transformées exprimant fortement MMP-9 et diminuait la formation de métastases aux poumons dans un modèle de cancer de la prostate murin (518). L'inhibition de MMP-9, par des ADNc antisens spécifiques, a aussi permis de réduire la croissance tumorale de glioblastomes in vivo (519). L'expression de MMP-9 est induite dans les cellules CD4+ de leucémies de cellules T adulte (ATL) suite à l'infection par HTLV-1 (human T-cell leukemia virus type I) (520). Il a aussi été démontré que MMP-9 est exprimée dans les lymphomes non Hodgkinien, certaines lignées de lymphome de Burkitt et de myélomes multiples (521-524). De plus, le niveau sérique de MMP-9 augmente lors du développement d'un lymphome thymique et corrèle avec la taille de la tumeur (378). Notre laboratoire a aussi développé une lignée cellulaire de lymphome génétiquement modifiée afin de surexprimer MMP-9. Ce modèle a permis de déterminer que l'expression constitutive de MMP-9 dans les cellules de lymphome murin accélère le développement d'un thymome (525). Certains groupes se sont aussi attardés aux mécanismes par lesquels MMP-9 pourrait moduler la progression tumorale. Une étude in vitro a démontré que l'inhibition de MMP-9 par ARN interférence semble favoriser l'agrégation cellulaire et l'expression de E-cadhérine, ce qui diminue la mobilité cellulaire des cellules agressives dérivées de sarcome d'Ewing (526).

Cependant, l'expression de MMP-9 par les cellules tumorales peut aussi avoir des propriétés anti-tumorales. Par exemple, l'inhibition de MMP-9, par ARN interférence, dans une lignée de fibrosarcome humaine (HT1080) a augmenté l'intravasation et la métastasie dans un modèle d'embryon de poulet (164). Ceci suggère que l'inhibition des MMP n'est pas toujours souhaitable dans l'optique d'une stratégie anti-tumorale.

4.5.4.2. Expression de MMP-9 par les cellules stromales.

L'importance de l'expression de MMP-9 par les cellules stromales a été évaluée dans plusieurs modèles tumoraux (372,527). Certaines études ont démontré que l'expression de MMP-9 par les cellules stromales avaient des propriétés pro-tumorales, alors que d'autres ont démontré le contraire. Une première étude, utilisant des souris déficientes en MMP-9 (KOMMP-9), a suggéré que l'expression de MMP-9 par les cellules péritumorales était impliquée dans le processus métastatique dans des modèles expérimentaux de cancer du poumon et de mélanome. En fait, le nombre de métastases dans les souris KOMMP-9 suite à l'injection intra-veineuse des cellules de cancer du poumon (Lewis lung carcinoma) et de mélanome (B16-BL6) était inférieur comparativement aux souris témoins (493). Une autre équipe a par la suite démontré, à l'aide d'un modèle de souris transgénique de carcinome épithéliales (K14-HPV), qu'en absence d'expression de MMP-9 par les cellules de l'hôte, le pourcentage de souris qui développaient des tumeurs était diminué de 50% à 27% et qu'il y avait un retard dans la progression de la maladie (490). De plus, les tumeurs ayant réussi à croître avaient un phénotype plus malin. Ces auteurs ont démontré, par des chimères de moelle osseuse, que l'expression de MMP-9 par les cellules de la moelle osseuse contribuait à la progression tumorale (490). L'absence de MMP-9 dans les cellules de l'hôte diminue de 66% l'incidence des tumeurs et de 76% la grosseur des tumeurs dans un modèle de cancer cervical (494). Une autre étude a démontré, grâce a l'utilisation de souris transgéniques RIP1-Tag2 déficientes en MMP-9, que l'absence de MMP-9 dans les cellules stromales diminuait la formation de tumeurs et l'angiogénèse des îlots pancréatiques, ce qui implique MMP-9 dans l'initiation de l'angiogénèse (475). D'ailleurs, la sécrétion de MMP-9 par les cellules stromales, principalement les cellules du système inflammatoire, peut induire l'angiogénèse en relâchant du VEGF (475).

58

D'un autre côté, l'expression de MMP-9 par les cellules stromales peut avoir une fonction anti-tumorale en affectant l'angiogénèse. L'augmentation de l'expression de MMP-9 dans les souris déficientes en intégrines $\alpha 1$ a pour conséquence de diminuer l'angiogénèse et d'augmenter le niveau d'angiostatine (facteur anti-angiogénique) dans le sérum suite au clivage du plasminogène par MMP-9, dans un modèle de cancer de la peau et du poumon (528,529). De plus, dans le modèle orthotopique de cancer du poumon, les auteurs ont démontré que le nombre de métastases était diminué dans les souris déficientes en intégrines al (529). L'absence de MMP-9 dans des modèles murins de carcinogénèse neuroendocrinienne (Myc;BclXl déficiente en MMP-9 et RIP1-Tag2), augmente le potentiel invasif des tumeurs et le niveau de la protéine pro-invasive cathepsine B (530). Bien que l'expression de MMP-9 dans le lymphome a été très bien documentée, des études de notre groupe avec un modèle murin ont démontré que MMP-9 n'est pas essentielle à la prolifération et à l'infiltration des cellules de lymphome non hodgkinien, puisque ces cellules s'infiltrent dans divers organes lymphoïdes (foie, rate, reins), même en absence totale de MMP-9 dans les cellules tumorales et stromales (531). Autrement dit, bien que la surexpression de MMP-9 favorise la progression tumorale et la métastasie, elle n'est pas essentielle à la dissémination des cellules cancéreuses, possiblement à cause d'une possible redondance au niveau du rôle des différents membres de la famille des MMP.

4.5.5 MMP-9 dans le mélanome.

Plusieurs études ont démontré que MMP-9 est fortement exprimée dans plusieurs lignées cellulaires de mélanome (532,533). En 2008, une étude a démontré par immunohistochimie que MMP-9 n'était pas associée au développement des mélanomes primaires (534). En 2012, une autre équipe a démontré que l'expression de MMP-9 augmentait dans environ 70% des mélanomes malins humains comparativement aux nevus bénins (535). La stimulation des cellules de mélanome murin (B16) par l'IFN-γ est associée, en partie, à l'augmentation de l'expression de MMP-9. L'interaction cellule-cellule entre les cellules de mélanome et des macrophages surexprimant MMP-9 permet aussi d'augmenter l'invasion (536). Itoh et ses collègues ont démontré, par l'utilisation de souris déficientes en MMP-9, que l'absence de MMP-9 dans les cellules stromales affecte la capacité des cellules de mélanome à se disséminer (377,493). Dans cette étude, les cellules B16-BL6 ne sécrétaient pas de MMP-9. Cependant, aucune étude n'avait étudié la capacité des cellules de mélanome à induire l'expression de MMP-9 dans les cellules stromales stromales.

CHAPITRE I

Pro- ou anti- tumorale	Localisation	Cancer / modèle	Effets
	Tumeur	Lymphome thymique	↑ croissance et développement (525)
	Stroma	Peau (KOMMP-9 x Tg K14-HPV16)	↓ tumeur (490)
Pro-tumorale	Stroma et tumeur	Melanoma et Lewis lung carcinoma (souris KOMMP-9)	↓ métastases aux poumons (493)
	Stroma	Cancer cervical (souris KOMMP-9)	↓ l'incidence et la grosseur des tumeurs (494)
	Stroma	Neuroblastome (souris KOMMP-9)	↓ angiogénèse et le recrutement de péricytes (498)
Anti-tumorale	Tumeur	Fibrosarcome (siARN MMP-9 dans HT1080)	† intravasation, métastases (537)
	Stroma	Peau (souris α-1 integrin null mice) († MMP-9)	↓ vascularisation et ↑ angiostatine (528)
	Stroma	Poumons (orthotopique), (souris α-1 integrin null mice)	↓ métastases, ↑ angiostatine (529)
	Stroma et tumeur	Carcinome neuroendocrinien (Myc;BclXI déficiente en MMP-9 et RIP1-Tag2)	↑ invasion, ↑ cathepsin B (530)

 Tableau 1.4 : MMP-9 a des fonctions pro- ou anti-tumorales dépendamment du type
 de cancer et de sa localisation.

Figure 1.6 : Rôles des MMP au niveau de la métastasie. 1) Dégradation de la matrice extracellulaire; 2) la liaison cellule cancéreuse-cellule endothéliale induit l'expression de MMP-9 par ces deux types cellulaires et permet l'extravasation des cellules cancéreuses; 3) permet le relâchement de facteurs de croissance, comme l'IGF; 4) rôle dans l'angiogénèse en recrutant des péricytes, en relâchant du VEGF et FGF ou en générant des facteurs anti-angiogénique (angiostatine, tumstatine); 5) rôle dans la modulation du système immunitaire en dégradant le récepteur IL-2R α des cellules T, ce qui empêche leur prolifération, en clivant des cytokines et chimiokines et en clivant des anticorps.



Adaptée de Demers et al., Critical Review of Immunology, 2005.

5. Hypothèses et objectifs de recherche.

Au commencement de mon doctorat, la galectine-7 n'avait pas encore été étudiée dans les mélanomes. Notre première hypothèse est que la galectine-7 aurait un rôle dans la progression tumorale des mélanomes comme c'est le cas dans plusieurs types de cancers (ex : lymphomes, cancers du sein). De plus, comme il existe une corrélation positive entre la galectine-7 et MMP-9 dans plusieurs types de cellules cancéreuses (lymphomes, cellules HeLa, carcinomes du larynx humain), il était possible que l'on retrouve cette relation également dans le mélanome. Étant donné que MMP-9 peut être exprimée à la fois par les cellules tumorales et péritumorales, nous avons émit l'hypothèse que l'expression de galectine-7 par les cellules tumorales peut induire l'expression du gène *mmp-9* dans les cellules péritumorales.

Le but de mon projet est d'étudier l'expression et les fonctions de la galectine-7 dans les mélanomes et le lien avec MMP-9 dans la relation hôte-tumeur. Pour ce faire, mes objectifs spécifiques sont de : 1) Étudier l'expression de la galectine-7 dans des biopsies et/ou des lignées cellulaire de mélanomes humains et murins; 2) Développer un nouveau modèle cellulaire de mélanome murin surexprimant la galectine-7 et/ou la luciférase, ce dernier facilitant l'étude de la dissémination des cellules cancéreuses *in vivo*; 3) Étudier *in vitro* l'effet de la surexpression de la galectine-7 dans les cellules de mélanomes murins B16F1 sur la motilité cellulaire, l'apoptose et l'expression de EGR-1; 4) Étudier l'effet de la surexpression de la galectine-7 sur la progression tumorale du mélanome; 5) Développer un nouveau modèle de souris transgénique afin d'étudier la modulation transcriptionnelle du gène *mmp-9* dans les cellules de l'hôte.

63

Monitoring *mmp-9* gene expression in stromal cells using a novel transgenic mouse model.

1. RÉSUMÉ

La métalloprotéase de la matrice 9 (MMP-9) (gélatinase B) est impliquée dans la dégradation de la matrice extracellulaire dans des contextes de mobilité et de migration *in* vivo de cellules normales et tumorales. De plus, son expression est hautement régulée au niveau transcriptionnel. Dans plusieurs types de cancers humains, l'expression de MMP-9 est anormalement élevée, ce qui est souvent associée à un mauvais pronostique. Cette expression de MMP-9 peut être retrouvée dans les cellules tumorales et les cellules stromales. Il est donc important de comprendre le schéma d'expression spatiotemporelle de MMP-9 dans les tissus afin de développer des stratégies thérapeutiques efficaces en vue de supprimer l'activation du gène *mmp-9*. Dans notre étude, nous avons décrit un nouveau modèle de souris transgénique comprenant le promoteur du gène mmp-9 murin fusionné au gène rapporteur de luciférase. Nous avons démontré que le schéma d'expression du transgène était similaire à celui du gène *mmp-9* endogène que ce soit dans des conditions normales ou suite à des stimuli. Nous avons observé une expression constitutive du transgène dans la moelle osseuse, ce qui est consistant avec la forte expression de mmp-9 endogène retrouvée normalement dans les os. De plus, l'injection de lipopolysaccharides (LPS) a permis d'augmenter significativement le signal de bioluminescence dans le foie dans nos souris transgéniques. D'ailleurs, le foie est une cible majeure lors d'un choc septique causé par le LPS. Finalement, ce modèle a aussi pu mettre en évidence que mmp-9 est activé dans les cellules stromales des poumons et de la rate des souris ayant été injectées avec des cellules de mélanome. Ce modèle d'imagerie à bioluminescence pourra faciliter l'évaluation de l'activation de MMP-9 dans les cellules stromales dans des contextes de progression tumorale ou de maladies inflammatoires.

Monitoring *mmp-9* gene expression in stromal cells using a novel transgenic mouse model

Katherine Biron-Pain¹, and Yves St-Pierre^{1*}.

¹INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7,

Running title: MMP-9 Tg mice

Key words: mmp-9, transgenic cancer, melanoma, metastasis

* To whom requests should be addressed, at INRS-Institut Armand-Frappier, 531 Boul. Des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7. Phone: 450-686-5354; Fax: 450-686-5501; E-mail: <u>yves.st-pierre@iaf.inrs.ca</u>

2. ABSTRACT

Matrix metalloproteinase (MMP)-9 (gelatinase B) is involved in extracellular matrix degradation in the context of the motility and in vivo migration of normal and malignant cells. Accordingly, its expression is highly regulated at the transcriptional level. In several types of human cancers, MMP-9 expression is abnormally elevated and has been associated with poor prognosis. Such high levels of MMP-9 expression are found in tumor cells and in stromal components. Therefore, it is important to understand the spatiotemporal expression pattern of MMP-9 in tissues for the development of effective therapeutic strategies that are aimed at suppressing mmp-9 gene activation. In the present work, we describe a transgenic mouse model harboring a luciferase gene under the control of the murine *mmp-9* promoter. We found that the expression pattern of the transgene was similar to that of the endogenous *mmp-9* gene either constitutively or following in inflammatory stimuli. A constitutive transgene expression was observed in the bone marrow, consistent with the observed high levels of endogenous mmp-9 gene expression normally found in the bone. LPS injection in mice also induced a consistent and significant increase in bioluminescent signals in the liver, which is a major target of LPSinduced septic shock. Finally, we further used the model to provide evidence that mmp-9 is activated in stromal cells of the lung and spleen in melanoma tumor-bearing mice. This bioluminescent imaging model may facilitate in vivo monitoring of MMP-9 activation in stromal cells in tumor progression and inflammatory diseases.

3. INTRODUCTION

Members of the matrix metalloproteinase (MMP) family encode zinc-dependent endopeptidases that play an important role in the turnover of extracellular matrix (ECM) in physiological and pathological processes. The expression of MMPs is highly regulated, and their expression is limited under quiescent conditions such as in normal mature tissues. In cancer cells, however, MMPs are constitutively expressed at high levels and play an essential role in tumor progression, invasion and metastasis formation (538). Although MMPs represent important therapeutic and diagnostic targets for the treatment and detection of human cancers, the development of therapeutic strategies that are aimed at inhibiting their functions in cancer has met with little success (539,540). A large part of this failure has been attributed to our limited knowledge of their function and expression patterns. Several studies have established that tumor cells express abnormally high levels of MMPs. However, there is increasing evidence that their expression is not restricted to the tumor cells themselves but is also found in stromal cells that constitute the tumor microenvironment.

The importance of stromal-derived MMPs in cancer has been examined in several tumor models, which have shown that stroma-derived MMPs are an important contributor to different stages of tumor progression. For example, MMP-9 from bone marrow-derived cells contributed to the tumor incidence of skin carcinoma (490). In a model of pancreatic islet tumorigenesis, stromal-derived MMP-9 promoted the angiogenic switch (475). In melanoma models, the lack of MMP-9 expression by stromal cells impaired the ability of melanoma cells to metastasize (377,493). MMP-9 secretion by stromal cells, most notably inflammatory cells, can promote angiogenesis by promoting the release of VEGF (475). Because MMP-9 is secreted by tumor and stromal cells, assessing its spatiotemporal expression pattern in a given tissue remains an important obstacle to the development of effective therapeutic strategies that are aimed at suppressing the *mmp-9* gene activation in stromal cells. In the present work, we describe a transgenic (Tg) mouse model that harbors the murine *mmp-9* promoter that controls the expression of the firefly *luciferase* gene.

4. MATERIAL AND METHODS

4.1. Generation and analysis of Tg mice

The pGL3-proMMP-9 reporter vector encoding the essential DNA binding motifs for mmp-9 gene expression was digested using MluI and SalI. A 2.7-kb DNA fragment containing the *mmp-9* promoter and the *firefly luciferase* reporter gene was purified from agarose gel using a standard technique. The purified DNA fragment was then microinjected into the C57BL/6xC3H pronuclei of fertilized mouse oocytes at McGill University via the Quebec Transgenic Research Network (QTRN). After injection, the embryos were transferred to pseudo-pregnant females. At two - three weeks of age, pups were ear-tagged, and the tail DNA was purified for transgene detection. Animals were genotyped by PCR using tail DNA and primers that hybridized to the *mmp-9* promoter (5'sequence and the luciferase reporter gene **c**DNA AGGAAGGATAGTGCTAGCCTGAGAAGGATG-3' 5'-(sense) and The 5'-CTTTATGTTTTTGGCGTCTTCCA-3' (antisense), respectively. CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT-3' (sense) and 5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3' (antisense) primers were used for the amplification of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene as a control. The amplification was performed in a PTC-100 thermal cycler (MJ Research, Waltham, MA, USA) using the following protocol: 120 s at 94 °C and then 40 cycles of three steps consisting of 60 s at 94 °C, 60 s at 64 °C and 60 s at 72 °C. The reaction mixture was size-separated on an agarose gel. Specifically amplified products were detected using SyBr Safe staining and ultraviolet transillumination. For the primary screening of Tg lines, groups of 9-10 mice including both genders were imaged before the injection (T = 0) of lipopolysaccharide (LPS) (0127:B8; Sigma-Aldrich) at 50 mg/kg body weight. The criteria used for screening were as follows: 1) high basal luciferase activity in organs expressing high levels of endogenous MMP-9 mRNA and 2) up-regulation of the luciferase expression in multiple organs following LPS injection. Seven lines were screened, and one line with the best characteristics was selected for characterization. To avoid the background of a hybrid genotype, selected mice were backcrossed to a C57BL/6 strain for at least five generations. Breeder pairs for the C57BL/6 mouse colony were

Published in CMLS

purchased from the Jackson Laboratory. All animals were housed in a specific pathogenfree environment in accordance with the institutional guidelines for animal care. Experiments were performed in accordance with protocols approved by the INRS Institutional Animal Care and Use Committee.

4.2. In vivo imaging

Mice were injected intraperitoneally (i.p.) with 150 mg/kg of D-luciferin potassium salt (Regis Technologies, Inc, Morton Grove, IL, USA). After 15 minutes, mice were anesthetized with isoflurane/oxygen and placed on the imaging stage. Ventral images were collected for 1 min using the Xenogen IVIS imaging system (Xenogen Corp., Alameda, CA, USA). In some experiments, mice were sacrificed, and the organs of interest (kidney, spleen, liver, lung, thymus, intestine) were collected and analyzed using *ex vivo* imaging techniques. Photons that were emitted from the abdominal region or individual organs were quantified using Living Image software (Xenogen). For experiments with LPS, groups (n = 10) containing 12- to 18-week-old male or female Tg mice were injected i.p. with 50mg/kg of LPS. Control mice were injected with phosphate-buffered saline (PBS). Sixteen hours later, mice were sacrificed, and the organs of interest collected for *ex vivo* measurements of luciferase activity.

4.3. Ex vivo measurement of the luciferase enzymatic activity

Liver, kidney, spleen, lung, and thymus were homogenized in cell culture lysis reagent (CCLR) (Promega) containing phenylmethylsulfoxide (PMSF) at 4 °C for 1 h, vortexed for 30 s, snapped frozen in liquid nitrogen and thawed at 37 °C. The samples were centrifuged for 20 min at 4°C, and the protein concentration in the supernatant was measured using the Bradford method. Equal amounts of protein were used to analyze the luciferase activity. The luciferase activity was determined using the Luciferase Assay System and a Lumat LB 9507 Luminometer (Berthold Technologies USA, Oak Ridge, TN).

4.4. RNA isolation and semiquantitative PCR

Mouse liver, kidney, spleen, lung, and thymus were excised and immediately frozen at -70 °C. Total RNA was isolated from tissues using Trizol reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen Canada, Inc., Burlington, ON, Canada). Two micrograms of total RNA was reverse transcribed using the Omniscript reverse transcriptase (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) and PCR amplified using the following conditions: 94 °C for 30 s, 64 °C for MMP-9 or 58 °C for GAPDH for 1 min, and 72 °C for 1 min. A final extension step was performed at 72 °C for 10 min. The primers used for PCR amplification were as follows: 5'-CGAGTGGACGCGACCGTAGTTGG-3' (sense) and 5'-CAGGCTTAGAGCCACGACCATACAG-3' (antisense) for murine MMP-9 and 5'-5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT-3' (sense) and AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3' (antisense) for GAPDH. The amplifications were performed in a thermal cycler (model PTC-100, MJ Research, Watertown, MA) using equal amounts of RNAs that were reverse transcribed and amplified by PCR for 35 cycles with gene-specific primers. Each amplification was performed in the linear range for each gene. Measure of GAPDH mRNA was used as an internal control. The amplified products were analyzed by electrophoresis on 1.2% agarose gels using Sybr Safe staining and UV illumination.

4.5. In vitro analyses of Tg leukocytes

Splenocytes were collected from Tg mice and stimulated for 20 h with 100 ng/ml LPS, 1 μ g/ml concanavalin A (ConA) (Flow Laboratories Inc., Inglewood, CA, USA) or 15 μ g/ml phytohemagglutinin (lectin from *Phaseolus vulgaris*, red kidney bean) (PHA) (Sigma-Aldrich) in 12-well plates. Cells were then collected and analyzed for *mmp-9* promoter activity using the luciferase assay as described above. In some experiments, co-cultured and transwell assays were conducted using splenocytes and B16F1 melanoma cells for 20 h (at ratios of 1:20 and 1:25, respectively) with or without Con A (1 μ g/ml) before analysis.

4.6. In vivo melanoma model

Eight male Tg mice (8 to 9 weeks old) were injected subcutaneously (s.c.) with 10^4 B16F1 melanoma cells in the left flank. Animals were carefully monitored periodically for tumor growth. The length (L) and width (W) of the tumor were measured using a Vernier caliper. The size of the tumor was calculated using the formula $L^2 \times W \times 0.4$. When the maximum tumor volume was reached, which occurred after 19-22 days post-injection, all of the mice were injected i.p. with 150 mg/kg of D-luciferin and were sacrificed after 10 min to collect the lungs and spleen for *ex vivo* imaging. The homogenates were then prepared for the luciferase assay and the RT-PCR analysis as described above. The dissemination of melanoma cells in target organs was analyzed using s.c injection of stable transfectants of B16F1-melanoma cells (5 x 10^4 cells) that constitutively expressed the *luciferase* reporter gene under the control of the SV40 promoter in C57BL/6 female mice (six weeks-old). Normal C57BL/6 mice were used as controls.

4.7. Statistical analysis

Data are represented as means \pm SD. The Student *t* test was used to test for statistical significance, and the level of significance was established at p < 0.05.

5. RESULTS

5.1. Generation of transgenic mice containing the mmp-9 promoter-driven luciferase reporter transgene.

The plasmid used for the construction of the C57BL/6-Tg(*proMMP9-Luc*) mice has been previously described (440) (**Fig. 2.1A**). This 681 bp fragment contains the consensus binding motifs that are common to both the murine and human genes and that are essential for the transcriptional activity of the murine *mmp-9* promoter, including a NF- κ B binding site located at position -600 bp. Tg mouse founders were identified by PCR detection of the Tg *luciferase* gene in tail-tip DNA and backcrossed to C57BL/6 mice for at least five generations to generate progeny. The insertion of the transgene was confirmed by PCR genotyping using primers that were specific for the *mmp-9* promoter and the *luciferase* reporter gene (**Fig. 2.1B**). To determine the expression pattern of the

Published in CMLS

transgene *in vivo*, bioluminescent imaging was performed in living Tg animals and compared to non-Tg mice. Our results show that all of C57BL/6-Tg(*proMMP9-Luc*) mice displayed light emissions in the abdomen and the lower extremities of the limbs (Fig. 2.1C). No background signal was detected in the non-Tg control mice. *Ex vivo* imaging demonstrated that the high basal expression of the transgene in the abdominal cavity most likely originated from the intestine. The basal luminescence was also consistently observed in the thymus, whereas the occasional expression of the transgene was detected in the spleen and lung (Fig. 2.2A). No detectable basal expression of the transgene was found in the kidneys and the liver (Fig. 2.2A). These results were consistent with those obtained using luciferase assays of tissue extracts (Fig. 2.1D) and analyses from the *genomic profile arrays* of C57BL/6 tissues (541). A constitutive transgene expression was also observed in the bone marrow from Tg mice (Fig. 2.1E), which is consistent with the high levels of *mmp-9* gene expression normally found in the bone marrow (Fig. 2.1F) (377,378).

5.2. Functional analysis of the mmp-9 promoter transgene

MMP-9 gene expression is regulated by a number of different stimuli in different cell types, most notably by LPS in liver and kidneys tissues (542-544). To determine whether our transgene model may be used to assess the activation of the *mmp-9* promoter by inflammatory mediators using bioluminescence imaging, we injected Tg and control mice with LPS. Sixteen hours after the LPS injection, the activation of the *mmp-9* promoter was examined using *ex vivo* imaging of the target organs. We found that LPS injection (50 mg/kg) induced a consistent and significant increase in bioluminescent signals in the liver (**Fig. 2.2A**), which is a major target of LPS-induced septic shock (544). No significant or consistent increase in bioluminescence was found in the other organs such as the spleen, the kidneys, the lung, and the thymuses following LPS injection. However, *ex vivo* analyses using the luciferase assay revealed the activation of the *mmp-9* Tg promoter in the liver and the kidneys (p = 0.0001 and p = 0.0015, respectively) (**Fig. 2.2B**). These results indicate that the *ex vivo* luciferase assay is more sensitive than the *ex vivo* measures of bioluminescence. The activation of the *mmp-9* Tg promoter by LPS in the liver and kidneys was consistent with the activation of the endogenous *mmp-9* gene

Published in CMLS

(Fig. 2.2C). Although no significant increase in the overall signal was demonstrated using *ex vivo* imaging of the spleen following LPS injection, we identified a significant (p = 0.04) activation of the *mmp-9* transgene in isolated splenocytes that were treated with T cell-specific mitogens such as Con A and PHA, indicating that the transgene is also functional in T lymphocyte populations (Fig. 2.2D).

Directional interactions between tumor cells and stromal cells induce the secretion of MMP-9 in the extracellular space of the tumor microenvironment (390,490,493). Accordingly, it is difficult to distinctively determine the *mmp-9* gene activation in a specific cell population. Therefore, we examined whether our C57BL/6-Tg(proMMP9-Luc) mice could be used to overcome this limitation. For this purpose, C57BL/6-Tg(proMMP9-Luc) mice were injected s.c. with B16F1 melanoma cells, and the activation of the *mmp-9* transgene in the organs of tumor-bearing mice was measured by *in vivo* imaging and the ex vivo luciferase assay. We did not detect a significant increase in the luciferase signal using whole-body imaging. However, the activation of the transgene was observed using ex vivo imaging of the lungs of tumor-bearing C57BL/6-Tg(proMMP9-Luc) mice at day 19 post-injection of B16F1 melanoma cells (Fig. 2.3A). This increase was confirmed using ex vivo measurements of the luciferase activity of lung extracts (Fig. 2.3B), which was consistent with an increase of the endogenous MMP-9 mRNA levels in the lungs of C57BL/6Tg(proMMP9-Luc) mice that were injected with B16F1 melanoma cells (Fig. 2.3C). A significant increase in the luciferase activity was also observed in the spleens of tumor-bearing mice compared to that in the spleens of control C57BL/6-Tg(proMMP9-Luc) mice (Fig. 2.4A). This increase was consistent with the ability of the B16F1 cells to migrate into the spleen of tumor-bearing animals (Fig. 2.4B). No such increase was observed in the kidneys or the liver. A luciferase assay was conducted using splenocytes collected from C57BL/6-Tg(proMMP9-Luc) and B16F1 melanoma cells that were co-cultured for 20 h with or without Con A, which is a T-cell-specific mitogen known to potentiate cellular activation. The results suggest that at least part of the increase in luciferase activity may originate from the T cell activation in the spleen of tumorbearing animals (Fig. 2.5A) (545). Experiments using transwells showed that the contact between the B16F1 melanoma cells and the spleen cells was not essential to significantly

increase the *mmp-9* transgene expression in splenocytes (Fig. 2.5B). These results indicate that the soluble factors that are produced by the B16F1 melanoma cells may potentiate the Con A-induced T cell activation. Taken together, these results indicate that the *proMMP9-Luc* transgene is functional and that C57BL/6-Tg(*proMMP9-Luc*) mice can be used to examine the activation of stromal cells in response to tumor growth.

MMP-9 is expressed by osteoclasts in the bone, and it plays an important role in bone formation and arthritis (379,380,485,486). The whole-body imaging of our C57BL/6-Tg(*proMMP9-Luc*) mice revealed a consistent and constitutive activation of the *proMMP9-Luc* transgene in paws (**Fig. 2.1C and 2.2A**). To examine the usefulness of our Tg model in arthritis, male and female C57BL/6-Tg(*proMMP9-Luc*) mice were treated with dexamethasone (DXM; i.p.; 0.5 mg/kg/day) for three weeks (Fig. 2.6A). The control mice were injected with PBS for three weeks. The bioluminescent imaging of individual paws was performed before the injection (T = 0) and at days 5 and 19 post-treatment. Our results demonstrate that 60-75% of the paws from the DXM-treated mice show a downregulation of the transgene expression after 5 and 19 days of treatment with DXM compared to 30% of the paws from control mice (**Fig. 2.6B** and **2.6C**). No decrease in the transgene expression was observed in the spleen and the bone marrow of Tg mice that were untreated or treated with DXM, which were analyzed using the luciferase assay after 19 days (*data not shown*). These results suggest that C57BL/6-Tg(*proMMP9-Luc*) mice may be useful to assess the potential of immunosuppressive drugs.

6. DISCUSSION

In the present work, we have generated a Tg mouse model expressing the *luciferase* reporter gene under the control of the murine *mmp-9* promoter. The expression pattern of the transgene was similar to the expression pattern of the endogenous *mmp-9* gene under constitutive activation or following stimulation with inflammatory mediators. We demonstrated that the transgene was activated in the lung and the spleen of melanoma tumor-bearing mice. These results suggest that this Tg mouse model may be useful to identify the cell population(s) that expresses MMP-9 in the context of bi-directional

Published in CMLS

CHAPITRE 2

interactions between cancer cells and peritumoral stromal cells. This is an important feature because determining whether cancer cells and/or stromal cells secrete MMP-9 at different steps of cancer progression has been a major challenge (390,490,493).

LPS is known for its ability to activate host-inflammatory responses by inducing the release of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α and interleukin-1 β (390,546). These cytokines induce *mmp-9* gene expression via NF- κ B, which is a critical factor that regulates *mmp-9* gene expression (547,548). Our results show that LPS increased the luciferase activity in liver and kidneys tissues and are, therefore, consistent with previous studies using NF- κ B-*Luc* Tg models, which demonstrate that the NF- κ B binding site is activated by LPS in these organs (549). This model may be useful to study the expression of MMP-9 in inflammatory processes. In addition, our results illustrate that DXM, which is a powerful anti-inflammatory agent, induces a significant suppression of the transgene in the paws of Tg mice. This bioluminescent imaging model may facilitate the repeated measures of *mmp-9* gene activation in living mice and may be used to test novel antiinflammatory drugs.

The expression of MMP-9 by tumor cells plays a critical role in tumor progression (538). In addition, a significant number of studies have shown that the secretion of MMP-9 by peritumoral cells may equally contribute to tumor growth and metastasis, especially in melanoma (490,494,536,550-552). However, it has been relatively difficult to study the *mmp-9* gene expression in stromal cells in response to tumor cells *in vivo* because *mmp-9* is often expressed by the tumor cells themselves. Therefore, the ability of tumor cells to induce MMP-9 in peritumoral cells has been mostly established using *in vitro* model systems (390,553-555). In the case of melanoma, the increases in *mmp-9* gene expression in melanoma cells are well described (532,533). However, the ability of melanoma cells to induce stromal *mmp-9* gene expression *in vivo* remains unclear. Our results in tumor-bearing Tg mice provide new evidence that tumor cells induce *mmp-9* gene expression in the peritumoral environment.

Animal models are important tools to better understand the molecular mechanisms underlying pathogenesis and to develop novel therapeutic approaches for human discases. Given the importance of MMP-9 in disease progression, Mohan et al. (556) designed a minimal mmp-9 promoter to generate a similar Tg mouse model using LacZ to facilitate the localization of *mmp-9*-expressing cells. This model was useful to study the developmental regulation of mmp-9 in tissue sections in the complex environment of the embryo using β -gal staining. This model used a shorter construct containing a 522 bp stretch of the 5' flanking region of the rabbit mmp-9 gene. Here, we used a wellcharacterized promoter sequence containing a 681 bp stretch of the 5' flanking region of the mouse *mmp-9* gene. Our Tg mouse model is thus different at the molecular level from that of Mohan et al. Our model is also complementary because luciferase reporter systems are ideal for continuous real-time measurement of bioluminescence signals emitted from firefly luciferase-based reporter system under the control of specific mammalian promoters using a non-invasive imaging modality and standard bioimaging equipment (556). Our proMMP9-Luc Tg mouse model does have some limitations. For example, the high bioluminescence originating from the abdominal space complicates in vivo studies on specific abdominal organs. In these cases, transgene expression requires ex vivo imaging. Measuring the ex vivo luciferase activity in tissue extracts is also a valid alternative, which we found to be more sensitive and quantitative than the ex vivo imaging. Therefore, both models may be used in conjunction with transcriptional inhibitors to identify novel modulators of mmp-9 gene expression in inflammatory disorders and cancer.

Our results have shown a significant luciferase activity in the bone marrow. MMP-9 expression by bone marrow-derived cells plays an important role in the survival of tumor cells in the lung microenvironment (377). This is particularly true for neutrophils which are the predominant source of MMP-9 for the establishment of peripheral metastasis of breast cancer cells (557). Interestingly, a suppression of MMP-9 in the bone marrow correlates with a concomitant decrease in tumor number, indicating that our transgenic mouse model would be useful to test the effects of new drugs on MMP-9 gene expression in the bone marrow. Such beneficial effect of MMP-9 suppression has also

Published in CMLS

been observed in the targeting of splenocytes in EAE models, indicating that inhibition of MMP-9 is a promising treatment in patients with MS.

In summary, we have developed a new Tg mouse model to study the *mmp-9* gene expression in normal and pathological conditions using luciferase-based bioluminescent imaging. This model may be an ideal foundation for the establishment of biogenic imaging of mouse models to study *mmp-9* gene expression during disease progression.

7. ACKNOWLEDGMENTS

We thank Diane Tremblay for her excellent technical support. KBP was supported by a doctoral studentship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). This work was supported by the Cancer Research Society of Canada.

8. FIGURE LEGENDS

Figure 2.1: Generation of Tg mice containing the mmp-9 promoter-driven luciferase reporter transgene. (A) The schematic illustration of the *mmp-9* promoter construct with the *luciferase* reporter gene is shown. The symbols $(\triangleright, \blacktriangleleft)$ represent the primers used for genotyping. (B) PCR genotype analysis was performed using the primers that are shown in (A) for the *mmp-9* promoter transgene detection in C57BL/6-Tg(*proMMP9-Luc*) mice in comparison to that in control C57BL/6 mice (WT) and a positive control mouse containing the PGL3-MMP-9 vector (CTRL). (C) The visualization of the luciferase expression of a representative C57BL/6-Tg(proMMP9-Luc) mouse and its organs (thymus and intestine) in comparison to those of a control mouse is shown using the Xenogen IVIS imaging system. The luciferase assay, which was represented as relative light units (RLU) per mg of protein, was performed on (D) the kidney, the spleen, the liver, the lung, the thymus and (E) the bone marrow of C57BL/6-Tg(proMMP9-Luc) mice (\blacksquare) (n = 9) in comparison to those of control mice (\Box) (n = 9). (F) RT-PCR analysis demonstrating the increased endogenous MMP-9 mRNA expression in the bone marrow of a representative C57BL/6-Tg(proMMP9-Luc) mouse in comparison to that in the bone marrow of a control mouse is shown. GAPDH was used as a loading and specificity control.

Figure 2.2: In vivo activation of the proMMP9-Luc transgene by LPS. (A) Luciferase activity in C57BL/6Tg(proMMP9-Luc) mice and organs (kidney, spleen, liver, lung and thymus) 16 h after i.p. injection of two mg/kg of LPS. The controls included C57BL/6-Tg(proMMP9-Luc) mice injected with PBS. (B) Ex vivo analysis of the luciferase activity in tissues that were collected from Tg mice that were injected with 50 mg/kg of LPS (\blacksquare ; n = 10) or PBS (\square ; n = 9). (C) Endogenous levels of MMP-9 measured by RT-PCR 16 h post-injection of two mg/kg of LPS (\blacksquare) or PBS (\square). GAPDH was used as a loading and specificity control. Relative mmp-9 levels are expressed as a ratio of mmp-9/GAPDH. (D) Luciferase assay on splenocytes collected from C57BL/6-Tg(proMMP9-Luc) mice 20 h after stimulation with LPS (100 ng/ml), ConA (1µg/ml) or PHA (15µg/ml). Non-stimulated splenocytes were used as controls (NS). Results represent the mean of two independent experiments.

Figure 2.3: Activation of the *proMMP9-Luc* transgene in the lung. C57BL/6Tg(*proMMP9-Luc*) mice were injected s.c. with 10^4 B16F1 melanoma cells. Nineteen days post-injection, lungs were collected, and the individual mice were analyzed *ex vivo* using (A) bioluminescent imaging or (B) the luciferase activity assay. (C) Increased expression of the endogenous MMP-9 in lungs collected from C57BL/6-Tg(*proMMP9-Luc*) mice injected with B16F1 melanoma cells. Lungs collected from non-injected C57BL/6-Tg(*proMMP9-Luc*) mice were used as controls. GAPDH was used as a loading and specificity control.

Figure 2.4: Activation of the proMMP9-Luc transgene in the spleen of tumor-bearing animals. C57BL/6-Tg(proMMP9-Luc) mice were injected with 10^4 B16F1 melanoma cells. At 20-22 days post-injection, spleens were collected and luciferase activity measured from tissue extracts. (A) Luciferase activity in spleens from tumor-bearing Tg animals injected with B16F1 cells (\blacktriangle ; n = 8) compared to spleens from control animals (\blacksquare ; n = 4). Results are representative of two independent experiments. (B) Luciferase activity from spleen extracts prepared from normal C57BL/6 mice injected with B16F1-Luc melanoma cells (B16F1-Luc; \blacktriangle). Spleens from control age- and sex-matched C57BL/6 animals were used as controls (CTRL; \blacksquare). Figure 2.5: In vitro stimulation of the proMMP9-Luc transgene in splenocytes. (A) Splenocytes were collected from C57BL/6-Tg(proMMP9-Luc) mice and co-cultured (n = 6) with B16F1 melanoma cells for 20 h with or without Con A (1 μ g/ml). (B) Transwell experiments using co-culture conditions as described in (A). Results are representative of three independent experiments.

Figure 2.6: Effect of dexamethasone (DXM) on MMP-9 expression in paws. (A) Schematic representation of the treatment regimen using i.p. injections of DXM (0.5 mg/kg/day). Bioluminescent imaging of the luciferase activity was performed at days 5 and 19. (B) Pie chart representation of the response of C57BL/6-Tg(*proMMP9-Luc*) mice to DXM as compared to that of the control mice injected with PBS. Results are representative of triplicate images acquired for each paw before (T = 0) and at different times after the initial treatment with DXM (n = 20) or control PBS (n = 20). (C) *In vivo* imaging of the *proMMP9-Luc* transgene expression in two representative paws of C57BL/6Tg(*proMMP9-Luc*) mice injected with PBS (Control) or DXM.

9. FIGURES



Figure 2.1

CHAPITRE 2



Figure 2.2







83



A.

B.





A.

B.







10. CONCLUSION

En résumé, nous avons développé un nouveau modèle de souris transgénique basé sur l'imagerie à bioluminescence afin d'étudier l'expression du gène *mmp-9* dans différentes conditions physiologiques et pathologiques. Ce modèle préclinique facilitera la mesure de l'expression du gène *mmp-9* durant la progression d'une maladie ou dans le cadre du développement de nouveaux médicaments anticancéreux.

Expression of galectin-7 in human and murine melanomas.

1. RÉSUMÉ

La galectine-7 est normalement exprimée dans l'épithélium stratifié. principalement dans l'épiderme. Dans le cancer, son expression est souvent altérée et son rôle est controversé. D'un côté, elle aurait une activité anti-tumorale puisque la galectine-7 a été identifiée comme un gène induit par p53 et qui est associé à la sensibilité à l'apoptose de plusieurs types cellulaires. Cependant, dans certains cas, une expression élevée de cette protéine corrèle avec un phénotype agressif des cellules cancéreuses, ce qui l'associe à une fonction dans la progression tumorale. Dans cette étude, nous avons documenté la fonction et l'expression de la galectine-7 dans les mélanomes. L'analyse du profil génomique a démontré que la galectine-7 est rarement détectée dans les biopsies de mélanomes humains. Ce patron d'expression dans les biopsies de mélanomes humains corrèle avec le niveau protéique de galectine-7 retrouvés lors d'une analyse immunohistochimique. L'utilisation du modèle de mélanome murin B16F1 a démontré que l'expression de galectine-7 est augmentée dans les cellules de mélanome retrouvées dans la tumeur primaire et les métastases aux poumons. Des expériences in vitro ont permis de démontrer que la surexpression de la galectine-7 diminue la motilité, augmente la résistance à l'apoptose et l'expression du gène egr-1 dans les cellules de mélanome. D'autres part, des expériences in vivo ont démontré que la surexpression de galectine-7 n'est pas suffisante à elle seule pour moduler la croissance de tumeurs sous-cutanées, ni la dissémination des cellules B16F1 aux poumons.

Accepted in PLoS ONE

CHAPITRE 3

PONE-S-12-40254R1

Expression and functions of galectin-7 in human and murine melanomas.

Katherine Biron-Pain¹, Andrée-Anne Grosset¹, Françoise Poirier², Louis Gaboury³, and Yves St-Pierre^{1*}.

 ¹ INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Qc, Canada, H7V 1B7;
 ² Institut Jacques Monod, CNRS, UMR 7592, Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, F-75205 Paris, France.

³ Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie, Montreal, Québec, Canada

Key words : galectin-7, melanoma, apoptosis, metastasis, motility.

* To whom correspondence should be addressed : E-mail : yves.st-pierre@iaf.inrs.ca

2. ABSTRACT

The identification of galectin-7 as a p53-induced gene and its ability to induce apoptosis in many cell types support the hypothesis that galectin-7 has strong antitumor activity. This has been well documented in colon cancer. However, in some cases, such as breast cancer and lymphoma, its high expression level correlates with aggressive subtypes of cancer, suggesting that galectin-7 may have a dual role in cancer progression. In fact, in breast cancer, overexpression of galectin-7 alone is sufficient to promote metastasis to the bone and lung. In the present work, we investigated the expression and function of galectin-7 in melanoma. An analysis of datasets obtained from whole-genome profiling of human melanoma tissues revealed that galectin-7 mRNA was detected in more than 90% of biopsies of patients with nevi while its expression was more rarely found in biopsies collected from patients with malignant melanoma. This frequency, however, was likely due to the presence of normal epidermis tissues in biopsies, as shown our studies at the protein level by immunohistochemical analysis. Using the experimental melanoma B16F1 cell line, we found that melanoma cells can express galectin-7 at the primary tumor site and in lung metastasis. Moreover, we found that overexpression of galectin-7 increased the resistance of melanoma cells to apoptosis while inducing de novo egr-1 expression. Overexpression of galectin-7, however, was insufficient to modulate the growth of tumors induced by the subcutaneous injection of B16F1 cells. It also failed to modulate the dissemination of B16F1 cells to the lung.

3. INTRODUCTION

Melanoma accounts for 4% of dermatological cancers but is responsible for 80% of mortalitics related to skin cancer (558). In addition, its incidence is increasing at a higher rate than other cancer types. Most melanomas are resistant to chemotherapy and immunotherapy, most likely as a result of resistance to apoptosis (559,560). Systemic treatments include the administration of nonspecific immune-stimulating cytokines, immunization with cancer cells or molecules, adoptive T cell transfer, small inhibitors of melanoma oncogenes and blocking antibodies against inhibitory immune molecules, like lpilimumab (561). Therefore, it is of great interest to identify new, relevant biological targets to discover new therapeutics against melanoma.

Galectins are a family of 15 animal lectins with a unique carbohydrate recognition domain that binds to β -galactoside derivatives (3.16). They can have intracellular (cytoplasmic and/or nuclear) or extracellular functions, even without a signal sequence, which is essential for the classical secretory pathway (12,89). Galectins function during embryonic development, wound healing, apoptosis, protein trafficking, intercellular adhesion, cell migration, immune responses and cancer (1,562,563). Galectin-1 and galectin-3 are the most well studied members of the galectin family, but evidence has shown that other galectins are also important and have specific expression patterns. This is true for galectin-7, which was initially described as a marker for keratinocytes (321,322). In normal tissues, the expression of galectin-7 is normally confined to stratified epithelia (328). In epithelial cancer, however, its expression is often significantly altered and may have distinct implications. In a model of human colon carcinoma, for instance, the exogenous expression of galectin-7 aids in eliminating tumor cells through its proapoptotic function (350). This connection between galectin-7 and apoptosis is supported by studies showing that galectin-7 is induced in human colon cancer cells following activation of the p53 pathway (333). Galectin-7 is also associated with the sensitivity of human cervical carcinoma cells to apoptosis induced by chemotherapeutic agents (358). However, galectin-7 has been associated with cancer progression in chemically induced models of rat mammary carcinoma (359) and hypopharyngeal squamous cell carcinoma
(564). Moreover, galectin-7 overexpression in murine lymphoma and breast cancer cells has been shown to increase their ability to metastasize (297,320,364). This dual role in controlling tumor growth is not unusual for members of the galectin family; for example, it has been well documented for galectin-3 (1,565). In the present work, we have investigated the expression pattern of galectin-7 in melanoma and used a well-characterized melanoma model to study its functional relevance.

4. MATERIAL AND METHODS

4.1. Mice

Breeder pairs for a C57BL/6 mouse colony were purchased from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Galectin-7-deficient mice (KOG7) in a C57BL/6 background have been described previously (22). Male and female mice were bred in our animal facility and maintained under specific pathogen–free conditions in accordance with institutional guidelines. All animal studies were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (CISAU) of the INRS-Institut Armand-Frappier.

4.2. Cell Lines and Reagents

The mouse melanoma B16F1 cell line was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). The aggressive variant B16F10 cell line was a generous gift from Dr. Alain Lamarre (INRS-Institut Armand-Frappier) (566). The human melanoma cell lines (888mel, 537mel, SK23 and Mel-FB) were a generous gift from Dr. Réjean Lapointe (Research Centre, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) (567). The mouse thymic lymphoma line 164T2 and its aggressive variant S19 have been previously described (568). All cell lines were maintained in RPMI 1640 complete medium supplemented with 8% (v/v) FCS, 2 mM L-glutamine, 10 mM Hepes buffer, 1 mM sodium pyruvate and 0.075% sodium bicarbonate. All cell culture products were purchased from Life Technologies (Burlington, ON, Canada). Anti-cleaved PARP-1 antibody was purchased from Epitomics (Burlingame, CA); anti-β-actin antibody was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO); anti-EGR-1 antibody was purchased from Santa Cruz (CA, USA); anti-human galectin-7 monoclonal antibody was purchased from

R & D Systems; methyl [3H]thymidine was purchased from Perkin Elmer (Waltham, MA); cell culture lysis reagent (CCLR) and passive lysis buffer were purchased from Promega (Madison, WI); RIPA lysis buffer was purchased from Thermo Scientific (Rockford, USA); and buffered formaldehyde solution was purchased from Fisher Scientific (Toronto, ON). All other reagents were purchased from Sigma-Aldrich unless otherwise indicated.

4.3. RNA Isolation and Semiquantitative PCR

Total RNA was isolated from tissues using Trizol reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen Canada, Inc., Burlington, ON). Briefly, total RNA (2 mg) was reverse transcribed using Omniscript reverse transcriptase (Qiagen, Mississauga, ON) and PCR amplified using the following conditions: 94°C for 0.5 min, 58°C for galectin-7 and β -actin or 60°C for Egr-1 for 1 min, and 72°C for 1 min. Then, a final extension step was performed at 72°C for 10 min. The primers used for PCR amplification were (5'-CCATGTCTGCTACCCATCAC-3'; in exon 2) for sense murine galectin-7 and (5'-GCTTAGAAGATATTCAATGAATGC-3'; in exon 5) for antisense; (5'-TAATAGCAGCAGCAGCAGCAGC-3') for sense murine EGR-1 and (5'-GTCGTTTGGCTGGGATAACTCG-3') for antisense, and (5'-CATGGATGACGATAT-CGCTGCGC-3') for sense β -actin and (5'-GCTGTCGCCACGCTCGGTCAGGAT-3') for antisense. Amplification was carried out in a thermal cycler (model PTC-100, MJ Research, Watertown, MA) using equal amounts of RNA that was reverse transcribed and amplified by PCR for 35 cycles with gene-specific primers. Each amplification step was performed in the linear range for each gene. β -actin mRNA was amplified as an internal control by RT-PCR using specific primers. Amplified products were analyzed by electrophoresis on 1.2% agarose gels for galectin-7 and β -actin or 1.8% gels for Egr-1 using Sybr Safe staining and UV illumination.

4.4. Generation of Stable Transfectants Expressing Luciferase and Galectin-7

To obtain stable B16F1-Luc transfectants expressing the *luciferase* reporter gene under the control of the SV40 promoter, B16F1 cells were co-transfected with linearized pGL3-(SV40) vector (Promega) and the pSra vector that conferred puromycin resistance. After 48 h of culture in complete medium, transfected cells were grown in complete

Accepted in PLoS ONE

CHAPITRE 3

medium containing 2 μ g/mL of puromycin before individual colonies were selected and expanded. Clones expressing constitutively high levels of luciferase (clones #1 and #9) were then used to generate stable transfectants expressing constitutively high levels of galectin-7. For this purpose, we used the pRc-CMV2-galectin-7 vector encoding the murine *galectin-7* gene (GenBank accession no. AF 331640). Individual colonies were selected, expanded and assayed for galectin-7 expression by RT-PCR, ELISA and confocal microscopy. Controls were generated using the empty pSra vector.

4.5. Proliferation Assay

Three clones of B16F1 cells overexpressing galectin-7 (B16F1-G7 #5, 10 and 14) and three control cell lines (B16F1-sr α #1, 2 and 3) were seeded at 2 x 10³ cells/well in 96-well culture plates. Once the cells were confluent, quercetin was added at 10 µg/mL (dissolved in DMSO) for 72 h. In control wells, 1% DMSO solution was added. DNA synthesis was assayed by adding 1 µCi of methyl-[³H]thymidine/well and incubating the cells for 16 h. Radioactivity was measured after adding a scintillation cocktail using a scintillation counter (Trilux, 1450 microbeta, Wallac). The experiment was performed in triplicate and repeated three times.

4.6. Luciferase Assay

Luciferase activity in cell lines and tissues was measured as previously described (569). Briefly, for *ex vivo* imaging, mice were injected i.p. with 150 mg/kg of D-luciferin. Ten minutes later, the mice were sacrificed, and lungs were collected. After imaging, lungs were homogenized in cell culture lysis reagent (CCLR), snap frozen in liquid nitrogen and thawed at 37°C before luciferase assays. For cell lines, B16F1 transfectant cells (10^6 cells) were lysed in 100 µL of CCLR containing phenylmethylsulfoxide at 4°C for 1 h and then vortexed for 30 sec. After centrifugation for 20 min at 4°C, the protein concentration of the supernatant was measured by the Bradford method. Equal amounts of protein were used to determine luciferase activity. Luciferase activity was measured using the Luciferase Assay System and a Lumat LN 9507 Luminometer (Berthold Technologies, Oak Ridge, TN).

4.7. Tumorigenic and Metastatic Assays

Male or female C57BL/6 mice and galectin-7-deficient mice (KOG7) (6 to 8 weeks old) were injected subcutaneously (s.c.) into the left flank with 5 x 10^4 B16F1 cells. Animals were monitored periodically for tumor growth, which did not exceed a volume of 2500 mm³. The length (L) and width (W) of the tumor were measured using calipers fitted with a vernier scale, and the size of the tumor was calculated using the formula L² x W x 0.4. When the maximum tumor volume was reached, mice were sacrificed, and the tumors were divided and frozen for PCR analysis or fixed in a buffered formaldehyde solution for immunohistochemistry (IHC). To induce the dissemination of B16F1 melanoma cells in the lung, male or female C57BL/6 mice (6 to 8 weeks old) were injected in the tail vein with 2 x 10^5 B16F1 luciferase transfectant cells that were either control or overexpressed galectin-7. Animals were monitored periodically for clinical signs of tumor growth. When moribund or at a specific time, the mice were sacrificed, and lungs were collected and examined by *ex vivo* imaging. Tissues were homogenized in CCLR for luciferase assays as described above.

4.8. Immunohistochemistry

Primary and metastatic lung tumors were fixed and processed for IHC analysis as described previously (320). Briefly, 3-µm-thick sections were prepared from each tissue sample. Immunostaining reactions for galectin-7 were carried out using the Discovery XT automated immunostainer (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). Deparaffinized sections were incubated in cell conditioning solution (pH 8.0) for antigen retrieval and then stained for 60 min with an anti-human galectin-7 monoclonal antibody at a 1:150 dilution. The slides were counterstained with hematoxylin and bicarbonate. Each section was scanned at a high resolution (Nanozoomer, Hammamatsu Photonics K.K). A total of 13 human malignant melanomas and 47 nevus were analyzed from samples obtained with a written informed consent and with the approval of the research ethics committee of the research center at the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal.

4.9. ELISA Assays

Cells were lysed with RIPA lysis buffer at 4°C for 1 h and then centrifuged at 12000 rpm for 20 min at 4°C. Protein concentrations were measured by the Bradford method. Amounts of 100 or 200 μ g of total protein per well were analyzed using the murine galectin-7 ELISA kit (R & D Systems) according to the manufacturer's instructions. For supernatant analysis, aliquots of 4 x 104, 1.3 x10³ and 450 cells were plated in 96 wells plate in 100 μ L of culture media and incubated for 24, 48 and 72 h respectively to obtain 100% confluent cells in each well. The total volume of supernatant was used for the ELISA assay.

4.10. Motility Assay

Confluent cultures grown in six-well culture plates were wounded with a 200 μ L pipette tip (time 0) and incubated for 16 h. The wells were inspected with an inverted light microscope (Nikon eclipse TE2000-U) using a 10X objective. Images were captured using a coolSNAP HQ camera and analyzed using the Metamorph software (Universal Imaging Corporation).

4.11. Transient Transfection

B16F1 cells and cells from a mix of three B16F1-G7 clones (G7#5, #10, and #14) were plated at a concentration of 10^5 cells per well in six-well plates and incubated at 37°C overnight. Thereafter, cells were co-transfected with 0.2 µg of PGL3-EGR-1 reporter construct and 0.2 µg of pRLSV40-Renilla vector, for transfection control, using 5 µL of Lipofectamine 2000 reagent according to the manufacturer's protocol (Invitrogen). After 24 h, transfected cells were treated with increasing concentrations of quercetin (0-100 µg/mL) for 24 h. Cells were lysed with 100 µL of passive lysis buffer containing PMSF at 4°C for 1 h and centrifuged for 20 min at 4°C. Equal amounts of protein were analyzed by the Dual-Luciferase Assay system according to the manufacturer's instructions (Promega).

4.12. Statistical Data Analysis

Data are presented as means \pm SD. Student *t* test was used to test for statistical significance that was established at p < 0.05.

5. RESULTS

5.1. Galectin-7 expression in human melanoma tissues.

We first conducted an in silico analysis of galectin-7 expression using datasets from the Gene Expression Omnibus (GEO) repository of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). For this purpose, we examined a dataset of microarray data obtained from the profiling of 45 malignant melanomas and 18 nevi (GDS1375) (570). These data showed that galectin-7 was detected at the mRNA level in all biopsies of normal skin (n =7) and in most biopsies collected from patients with nevi (17/18) (Fig. 3.1a). In biopsies obtained from patients with malignant melanomas, galectin-7 expression was relatively rare (9/45) (Fig. 3.1b). Similar expression patterns were also observed for benign versus malignant melanoma in a dataset collected from the whole-genome profiling of the melanoma progression pathway (GDS1989) (571). Low expression levels of galectin-7 were also observed in both human and mouse malignant melanoma cell lines (572) (Fig. 3.1c and supplementary figure S3.1). Interestingly, however, we found that galectin-7 can be upregulated in B16 melanoma cells that had been injected subcutaneously into normal C57BL/6 syngeneic mice (Fig. 3.2a). IHC staining of B16 tumors in galectin-7-deficient (KOG7) mice confirmed that galectin-7 expression in the B16 tumors was not due to expression by surrounding stromal cells (Fig. 3.2b). Interestingly, a stronger galectin-7 staining was observed in KOG7 mice as compared to WT mice. The reason for such a difference is unclear at present. This upregulation of galectin-7 in B16 melanoma cells in vivo was also observed in lung biopsies of KOG7 mice injected i.v. with B16 cells (Fig. 3.2c).

5.2. Generation of a B16 melanoma cell line constitutively expressing galectin-7.

Because overexpression of galectin-7 is known to regulate tumor growth and metastasis in multiple tumor cell types, we next investigated whether galectin-7 could modulate the growth of primary tumors and the dissemination of metastasis. For this purpose, we generated a series of stable B16 transfectants constitutively expressing galectin-7 at both the mRNA and protein levels (**Fig. 3.3**). The transfectants were also co-transfected with an expression vector encoding the *firefly luciferase* gene to facilitate *in*

Accepted in PLoS ONE

CHAPITRE 3

vivo follow-up of metastases to the lung. As previously reported, galectin-7 expression was restricted to the intracellular compartment and was not detected in the cultured supernatant of B16 transfectants (Fig. 3.3c and supplementary figure S3.2).

5.3. Galectin-7 reduces the motility, induces resistance to apoptosis and increases egr-1 (Early growth response protein 1) in B16 melanoma cells.

The expression of galectin-7 in B16 cells significantly reduced their cellular motility (Fig. 3.4). While galectin-7 did not affect the *in vitro* proliferation rate of the cells, it did inhibit their sensitivity to apoptosis induced by quercetin in a dose-dependent manner (Fig. 3.5 and supplementary figure S3.3). This effect of galectin-7 on quercetin-induced apoptosis was concomitant with its ability to upregulate both the mRNA and protein levels of EGR-1, consistent with previous results obtained in human colon carcinoma cell line (573). EGR-1 is a master regulator that plays an important role in a variety of cellular processes in cancer cells (574). The ability of galectin-7 to increase EGR-1 at the transcriptional level in B16F1 cells was confirmed using a reporter vector encoding the *egr-1* promoter (Fig. 3.5d).

5.4. In vivo growth of B16 cells expressing high levels of galectin-7.

We next investigated whether galectin-7 could modulate the tumor progression of B16 melanoma cells. For this purpose, we first compared the growth of B16 cells expressing high levels of galectin-7 (B16-G7) with control cells (B16-Sr α). Our results showed that mice injected with B16 cells had similar survival rates regardless of galectin-7 expression (26 ± 2.3 days (n=12) for galectin-7-expressing cells vs. 25.9 ± 3.7 days (n=12) for controls) (**Fig. 3.6a**). This result was observed in independent experiments using either 1 x 10⁴ or 5 x 10⁴ cells (*data not shown*). To study the effect of galectin-7 on melanoma metastasis, we used genetically engineered B16F1 cells overexpressing luciferase. This cell line model facilitates cancer cell detection in target organs with a luciferase assay or the *ex vivo* bioluminescence imaging of organs. Although we observed a time-dependent increase in the metastatic load in the lung, the number of metastases was similar in mice injected with galectin-7 transfectant cells compared with those injected with control cells (**Fig. 3.6b and 3.6c**).

6. DISCUSSION

Galectin-7 is normally expressed in stratified epithelia, most notably in the skin epidermis. In cancer, its expression is often altered, although its role in cancer biology is debated. A number of indications have suggested that galectin-7 may potentially be important in melanoma proliferation, invasion, and metastasis. Like other members of the galectin family, galectin-7 has been shown to either positively or negatively modulate apoptosis and tumor growth (575). In colon cancer, for example, galectin-7 has an antitumorigenic function (350), in contrast to its pro-tumorigenic function reported in lymphoma, breast cancer, squamous cell carcinoma of the tongue and esophagus, and thyroid malignancies (297,320,350,360,362,363). In skin cancer, a recent study has shown that galectin-7 is induced during neoplastic transformation of the skin following exposure to cypermethrin, a highly carcinogenic insecticide used for agricultural and domestic applications (576). Because melanoma represents one of the most dangerous forms of skin cancer, we investigated the role of galectin-7 in melanoma. In the present work, we have shown that 1) galectin-7 is rarely expressed in biopsies of malignant melanoma, 2) galectin-7 reduces the motility of B16F1 cells, and 3) galectin-7 increases the resistance of B16F1 cells to apoptosis and the expression of EGR-1. We also found that overexpression of galectin-7 is insufficient to modulate the growth of primary tumors or the dissemination of B16 melanoma cells to the lung.

Our data showing that galectin-7 reduces the motility of melanoma cells are novel and worth investigating further in the context of the ability of Bcl-2 to bind galectin-7 (352). Although the functional relevance of such an interaction is likely to explain the ability of galectin-7 to modulate apoptosis, it could also be important for cell motility because as suggested by a recent study showing that cytoplasmic Bcl-2 inhibits cell motility and enhances F-actin polymerization during cell spreading (577). Moreover, Villeneuve *et al.* (352) have shown that in keratinocytes, galectin-7 colocalizes with cortactin, an actin-binding protein implicated in membrane ruffle formation. It is noteworthy, however, that reduced *in vitro* motility did not affect the number of metastases to the lung, suggesting caution when assigning correlations between *in vitro* and *in vivo* observations. Although cell motility and/or EGR-1 are likely to be important in tumor progression, it is logical to assume that their relative importance is tumor and context dependent.

In silico analysis of public datasets has shown that galectin-7 mRNA is detected in most if not all nevi. Our IHC data and the fact that galectin-7 is constitutively expressed at high levels in skin epidermis suggest that such signal likely represents that presence of epithelial cells in the biopsies of nevi. Such explanation may also be true for malignant melanoma. These results emphasize the risk of surrounding tissue contamination when performing analysis of biopsies. Nevertheless, our results showing that B16 cells do express galectin-7 when transplanted *in vivo* leaves open the possibility that in rare cases, galectin-7 could be expressed in malignant melanoma cells. Future IHC analysis on normal melanocytes and in a larger number of biopsies of nevus and melanoma are needed to determine the utility of galectin-7 as a predictive biomarker in melanoma. Our *in vivo* results using stable transfectants overexpressing galectin-7 suggest, however, that if indeed galectin-7 can be found in rare cases of melanoma, it probably plays a very limited role in tumor growth and apoptosis. The importance of galectin-7 in melanoma is thus very distinct from what has been observed in other types of epithelial cancer.

7. ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Diane Tremblay for her excellent technical support and Dr. J. Thomas Sanderson for the use of the IVIS 100 imaging system.

8. FIGURE LEGENDS

Figure 3.1: Galectin-7 expression in human melanoma tissues. A) Percentage of positive biopsies of normal skin (n=7), nevus (n=18) and malignant melanoma (n=45), as determined by the *in silico* analysis of galectin-7 expression from a microarray of human biopsies (570). B) Representative graph of galectin-7 mRNA expression in each biopsy described in (A). C) Detection of galectin-7 by immunohistochemistry in representative biopsies of nevi and malignant melanoma. Overall, 13 malignant melanomas and 47 nevi were tested.

Figure 3.2: Increased galectin-7 expression in B16F1 primary tumors and lung metastases. Primary tumors were collected at necropsy 18 days after the subcutaneous injection of B16F1 cells ($5x10^4$ cells) in C57BL/6 (WT) and galectin-7-deficient mice (KOG7). (A) RT-PCR analysis of galectin-7 mRNA expression in two B16F1 primary tumors from WT and KOG7 mice in comparison with the B16F1 cell line. Actin was used as a loading and specificity control. B) Immunohistochemistry for galectin-7 in normal skin (i, ii) and B16F1 primary tumors (iii, iv) in WT and KOG7 mice. These galectin-7-positive structures located in the suprabasal epidermis have been reported before and likely represent suprabasal keratinocytes, which are known to express galectin-7 constitutively (322). Control stained without HRP and in absence of Abs did not show any detectable staining in both wt and KOG7 mice. C) Immunohistochemistry for galectin-7 in a lung collected 20 days post-injection from one KOG7 mouse injected intravenously via the tail vein with B16F1 cells ($2x10^5$ cells) in comparison with a normal lung. Scale bars in all immunohistochemistry images represent 600 μ M.

Figure 3.3: Validation of B16F1 transfectants overexpressing luciferase and/or galectin-7. A) RT-PCR analysis for galectin-7 mRNA expression in transfectant cells overexpressing galectin-7 with or without luciferase in comparison with a control B16F1 cell line (F1). The aggressive murine lymphoma cell line S19 (+) was used as a positive control. Actin was used as a loading and specificity control. B) Luciferase assay of three B16F1 transfectant cell lines overexpressing luciferase and cotransfected with pRc-CMV2-galectin-7 in comparison with the control B16F1 cell line. C) Confocal microscopy

for galectin-7 in control B16F1 cells (iii) and galectin-7 transfectant cells (G7#5) (iv); these cells were also visualized (i, ii).

Figure 3.4: Effect of galectin-7 on B16F1 cell migration. A) Images of the motility assay after the wounding of confluent B16F1 cells overexpressing galectin-7 (B16-G7) or controls (B16-Sr α) at T=0 and T=16 hr. A mixture of three clones of B16F1-G7 was used (G7 #5, 10 and 14). B) Representative graph of the results obtained in (A).

Figure 3.5: Effect of quercetin on B16F1 cells overexpressing galectin-7 on apoptosis and EGR-1 expression. B16F1 cells overexpressing galectin-7 (+) or controls (-) were treated with various doses of quercetin. A) Apoptotic sensitivity was analyzed by western blotting for cleaved PARP-1 detection. B) RT-PCR analysis of galectin-7 and EGR-1 mRNA expression. C) Western blot analysis for EGR-1 detection, 293 cells transfected with EGF were used as a positive control. Actin was used as a loading and specificity control. D) Dual luciferase assay of B16F1 transfectant cells overexpressing galectin-7 (\Box) or controls (**•**) co-transfected with luciferase reporter plasmids with an EGR-1 promoter and pRLSV40-Renilla vector as a transfection control and treated with various doses of quercetin for 24 h. A mixture of three clones of B16F1-G7 was used (G7 #5, 10 and 14) for all of these experiments.

Figure 3.6: Effect of galectin-7 in B16F1 cells on survival and metastasis in lungs. A) Survival curve of C57BL/6 mice injected i.v. with B16F1 transfectant cells overexpressing galectin-7 (\Box) or controls (\blacklozenge) (2x10⁵ cells) (n= 8-10). B) Luciferase assay of lungs of C57BL/6 mice sacrificed at 9, 12, 15 or 18 days after the i.v. injection of a mixture of B16F1 luciferase transfectant cells overexpressing galectin-7 (+) or control (-) (n = 3-8). Normal lungs were used as a negative control (T: 0; n=2). C) *Ex vivo* imaging of a lung metastasis, as seen in (B), of B16F1 cells overexpressing galectin-7 (iii and v) or control cells (ii and iv) at 9 and 18 days in comparison with control lungs (i).

9. FIGURES



10

Figure 3.1

C

В

104









īv

CTRL

G7#5

11



















1 47 64 <i>31</i> 0	
ii 🐼 😒 📢	🏭 🐝 😸
iv 💽 🌮 🥎	v 💽 🐑 🚥
	🐼 🕸 🖤



Supplementary figure S3.1: Expression of galectin-7 in murine and human melanoma cell lines. Galectin-7 expression in the aggressive variant B16F10 murine melanoma cells in comparison to the parental cell line B16F1 analyzed by A) RT-PCR for galectin-7 mRNA expression (Actin was used as loading and specificity control) and B) ELISA assay for galectin-7 concentration in comparison with 164T2 non aggressive lymphoma cells and its aggressive variant S19. C) ELISA assay for galectin-7 concentration in human melanoma cell lines (888mel, 537mel, SK23 and Mel-FB) in comparison to MDA-MB-468 breast cancer cell line as positive control.



Supplementary figure S3.2 : ELISA assay for galectin-7 concentration in culture supernatant of B16F1 tranfectant cells overexpressing (\Box) or not (\blacksquare) galectin-7 after 24, 48 and 72 hours of incubation. Lysed cells from this experiment were used as positive control.



Supplementary figure S3.3 : Cellular proliferation was analyzed by [3H]thymidine incorporation after 72 hours of quercetin ($10\mu g/ml$) treatment in B16F1 transfectant cells overexpressing (\Box) or not (\blacksquare) galectin-7. Results are representative of three independent experiments.

10. CONCLUSION

L'analyse *in silico* d'une base de données publique a démontré que l'ARNm de la galectine-7 est détectée dans plus de 90% des biopsies de nevus bénins. Les résultats de l'analyse immunohistochimique et le fait que la galectine-7 est hautement exprimée dans l'épiderme de la peau suggère que cette expression provient des cellules épithéliales retrouvées dans les biopsies de nevus bénins. Cette explication pourrait s'étendre aussi aux biopsies de mélanomes malins. Ce résultat démontre le risque de contamination des tissues lors de l'analyse des biopsies. Cependant, l'augmentation de l'expression de galectine-7 dans les tumeurs primaires et secondaires de mélanome B16F1 suggère que, dans de rare cas, la galectine-7 pourrait être exprimée dans les cellules de mélanome malin. Cependant, les résultats d'une étude *in vivo* suggèrent que même si cette protéine était exprimée dans les mélanomes, elle ne jouerait probablement qu'un rôle très limité dans la croissance tumorale et la dissémination des cellules cancéreuses. L'importance de la galectine-7 dans les mélanomes est donc très différente de ce qu'il a été observé dans d'autres types de cancers épithéliaux.

Discussion générale et perspectives

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

Au moment d'entreprendre mon projet de thèse, la littérature définissait la galectine-7 comme un marqueur de kératinocytes (321), mais aussi comme une protéine pouvant être impliquée dans la progression tumorale. Comme d'autres membres des galectines, la galectine-7 peut moduler positivement ou négativement l'apoptose et la croissance tumorale (575). Cette protéine peut avoir une fonction pro- ou anti-tumorale dépendamment du type de cancer. Cela a bien été documenté dans des études sur le carcinome du colon, les lymphomes et le cancer du sein (297,320,338,350). Son expression est aussi modulée dans d'autres types de cancers comme les carcinomes de cellules squameuses de la langue et de l'œsophage, les carcinomes cervicaux et les cancers thyroïdiens (358,360,362,363). Une étude récente sur le cancer de la peau a démontré que la galectine-7 est induite durant la transformation néoplasique de la peau suite à l'exposition à la cypermethrin, un insecticide hautement cancérigène qui a des applications en agriculture et au niveau domestique (576). Bien que les mélanomes comptent seulement pour 4% des cancers dermatologiques, ils sont responsables d'environ 80% des décès reliés au cancer de la peau (558). Comme le mélanome représente une des formes les plus dangereuses de cancer de la peau, nous avons donc évalué la contribution de la galectine-7 dans ce type de cancer. Nos travaux présentés au chapitre 3 ont démontré que 1) la galectine-7 est rarement exprimée dans les biopsies de mélanomes malins, autant au niveau de l'ARNm que de la protéine; 2) la galectine-7 réduit la motilité des cellules de mélanome murin B16F1 et ; 3) la galectine-7 augmente la résistance des cellules B16F1 à l'apoptose induite et augmente l'expression de EGR-1. Toutefois, nos études in vivo ont démontré que la surexpression de la galectine-7 n'est pas suffisante à elle seule pour moduler la croissance des tumeurs primaires, ni la dissémination des cellules B16F1 aux poumons. Cela n'est toutefois pas surprenant, puisque la plupart des gènes pro-cancéreux sont généralement incapables à eux seuls de moduler le cancer. Ils doivent coopérer à plusieurs niveaux, par exemple dans la résistance à l'apoptose, l'augmentation de la motilité et l'échappement du système immunitaire (578,579).

1.1. L'expression de galectine-7 est peu fréquente dans les mélanomes.

La galectine-7 est exprimée dans plusieurs types de cancers, comme les carcinomes thyroïdiens, les cancers agressifs de l'hypopharynx, de l'œsophage et de la langue et les cancers du sein (320,360,362,363,564). Nous avons aussi démontré par PCR en temps réel que la galectine-7 est exprimée dans certains types de lymphomes et leucémies humaines, comme les leucémies lymphoïdes chronique et les lymphomes folliculaires (364). Afin d'identifier si la galectine-7 est exprimée dans les mélanomes malins, nous avons analysé le profil génomique de 45 mélanomes malins et 18 nevus bénins humains (570). L'analyse in silico au niveau de l'ARNm démontre que la galectine-7 est détectée dans plus de 90% des biopsies de nevus bénins, mais très rarement dans les mélanomes malins (9/45). Cependant, comme la galectine-7 est exprimée dans l'épiderme normal (321) et que les résultats de l'analyse immunohistochimique démontrent que la galectine-7 est localisée dans une structure définie des biopsies de nevus bénins, comme dans la peau normale, cela suggère que l'expression de galectine-7 dans les nevus bénins provient des cellules épithéliales normales. Cette explication pourrait s'étendre aussi aux biopsies de mélanomes malins. Ceci démontre qu'il faut être prudent lors de l'analyse de biopsies, puisqu'il y a un risque de contamination par des cellules péritumorales. Pour cette raison, nous avons utilisé des souris déficientes en galectine-7 pour certaines de nos études in vivo afin d'outrepasser cette problématique. Des études in vivo ont démontré qu'il y a une augmentation de l'expression de galectine-7 dans les tumeurs primaires et secondaires de mélanome B16F1 ce qui suggère que, dans de rare cas, la galectine-7 pourrait être exprimée dans les cellules de mélanome malin. Sa présence dans un pourcentage significatif de mélanome pourrait avoir une valeur prédictive clinique, que ce soit au niveau de la récurrence, de la réponse aux traitements, ou du taux de survie. Des études sur des cohortes plus grandes seront nécessaires afin d'évaluer l'utilité de la galectine-7 comme bio-marqueur de mélanomes. La galectine-7 pourrait alors s'ajouter à la liste actuelle de marqueurs de mélanome constituée, entre autre, des facteurs de transcription MITF (microphtalmia-associated transcription factor) et MYC dont l'expression est augmentée dans environ 20% des mélanomes, des suppresseurs de tumeurs pTEN et CDKN2A^{p16} qui sont mutés dans une forte proportion des mélanomes (entre 30 et 60%) et des kinases ou facteurs de signalisation comme BRAF, NRAS et KIT qui sont mutés dans

environ 50, 20 et 1 % des mélanomes, respectivement. Les voies de signalisation les plus impliquées dans le mélanome sont la voie MAPK et AKT-PI3K. Des thérapies ciblées contre un mutant de BRAF (BRAF-V600E) et de KIT ont donné de bonnes réponses cliniques, mais ne sont pas durables. Une combinaison de thérapies est nécessaire (580).

1.2. Mécanisme d'action de la galectine-7 dans les cellules de mélanome B16F1.

Dans le chapitre 3, nous avons voulu déterminer si l'expression de la galectine-7 dans le mélanome conférait un certain avantage à celui-ci. Nous avons alors étudié son impact sur la motilité des cellules de mélanome, sur l'apoptose ainsi que sur l'expression du gène *Egr-1*, une protéine impliquée dans la progression tumorale.

1.2.1. La galectine-7 diminue la motilité des cellules de mélanome.

Nous avons étudié l'effet de la galectine-7 sur la motilité des cellules de mélanome en créant une blessure à l'intérieur d'une culture confluente de cellules B16F1 surexprimant ou non la galectine-7. La mesure de la blessure au temps 0 et après 16 heures permet d'évaluer la vitesse de migration de ces cellules à l'intérieur de la blessure. Nos résultats démontrent que la galectine-7 réduit la motilité des cellules de mélanome. À ma connaissance, la seule étude impliquant la galectine-7 intracellulaire au niveau de la motilité cellulaire a été réalisée dans les kératinocytes. Cette étude a démontré que la galectine-7 co-localise avec la cortactine, une protéine de liaison à l'actine impliquée dans la formation des lamellipodes. De plus, l'utilisation de souris déficientes en galectine-7 a permis de démontrer que l'absence de galectine-7 réduisait la motilité de ces cellules (22). Nos résultats suggèrent donc un rôle inattendu de la galectine-7 au niveau de la motilité cellulaire. Notre découverte pourrait s'expliquer par le fait que la galectine-7 est un ligand de Bcl-2, une protéine anti-apoptotique (352) qui inhibe la motilité cellulaire et augmente la polymérisation de l'actine-F pendant la dissémination des cellules de cancer du sein, lorsqu'elle est présente en grande quantité dans le cytoplasme (577). Ainsi, la galectine-7 pourrait former un complexe avec Bcl-2 et l'actine, ce qui régulerait la motilité de ces cellules. Il serait donc de mise d'explorer cette avenue, étant donné que ces protéines sont fortement exprimées dans le cytoplasme des cellules B16F1-G7.

1.2.2. La galectine-7 a une fonction anti-apoptotique dans le mélanome.

La majorité des mélanomes sont résistants à la chimiothérapie et à la l'immunothérapie en raison de leur résistance à l'apoptose (559,560). Bien que plusieurs études démontrent que la galectine-7 pourrait avoir une fonction pro-apoptotique (326,333,335,350-352,358), d'autres l'associe à une fonction anti-apoptotique (22,297,320,359,364,564). Ceci n'est pas surprenant, puisque cela a également été documenté pour d'autres galectines, comme la galectine-3 (1,481). Nous avons donc évalué l'implication de la galectine-7 dans le processus apoptotique des cellules B16F1 surexprimant ou non la galectine-7. Pour ce faire, nous avons traité les cellules B16F1 surexprimant ou non la galectine-7 avec l'agent apoptotique quercetin et nous avons évalué le résultat par immunobuvardage de type Western spécifique pour la détection d'un fragment de l'enzyme poly-ADP-ribose polymerase 1 (PARP-1) clivé. La quercetin est un flavonoïde naturel et ubiquitaire (581) qui a une activité anti-tumorale reliée à l'arrêt du cycle cellulaire et à l'apoptose des cellules cancéreuses (582-584) en diminuant l'expression de Bcl-2 comme il a été décrit dans un modèle de mélanome murin B16-BL6 (585). Des études in vitro et in vivo ont déjà démontré que le traitement des mélanomes à la quercetin avait des propriétés anti-tumorigéniques en inhibant la prolifération cellulaire, la motilité et l'invasion (585-587). La quercetin augmente le clivage de PARP-1 et de la caspase-3 dans les cellules de carcinome du colon HCT116 (573). PARP-1 est une enzyme nucléaire qui détecte les cassures au niveau des brins d'ADN (588). De plus, étant donné que PARP est un substrat des caspases-3 et -7, la présence des fragments de 89 et 24 kDa de PARP-1 est un indicateur de l'activation de ces caspases (589). La présence de PARP-1 clivé est un des outils les plus utilisés afin de détecter l'apoptose dans plusieurs types cellulaires (589). Le résultat de l'immunobuvardage de type Western pour PARP-1 clivé a démontré que la galectine-7 rendait les cellules B16F1 moins sensibles à l'apoptose induite par la quercetin. Cela corrèle aussi avec une autre étude, puisque nous avons observé ce même résultat suite au traitement des cellules du cancer du sein murin surexprimant ou non la galectine-7 avec l'agent apoptotique, epigallocathechin-3-gallate (320). Ce résultat suggère que les mélanomes malins exprimant la galectine-7 pourraient être le résultat d'une résistance aux traitements. Il serait donc important d'explorer davantage cet aspect. Une étude a démontré que la dépolymérisation de l'actine induit

l'apoptose et le clivage de PARP dans les cellules de carcinomes mammaires et la surexpression de Bcl-2 augmente la résistance à l'apoptose de ces cellules (590). Étant donné que 1) la galectine-7 semble stabiliser l'actine, puisque la formation et la stabilisation de l'actine des lamellipodes est anormale dans les souris KOG7 (22) et que 2) la galectine-7 induit une résistance au clivage de PARP-1 (352), on peut émettre l'hypothèse que la galectine-7 peut induire une résistance à l'apoptose en stabilisant l'actine.

1.2.3. Augmentation de l'expression du gène *Egr-1* dans les cellules B16F1 surexprimant la galectine-7.

EGR-1 joue un rôle important dans plusieurs processus des cellules cancéreuses (574). En fait, ce facteur de transcription peut avoir des fonctions pro- ou anti-tumorales dépendamment du type de cancer (416-421). Nos résultats autant au niveau transcriptionnel que protéique ont démontré que la quercetin augmente l'expression du gène Egr-1 dans les cellules B16F1, ce qui corrèle avec les résultats de Lim dans les cellules de carcinome du colon HCT116 (573). Par ailleurs, nous sommes les premiers à avoir démontré que la galectine-7 joue un rôle dans l'expression du gène Egr-1. Nous pouvons supposer que cette augmentation de EGR-1 dans les cellules B16F1 surexprimant la galectine-7 pourrait corréler avec la diminution de la sensibilité à l'apoptose de ces cellules traitées à la quercetin. Quelques études ont démontré que EGR-1 peut avoir un rôle anti-apoptotique. Par exemple, l'inhibition de EGR-1 par ARN interférent a permis d'inhiber la croissance des cellules de cancer de la prostate humain (PC3) (591). De plus, la surexpression de EGR-1 dans les cellules de fibrosarcome (HT1080) mène à l'augmentation de la survie suite à un dommage à l'ADN (592,593). La fonction antiapoptotique de EGR-1 peut s'expliquer par une augmentation de l'activité FAK (focal adhesion kinase) (594) et la diminution de l'expression des caspases-3 et -8 (592). FAK est une tyrosine kinase qui se localise au niveau des points de contact entre les cellules et leurs substrats. Cette protéine joue un rôle au niveau de l'interaction entre les cellules et la MEC et agit comme un signal de survie. L'atténuation de FAK, par des anti-sens, induit l'apoptose dans les cellules tumorales (594). En ce qui à trait à la régulation des caspases par EGR-1, ce mécanisme de régulation est encore mal connu, mais EGR-1 pourrait

inhiber leur transcription ou pourrait activer un inhibiteur de caspase (592). Ceci expliquerait la diminution du clivage de PARP-1 dans les cellules B16F1 surexprimant la galectine-7.

1.2.4. La surexpression de galectine-7 n'est pas suffisante pour affecter l'agressivité du mélanome.

Bien que la motilité cellulaire, l'expression de EGR-1 et l'apoptose sont des facteurs importants dans la progression tumorale, leur importance dépend également de la tumeur et du microenvironnement. L'augmentation de l'expression de galectine-7 dans les tumeurs primaires et secondaires de mélanome B16F1 suggère que, dans de rare cas, la galectine-7 pourrait être exprimée dans les cellules de mélanomes malins. Cependant, bien que les études in vitro démontrent que la galectine-7 aurait un rôle à jouer au niveau de la motilité cellulaire, de l'expression de EGR-1 et de l'apoptose, les études in vivo utilisant des transfectants stables surexprimant la galectine-7 suggèrent que même si la galectine-7 pourrait être exprimée dans les mélanomes, cette protéine ne jouerait probablement qu'un rôle très limité dans la croissance tumorale et l'apoptose. L'importance de la galectine-7 dans les mélanomes est donc très différente de ce qu'il a été observé dans d'autres types de cancers épithéliaux. Par contre, ce phénomène n'est pas surprenant, car la dissémination des cellules cancéreuses et la croissance de la tumeur primaire requièrent un ensemble de propriétés contrôlées par des changements génétiques multiples. Il est rare qu'un seul gène fasse la différence. Le fait qu'on ait démontré que la surexpression de galectine-7 faisait la différence au niveau des modèles de cancer du sein (4T1) (320) et de lymphome (164T2) (338), suggèrent que ces cellules étaient possiblement plus métastatiques que B16F1.

2. Utilisation de modèles murins.

2.1. Modèle cellulaire de mélanome murin B16F1.

Nous avons développé un modèle cellulaire de mélanome murin transformé génétiquement afin de surexprimer la galectine-7. Nous avons utilisé la lignée cellulaire de mélanome murin B16F1, qui est un modèle très utilisé pour les études sur le mélanome. Ce modèle a été développé par Isaac Fidler en 1973 (595). Les cellules B16 proviennent d'un mélanome développé chez une souris C57BL/6 dans les années 1960. Par la suite Fidler a établi plusieurs lignées cellulaires dérivant des cellules B16 en effectuant une série de passages in vivo par injection intra-veineuse. Les cellules B16F1 correspondent aux cellules métastatiques retrouvées dans les poumons suite au premier passage in vivo. Ces auteurs ont aussi démontré que le nombre de passages in vivo corrèle avec l'agressivité des cellules, comme il a été démontré dans notre laboratoire avec un modèle de lymphomes (496). Une autre étude effectuée dans notre laboratoire a démontré que la galectine-7 est surexprimée dans une lignée de lymphome agressif établie suite à plusieurs passages in vivo, comparativement à la lignée parentale non agressive (338). Nous avons donc évalué, par RT-PCR, l'hypothèse selon laquelle la galectine-7 serait surexprimée dans les cellules de mélanome B16F10 comparativement aux cellules B16F1 qui sont moins agressives. Cependant, nous n'avons pas observé d'expression significative de cette protéine dans ces deux types cellulaires. Il est possible que la galectine-7 soit réprimée dans ces cellules par des mécanismes épigénétiques. D'ailleurs, l'ajout de 5'-aza-Cdr aux cellules B16F1 a permis d'augmenter l'expression de galectine-7 dans ces cellules (Annexe B), comme il a été démontré dans les cellules de lymphome 267 et 164T2 (338).

Notre modèle cellulaire de mélanome murin consiste en des cellules B16F1 génétiquement modifiées afin de surexprimer la galectine-7 et/ou la luciférase. Ces cellules transformées ont été produites par transfection stable. Le gène de la luciférase a été utilisé afin de faciliter l'étude des métastases *in vivo* par imagerie bioluminescence ou par essai luciférase.

2.2. Souris déficientes pour la galectine-7.

Des souris déficientes en galectine-7 ont été générées par le groupe de Françoise Poirier à l'Institut Jacques Monod à Paris (22). Ces souris sont viables, se reproduisent normalement et démontrent un phénotype normal. Dans notre étude, ce modèle s'avérait un outil idéal afin de démontrer que l'expression de galectine-7 dans les tumeurs primaires et les métastases de mélanome B16F1 provenant des cellules tumorales et non des cellules péritumorales. Nous avons démontré par RT-PCR et immunohistochimie que la galectine-7 est exprimée par les cellules de mélanome murin B16F1 dans les tumeurs primaires des souris KOG7 et C57BL/6 (WT). De plus, la galectine-7 est aussi exprimée dans les cellules B16F1 des métastases aux poumons suite à une injection intra-veineuse dans les souris KOG7. Les résultats d'immunohistochimie suggèrent aussi que la galectine-7 est plus exprimée au niveau protéique dans les tumeurs primaires des souris KOG7 que WT. Ceci sera discuté davantage dans les perpectives (section 3).

2.3. Développement d'un nouveau modèle *in vivo* de bioluminescence : Souris génétiquement modifiées afin d'exprimer la luciférase sous le contrôle du promoteur du gène *mmp-9* dans les cellules stromales.

Pour de nombreux cancers, les niveaux d'expression et d'activité enzymatique des MMP sont des données fondamentales pour élucider le rôle physiologique de ces enzymes dans le microenvironnement tumoral. Il est connu que l'expression de MMP-9 par les cellules cancéreuses joue un rôle important dans la progression tumorale (538). Plusieurs études ont aussi démontré que la sécrétion de MMP-9 par les cellules péritumorales contribue également à la croissance tumorale et à la métastasie, comme c'est le cas dans les mélanomes (490,494,536,550-552). Cette habilité des cellules tumorales à induire l'expression du gène *mmp-9* dans les cellules péritumorales a surtout été démontrée à l'aide de modèles *in vitro* en raison des difficultés rencontrées dans l'étude *in vivo*, puisque MMP-9 peut être exprimé par les deux types cellulaires (390,553-555). Dans le cas du mélanome, l'augmentation de l'expression du gène *mmp-9* dans les cellules de modèles au mélanomène bien connu (532,533). Cependant, aucune étude n'avait démontré clairement la capacité des cellules de mélanome à induire l'expression du gène *mmp-9* dans les cellules de mélanome à induire l'expression du gène *mmp-9* dans les cellules de mélanome à induire l'expression du gène *mmp-9* dans les cellules de mélanome à induire l'expression du gène *mmp-9* dans les cellules de mélanome à induire l'expression du gène *mmp-9* dans les cellules de mélanome à induire l'expression du gène *mmp-9* dans les cellules de mélanome à induire l'expression du gène *mmp-9* dans les cellules de mélanome à induire l'expression du gène *mmp-9* dans les cellules de mélanome à induire l'expression du gène *mmp-9* dans les cellules de mélanome à induire l'expression du gène *mmp-9* dans les cellules tromates.

2.3.1. Techniques d'imagerie in vivo.

Plusieurs techniques d'imageries ont permis d'étudier l'expression et/ou l'activité des MMP in vivo, comme le FRET (transfert d'énergie par résonnance de type Förster), la tomographie par émission de positons (TEP), la tomographie d'émission monophotonique (TEMP) et l'imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM). Mohan et ses collègues ont démontré l'importance de MMP-9 dans la progression tumorale en utilisant des souris transgéniques utilisant un fragment de 522 pb du promoteur du gène mmp-9 de lapin fusionné au gène de la *béta-galactosidase* (556). Lors de notre étude, décrite au chapitre 2, nous avons plutôt opté pour un modèle murin transgénique dont le promoteur du gène *mmp-9* est fusionné au gène de la *luciférase*. Notre modèle diffère de celui de Mohan aussi au niveau moléculaire puisque nous avons utilisé la séquence de 681 pb de la région 5' du promoteur du gène *mmp-9* murin qui est bien caractérisée (440). De plus, notre modèle peut permettre, dans certain cas, l'étude de l'induction du transgène par imagerie noninvasive en temps réel grâce à des équipements de bio-imagerie standard. Ce modèle pourra être utilisé pour déterminer des modulateurs pharmacologiques qui inhiberaient la surexpression MMP-9 dans les cellules péritumorales ou pour étudier si des facteurs de croissance, produit par les cellules tumorales, induisent l'expression du gène mmp-9 dans les cellules péritumorales. Brefs, pour des études fondamentales appliquées.

2.3.2. Imagerie bioluminescente.

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 (596). Le traitement des souris par des injections intraveineuses de D-luciférine permet, à l'aide d'une plateforme d'analyse comportant un système de caméra pour l'imagerie rapide d'animal anesthésié (imagerie *in vivo*) ou en post-mortem (imagerie sur les organes *ex vivo*), de déterminer les endroits où le promoteur du gène *mmp-9* est activé (597). La mesure de bioluminescence permet d'évaluer l'activation transcriptionnelle du promoteur du gène *mmp-9* par les cellules stromales. De telles études ont déjà été effectuées avec le promoteur du gène *mmp-13* dans un modèle de réparation de blessures (598).

2.3.3. Validation du modèle murin transgénique proMMP-9-Luc.

Dans le chapitre 2, nous avons démontré que le schéma d'expression du transgène dans les souris proMMP-9-Luc était similaire à celui du gène mmp-9 endogène que ce soit dans des conditions normales ou suite à des stimuli. Nous avons observé une expression constitutive du transgène dans la moelle osseuse, ce qui corrèle avec la forte expression de mmp-9 endogène retrouvée normalement dans les os (377). De plus, l'injection de lipopolysaccharides (LPS) par voie intra-péritonéale a permis d'augmenter significativement le signal de bioluminescence dans le foie, qui est la cible principale du choc septique causé par le LPS (544). Ce modèle a aussi permis de démontrer que les cellules de mélanome B16F1, injectées par voie sous-cutanée, peuvent activer le promoteur du gène mmp-9 dans les cellules stromales des poumons et de la rate des souris transgéniques. Ce modèle de souris trangénique sera utile afin d'identifier quelle population cellulaire exprime MMP-9 lors d'une interaction bidirectionnelle entre les cellules cancéreuses et les cellules péritumorales. C'est un avantage important, puisqu'il est difficile de déterminer quel type cellulaire, entre les cellules cancéreuses et péritumorales, sécrète MMP-9 lors des différentes étapes de la progression tumorale (390,490,493). Ce modèle d'imagerie à bioluminescence pourra faciliter l'évaluation de l'activation du gène *mmp-9* dans les cellules stromales dans des contextes de progression tumorale ou de maladies inflammatoires. Ce modèle a d'ailleurs été utile dans le cadre d'une recherche sur EGR-1 dans les lymphomes où il a permis de déterminer que les lymphomes surexprimant EGF pouvait moduler l'expression du gène mmp-9 dans les cellules thymiques de l'hôte (412).

2.3.4. Limitation du modèle.

Nous avons démontré, suite à l'injection de dexaméthasone (puissant agent antiinflammatoire) qu'il est possible d'évaluer l'activation du transgène dans les pattes des souris transgéniques suite à des mesures répétées de l'activité luciférase dans les souris vivantes. Cependant, la forte bioluminescence provenant de l'abdomen complique les études *in vivo* sur des organes spécifiques dans l'abdomen. Dans ce cas, il est essentiel de procéder à de l'imagerie *ex vivo* et/ou à la mesure de l'activité de la luciférase *ex vivo* sur des extraits de tissus, ce dernier étant plus sensible et quantitatif.

2.3.5. Relation entre la galectine-7 et MMP-9.

Plusieurs études suggèrent que la galectine-7 pourrait moduler l'agressivité des cellules cancéreuses en augmentant l'expression de MMP-9 dans les lymphomes murins agressifs (297), les cellules HeLa (297,366) et les cellules de carcinome du larynx humain (368). Les récepteurs de la galectine-7 sont encore inconnus, mais plusieurs glycoprotéines pourraient être impliquées étant donné que les galectines lient les ß-galactosides. Cette relation a seulement été démontrée dans les cellules cancéreuses. Étant donné que MMP-9 peut être exprimée autant par les cellules tumorales que stromales, nous avons évalué l'effet de la galectine-7, exprimée par les cellules cancéreuses, sur l'expression du gène mmp-9 dans les cellules stromales. Pour ce faire, nous avons injecté les cellules B16F1 surexprimant ou non la galectine-7, par voie sous-cutanée, dans les souris transgéniques proMMP-9-Luc. Nos résultats ont démontré que la surexpression de galectine-7 dans ces cellules cancéreuses B16F1 n'affecte pas l'expression du gène mmp-9 dans les cellules stromales de la rate, des poumons et du foie des souris transgéniques en comparaison aux cellules témoins (Annexe C). Cela pourrait probablement s'expliquer par le fait que la galectine-7 est localisée dans le cytoplasme des cellules B16F1 et n'est pas sécrétée, ce qui a été démontré dans le chapitre 3.

3. Perspectives.

L'étude de la galectine-7 dans les mélanomes a permis de démontrer que cette protéine n'a pas toujours un rôle important dans la progression tumorale (Chapitre 3). Toutefois, étant donné que la galectine-7 est exprimée dans les tumeurs primaires ou secondaires de mélanome murin B16F1, cela suggère que cette protéine peut être exprimée dans certains types de mélanomes malins. Il serait intéressant d'étudier un plus grand nombre de biopsies par immunohistochimie afin d'évaluer l'utilité de la galectine-7 comme bio-marqueur de mélanomes. Toutefois, il faut porter une attention particulière à l'expression de la galectine-7 par les cellules épithéliales.

Les résultats de l'analyse immunohistochimique sur les tumeurs primaires des souris ayant été injectées avec les cellules B16F1 suggèrent, par l'intensité de la coloration, que la galectine-7 est plus exprimée au niveau protéique dans les tumeurs des souris déficientes en galectine-7 (KOG7) que dans les souris normales (WT) (Chapitre 3). L'analyse d'un nombre significatif de tumeurs permettrait d'évaluer si l'expression de galectine-7 par les cellules péritumorales pourrait affecter l'expression de la galectine-7 dans les cellules de mélanome B16F1. Des études *in vivo* dans les souris KOG7 pourraient aussi nous renseigner sur l'impact de l'expression de la galectine-7 par les cellules péritumorales in vivo dans les souris KOG7 pourraient aussi nous renseigner sur l'impact de l'expression de la galectine-7 par les cellules péritumorales sur la croissance et la dissémination de ces cellules.

Des études *in vitro* utilisant des cellules de mélanome B16F1 surexprimant la galectine-7 a permis de démontrer que cette protéine diminue la motilité de ces cellules. Afin de comprendre le mécanisme par lequel la galectine-7 diminue la motilité, nous pourrions vérifier si la galectine-7 se lie à l'actine et à Bc1-2, puisque cette dernière est reconnue comme étant un ligand de la galectine-7, inhibe la motilité cellulaire et augmente la polymérisation de l'actine lorsqu'elle est présente en grande quantité dans le cytoplasme des cellules du cancer du sein (577). Une analyse de la liaison de la galectine-7 avec l'actine ou avec Bcl-2 pourrait se faire par microscopie confocale avec des anticorps spécifiques couplés à différentes molécules fluorescentes. De plus, une immunoprécipitation, suivi d'un immunobuvardage de type Western pourraient être utilisées afin d'identifier les ligands de la galectine-7 dans les cellules B16F1

surexprimant la galectine-7. Les protéines purifiées seraient identifiées par spectrométrie de masse en chromatographie liquide (LC-MS/MS). Si Bcl-2 est un ligand de la galectine-7 dans ces cellules il serait possible d'utiliser un inhibiteur de Bcl-2 (exemple : BH3I-2' (599)) ou des anti-sens de Bcl-2 afin de vérifier que cette protéine est impliquée dans la diminution de la motilité cellulaire en reprenant l'essai de motilité utilisé dans notre étude.

Afin d'étudier le mécanisme par lequel la galectine-7 augmente la résistance à l'apoptose induite par la quercetin dans les cellules de mélanome murin B16F1, nous pourrions étudier l'hypothèse selon laquelle la galectine-7 induit une résistance à l'apoptose en stabilisant l'actine. Si les résultats de l'analyse de microscopie confocale et d'immunoprécipitation confirme que l'actine est un ligand de la galectine-7, nous pourrions étudier l'effet d'un inhibiteur spécifique de la polymérisation de l'actine, comme la lantrunculine (600), sur le clivage de PARP-1 dans les cellules B16F1 surexprimant ou non la galectine-7.

Les résultats qui suggèrent que la galectine-7 induit une résistance à l'apoptose dans les cellules B16F1 et 4T1 (320) nous incite à étudier l'effet de la galectine-7 sur la résistance des cellules de cancer du sein à l'apoptose induite par des agents chimiothérapeutiques (exemple : cyclophosphamide (CYC) 5-fluorouracil (5FU) (601)). L'étude se ferait sur les cellules du cancer du sein au lieu des cellules de mélanome, puisque dans ce modèle tumorale la galectine-7 a un rôle important dans la dissémination et plusieurs modèles cellulaires expriment constitutivement un haut niveau de galectine-7. Nous pourrions tester la capacité des agents chimiothérapeutiques à induire l'apoptose dans les cellules de cancer du sein n'exprimant pas la galectine-7 (4T1 (murin), et MDA-MB-231 (humain)) ou l'exprimant (transfectant 4T1-G7 et MDA-MB-468). Ainsi, nous pourrions savoir si les cellules surexprimant la galectine-7 sont plus résistantes que celles qui ne l'expriment pas.

La relation entre la galectine-7 et EGR-1 pourrait avoir un rôle à jouer dans la sensibilité à l'apoptose des cellules de mélanome. En fait, la galectine-7 potentialise l'augmentation de l'expression du gène Egr-1 suite au traitement des cellules B16F1 à la

quercetin (Chapitre 3) et des études ont démontré que EGR-1 peut avoir un rôle antiapoptotique dans certains types de cancer (592). Nous pourrions évaluer l'effet de EGR-1 sur l'apoptose en transfectant des ARN interférents spécifique à Egr-1 dans les cellules B16F1 surexprimant la galectine-7. Ces cellules seraient traitées avec la quercetin et l'apoptose serait évaluée par l'analyse de PARP-1 clivé en immunobuvarage de type Western en comparaison aux cellules témoins. De plus, l'hypothèse selon laquelle EGR-1 pourrait affecter négativement la transcription de la caspase-3 pourrait être étudiée par transfection transitoire. Ainsi, un vecteur contenant un gène luciférase sous le contrôle du promoteur de la caspase-3 pourrait être transfectées dans les cellules B16F1 surexprimant ou non EGR-1 suite à la transfection d'un vecteur contenant le gène EGR-1 sous le contrôle d'un promoteur fort. Ces cellules seraient alors traitées à la quercetin et l'activation transcriptionnelle de la caspase-3 seraient évaluée par essai luciférase. L'expression de EGR-1 et de la caspase-3 dans ces cellules serait aussi contrôlée par immunobuvardage de type Western.

Nous n'avons pas étudié comment la galectine-7 induit l'expression du gène *egr-1* dans les cellules B16F1. Parmi les pistes possibles, il serait intéressant de vérifier si les facteurs de croissance NGF ou HGF sont impliqués dans cette induction. En fait, une étude a démontré que EGR-1 est induit dans les glandes salivaires suite à la sécrétion de NGF (*nerve growth factor*) par les cellules de mélanomes (602). Il serait intéressant de vérifier si les transfectants B16F1 surexprimant la galectine-7 sécrètent plus de NGF et si l'addition de NGF induit l'expression du gène *egr-1* dans les cellules B16F1, et que celleci est potentialisée par la gal-7. Un autre article a démontré que le gène *egr-1* est induit dans les cellules de mélanomes (603). HGF se fixe sur le récepteur c-MET des mélanomes et peut stimuler la croissance et l'invasion des cellules tumorales. De plus, une signalisation aberrante HGF/c-Met est impliquée dans un grand nombre de cancers, incluant les mélanomes. Nous pourrions vérifier si HGF induit l'expression du gène *egr-1* et si la galectine-7 potentialise cette induction dans les mélanomes
CHAPITRE 4

L'analyse de bioluminescence à partir du modèle transgénique murin proMMP-9-Luc a démontré que la surexpression de galectine-7 dans les cellules B16F1 n'affecte pas l'expression du gène mmp-9 dans les cellules stromales de la rate, des poumons et du foie (Chapitre 2). Cependant, cette relation hôte-tumeur entre ces protéines pourrait être étudiée avec d'autres types de cancers, comme les lymphomes ou les carcinomes du larynx, dans lesquels il a été démontré que la galectine-7 augmente l'expression du gène mmp-9 dans les cellules cancéreuses (297,368). Les souris transgéniques proMMP-9-Luc ne sont pas seulement utiles à l'étude de l'expression du gène mmp-9 dans les cellules péritumorales suite à l'injection de cellules cancéreuses surexprimant la galectine-7. Ce modèle d'imageric à bioluminescence peut faciliter l'évaluation de l'activation du gène *mmp-9* dans les cellules stromales dans des contextes de progression tumorale ou de maladies inflammatoires. Ce modèle peut aussi être utilisé pour évaluer des modulateurs pharmacologiques qui inhiberaient la surexpression de MMP-9 dans les cellules péritumorales ou pour étudier si des facteurs de croissance, produit par les cellules tumorales, induisent l'expression du gène *mmp-9* dans les cellules péritumorales. Brefs, pour des études fondamentales appliquées.

CHAPITRE 5

Conclusion générale

CHAPITRE 5

Mes travaux ont permis de démontrer que la galectine-7 ne semblait pas exprimée dans les biopsies de mélanomes malins humains. Cependant, l'induction de l'expression de la galectine-7 dans les tumeurs primaires et les métastases aux poumons d'un modèle de mélanome murin B16F1 suggère que cette protéine pourrait être exprimée dans les cellules de mélanome malin. De plus, les études *in vitro* ont démontré que la galectine-7 réduit la motilité des cellules de mélanome murin B16F1, qu'elle augmente la résistance des cellules B16F1 à l'apoptose induite et augmente l'expression de EGR-1. Malgré cela, des études *in vivo* ont suggéré que la surexpression de la galectine-7 n'est pas suffisante à elle seule pour moduler la croissance des tumeurs primaires, ni la dissémination des cellules B16F1 aux poumons. Même si la galectine-7 pourrait être exprimée dans les mélanomes, cette protéine ne jouerait probablement qu'un rôle très limité dans la croissance tumorale et l'apoptose. L'importance de la galectine-7 dans les mélanomes est donc très différente de ce qu'il a été observé dans d'autres types de cancers épithéliaux. Dans l'ensemble, ces résultats représentent une avancée sur nos connaissances des fonctions de la galectine-7.

D'autre part, même si notre modèle murin *proMMP-9-Luc* n'a pas démontré de relation entre l'expression de la galectine-7 dans les cellules tumorales et celle de *mmp-9* dans les cellules stromales, ce modèle reste d'une très grande utilité pour des études précliniques, que ce soit pour tester des modulateurs pharmacologiques qui inhiberaient la surexpression MMP-9 dans les cellules péritumorales ou pour tester si des facteurs de croissance, produits par les cellules tumorales, induisent l'expression du gène *mmp-9* dans les cellules péritumorales.

131

ANNEXES

ANNEXE A

Potential directions for drug development against galectin-7 in cancer

St-Pierre Y., Biron-Pain K., Campion C., Lavoie G., Bouchard F., Couillard J.

Review

Expert Opinion

1. Introduction

- 2. Galectins
- 10 3. Galectin-7
 - 4. Galectin-7 in tumor progression
 - 5. Molecular mechanisms implicating galectin-7 in cancer progression
 - Exploiting galectin-7 in cancer therapy using natural ligands
 - 7. Structure-based drugs
 - 8. Targeting protein-protein interactions
 - 9. Expert opinion
- 25

15

20

I

5

- 30
- 35

40

45





Potential directions for drug development against galectin-7 in cancer

Yves St-Pierre[†], Katherine Biron-Pain, Carole Campion, Geneviève Lavoie, Frédéric Bouchard & Julie Couillard INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada

Background: Galectins are a family of proteins defined by having at least one characteristic carbohydrate recognition domain (CRD) with an affinity for beta-galactosides. Over the recent years, with a better understanding of their role in normal and pathological conditions, they have emerged as promising diagnostic and therapeutic targets in cancer. Whereas most of these studies have focused on galectin-1 and galectin-3, very little attention has been paid to galectin-7, a member of the family that has recently been associated with various forms of cancer. Objective: We review the role of galectin-7 in cancer and examine the possible directions that could be exploited to inhibit its role in cancer on the basis of recently identified galectin ligands. Conclusion: Although efforts have been made to develop drugs aimed at inhibiting the cancer-promoting propensity of galectins, most of these inhibitors were specific for the CRD region of the molecule and have focused on extracellular functions of galectins. However, galectins may also be involved in protein-protein interactions, most notably in the nucleus. As galectin-7 is expressed in the cytoplasm and the nucleus in cancer cells, it will be important to investigate its nucleocytoplasmic trafficking and how putative drugs will affect its functions in cancer.

Keywords: antisense, cancer, carbohydrate recognition domain, galectins, metastasis, peptides, structure-based drug design

Expert Opin. Drug Discov. (2009) 4(6):1-10

1. Introduction

Inhibition of galectins for the treatment of diseases, such as cancer and inflammation, has recently become an area of intense interest. One of the reasons why simple and effective drugs for inhibiting selective galectins have seldom emerged is probably that only limited research groups have so far been involved in this area of research. The low-affinity carbohydrate-mediated interactions also impair the development of affinity/selective inhibitors. It is, therefore, essential to gain a better knowledge of their functions so as to approach them from new perspectives to possibly design novel ways to interfere with its function or with their regulation at the gene level. Here, we use galectin-7 as an example. The functional mechanism of this member of the galectin family remains largely unknown, yet there are increasing indications that inhibiting its functions may prevent metastasis and neoplastic progression. We predict that looking at galectins from a fresh angle will lead to the development of drugs that could be used to prevent their tumorigenic functions.

52 2. Galectins

Galectins constitute a family of lectins defined by shared
consensus amino acid sequences and affinity for beta-galactosecontaining oligosaccharides 111. The binding of a glycoepitope depends on the presence of a carbohydrate recognition domain (CRD) of ~ 130 aa located in the C-terminal end of the protein 12.31. Galectins are normally found in the
cytoplasm or in the extracellular space. In the latter case, this is probably owing to a non-classical secretory pathway, as all members do not have a signal sequence, which would be required for protein secretion through the classical secretory pathway. In the extracellular space, galectins can thus

bind and crosslink cell-surface glycoconjugates, some of which are transmembrane proteins, thereby triggering a cascade of transmembrane signaling events 14-71. For example, galectin-9 can interact with carbohydrates on Tim-3 expressed on the surface of T helper type 1 (T_H1) cells, thereby inducing the cell death pathway in T_H1 cells and thus downregulating

T_H1 responses [8]. There is, however, increasing evidence that galectins are also expressed in the nucleus of various cell types. Whereas galectin-1 has been found in the nucleus of normal T lymphocytes subpopulations [9], high levels of

75 galectin-3 in the nucleus have been associated with tumor progression of melanoma cells 1101. Translocation of galectin-1 to the nucleus has also been shown to occur after treatment with chemotherapeutic agents 1111. This suggests that its activity is highly regulated at the cell level, in addition to 80 being specific to cell types and developmental stage 11,121. In fact, galectins are important in several physiological processes, including embryonic development, wound healing, apoptosis, intercellular adhesion, cell migration and the immune response. Most importantly, there are several studies showing 85 that abnormal galectin activity is associated with tumorigenesis and promotes metastasis [13].

3. Galectin-7

Galectin-7 was initially described as a marker of the differen-90 tiation of keratinocytes by Magnaldo and colleagues [14]. Galectin-7 is also expressed in the sheath of the hair follicle, in the esophagus and oral epithelia, in the cornea and the Hassal's corpuscles of the thymus [15]. It is essential in epithelial cell migration and in the re-epithelization of corneal and/or 95 epidermal wounds [16-18]. Galectin-7 is also strongly associated with ultraviolet B (UVB)-induced apoptosis in epidermis as sunburn cell corresponding to apoptotic keratinocytes express abnormally high levels of galectin-7 [19]. In fact, galectin-7 was almost exclusively considered a negative regulator of cell 100 proliferation since its discovery by the group of Bert Vogelstein as one of the 14 transcripts out of 7,202 induced in colorectal cancer cells by the expression of p53, whose main function is to control apoptosis [20]. Indeed, whereas some researchers have shown that galectin-7 can induce 105 106 apoptosis in HeLa cells 1211 or overcome the chemoresistance of urothelial carcinoma cells 1221, others have shown that binding 107 of galectin-7 to cell surface receptors can trigger signals that in fact reduce neuroblastoma cell growth, although without the characteristic features of apoptosis 1231. Similar results have 110 been found in the DLD-1 colon cancer cells 1241. This ability of galectin-7 to induce apoptosis in some type of cancer cells is not surprising. In fact, it is reminiscent of other members of the galectin family, such as galectin-3, galectin-8 and galectin-9, which have also been shown to induce apoptosis 115 in different types of cancer cell lines 125,261.

4. Galectin-7 in tumor progression

At first glance, galectin-7 should aid in the elimination of 120 tumor cells because its expression is induced by p53 and it is upregulated in apoptotic cells. It may also reduce tumor growth independently from apoptosis, as suggested by Matsui and colleagues 1221 who showed that although overexpression of galectin-7 alone, following gene transfer in 125 bladder tumor-derived cell lines, did not induce apoptosis *per se*, it was nonetheless sufficient to confer increased susceptibility to *cis*-diamminedichloroplatinum (CDDP)-induced cell killing *in vitro*.

In sharp contrast to the intuitively negative roles played 130 by galectin-7 in colon cancer, however, Lu et al. 1271 reported that galectin-7 is over-expressed in chemically induced experimental mammary carcinomas. These authors have specifically shown that the expression of galectin-7 was restricted to the mammary tissue and was not detected in any other 135 tissues examined in the adult rat, thus providing the first indication that galectin-7 could be associated with tumor progression. Rorive et al. 1281 later observed that galectin-7 expression was markedly higher in different forms of papillary carcinomas than in benign thyroid tumors. High levels of 140 galectin-7 expressions have also been associated with rapid recurrence rates and dismal prognosis in stage IV hypopharyngeal squamous cell carcinomas [29]. Following this line of investigation, our laboratory showed that galectin-7 was constitutively expressed in aggressive lymphoma variants, at both 145 mRNA and protein levels [30]. In fact, we found that whereas galectin-7 is not detectable in normal lymphocyte populations of T and B cell origins, it is expressed at very high levels in various populations and T and B lymphoma cells [31].

Whereas the analyses presented earlier provided evidence 150 that galectin-7 was expressed at higher levels at a specific stage of neoplastic progression or was absent in the healthy state, they did not determine whether its presence was in any way associated with the disease process or whether it was merely an ancillary event. Our recent work in lymphoma, 155 however, has provided compelling evidence that galectin-7 plays a central role in disease progression. Using an experimental mouse model, we found that mice injected with lymphoma transfectants, expressing galectin-7 constitutively, developed large metastatic tumors in the liver and kidneys with a massive infiltration of tumor cells in the parenchyma. In contrast, in 161

- 162 mice injected with control lymphoma cells that do not express galectin-7 only few scattered foci of tumor cells with limited infiltration were observed [32]. We also found that
- 165 expression of galectin-7 overcomes the resistance of mice that were otherwise genetically resistant to lymphoma dissemination. Most importantly for a potential therapeutic application, we found that suppressing galectin-7 expression using an antisense strategy increased the survival of mice by reducing
- 170 the metastasis of lymphoma cells [31]. In addition to showing for the first time that galectin-7 could promote malignancy, these results provide a rationale for developing novel therapeutic tools against galectin-7 in cancer.

175 5. Molecular mechanisms implicating galectin-7 in cancer progression

One hypothesis that has been put forward to explain how galectin-7 promotes tumor progression and metastasis says that galectin-7, like other members of the galectin family, is functionally linked to extracellular matrix (ECM) remodeling by means of its association with members of the MMP family of extracellular proteases. MMPs constitute a large family of zinc-dependent proteases that can degrade most ECM proteins

- 185 as well as nonmatrix substrates, such as chemokines, growth factors and receptors, indicating that MMPs influence a wide array of physiological and pathological processes [33]. One of these proteases is the 92-kDa type IV collagenase commonly referred to as MMP-9. It is considered a multi-
- 190 functional member of the MMP family as it shares, with MMP-2, a fibronectin-like type II modules inserted in its catalytic domain, thus providing MMP-9 a unique repertoire of substrates. Although several studies have reported that the release of MMP-9 correlated with the tumorigenic
- 195 phenotype of various tumor cell types, the most compelling evidence for the involvement of MMP-9 in tumor invasion came from a study that showed that the overproduction of this metalloproteinase in nonmetastatic rat embryo cells conferred a metastatic phenotype to these cells 1341. Since then,
- 200 other studies using various approaches to over-express/suppress the production of MMP-9 by the tumor or the peritumoral cells have confirmed this molecule's crucial role in tumor development, most notably in glioma and lymphoma [35-39]. Interestingly, we found that the increased tumorigenicity of
- 205 lymphoma cells correlated with the ability of galectin-7 to induce MMP-9 expression. This hypothesis is based on our observations that high levels of metastasis in lymphoma cells induced by the transfer of the *galectin-7* gene correlates with high levels of MMP-9 expression [31]. Moreover, in lymphoma
- 210 cells that did not express MMP-9, the addition of recombinant galectin-7 induced MMP-9 expression in both mouse and human lymphoma cells. Similar results were recently reported in breast cancer cell lines (Demers *et al.*, unpublished observations). This correlation between galectin-7 and MMP-9 215 has also been observed in tumor areas of hypopharyngeal
- 216 and laryngeal squamous cell carcinomas (40). This suggests

that galectin-7 could be involved in ECM remodeling, 217 thereby increasing the invasiveness of tumor cells. This hypothesis is supported by previous studies showing that another important role played by galectins with respect to 220 tumor progression relates to their direct or indirect involvement in cancer cell migration leading to the formation of metastases. Levels of galectin-1, -3 and -8, for instance, have been shown to modulate cell-cell and cell-ECM contact to promote integrin-mediated cell adhesion and migration of 225 tumor cells at different steps of metastasis [13,41-43]. Of course, interactions between dimers of galectin-7 expressed by tumor cells and the carbohydrate portion of putative glycoconjugates on the surface of peritumoral cells or ECM proteins may contribute to proliferation, aggregation and 230 malignant progression. Gendronneau et al. have demonstrated that galectin-7 was located on the podosomes of cultured keratinocytes migrating out of skin explants and co-localized with cortactin and microtubules at the front edge of these cells 1441. Podosomes are actin-rich contractile 235 structures and are involved in the adhesion process of cells to solid substrates initiating migration and tissue invasion 1451. Alternatively, such an association between galectin-7 and MMP-9, or other MMPs, may also have a role in inflammation as MMPs participate in modulating the cleavage of mediators 240 of inflammation. Given the central role of inflammation in tumorigenesis 46, and possibly in metastasis, as recently proposed [47], and as other members of the galectin family have been involved in inflammatory processes [48], this issue is certainly a potential avenue of research. 245

6. Exploiting galectin-7 in cancer therapy using natural ligands

Most of the efforts aimed at inhibiting galectin functions 250 have been focused on their CRD, using, for instance, naturally occurring carbohydrate ligands. As galectin-7 harbors a conserved CRD that is responsible for binding to carbohydrate such as N-acetyl-lactosamine, lactose, galactose and galactosamine 1491, we have successfully used lactose to 255 inhibit in vitro the ability of recombinant galectin-7 to induce MMP-9 in both human and murine tumor cells [32]. We also showed that lactose inhibits the constitutive expression of MMP-9 induced by the over-expression of galectin-7 in tumor cells following gene transfection, indicating that 260 blocking galectin-7 via its CRD might inhibit metastasis formation in vivo. Whether such natural ligands can be effective in vivo remains, however, to be tested, although some studies have reported that chemically modified citrus pectin (MCP) when fed as a 1% solution in drinking water 265 for 1 week was able to reduce, to some extent, cancer metastasis induced by MDA-MB-435 in a nude mouse model 150]. The citrus pectin is a heterogeneous, high-molecular weight branched polysaccharide that can inhibit the binding of gal-3 to human umbilical vascular endothelial cells (HUVEC) 270 and the binding of galectin-3 expressing cancer cells to 271

- HUVEC [50], which have been shown to inhibit spontaneously formed metastasis in prostate [51], breast and colon [50] cancers. A new form of MCP, called GCS-100, has been
 shown to induce apoptosis in purified multiple myeloma
- cells of patients in vitro 1521 and has been approved as a single agent given intravenously in a Phase II study in chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients to assess clinical activity and safety. This carbohydrate-based agent induces apoptosis in myeloma cells by suppressing the antiapoptotic 280 effect of galectin-3 on cytochrome c and is now being tested in clinical trial in patients with diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) and other hematological malignancies [53]. Interestingly, we have shown that whereas normal individuals have undetectable galectin-7 in their serum, some patients 285 with a wide range of hematological malignancies, including DLBCL, express very high levels of galectin-7 in their tumor cells. As it is not known whether MCP has any affinity for other member of the galectin family, including galectin-7, it 290 will be tempting to determine whether any putative therapeutic effect does indeed disrupt galectin-3 specific functions or whether the observed effects result from interference
- with other galectin functions.

295 7. Structure-based drugs

Although the CRDs of different galectins show structural homologies, chemists are working on alternative strategies to design inhibitors for individual members of the galectin family. The use of structure-based drug design methods 300 using structural information, including new crystal forms 154-551 and ligand affinity data 1561, has yielded several high-affinity and stable thiogalactoside-based inhibitors that preferentially bind to recombinant galectin-3 in vitro 1571. 305 Based on high-resolution X-ray crystal structures of the CRD of galectin-3 in complex with a high affinity inhibitor has further allowed to gain insight for affinity enhancement of the aromatic moiety of LacNAc derivatives, leading to the identification of inhibitors with high affinity for galectin-3 (Kd \ge 320 nM), suggesting that fine-tuning can considerably 310 increase the affinity of these inhibitors for galectins 158]. By replacing the N-acetyl glucosamine moiety by a noncarbohydrate aglycon, they were then able to gain significant specificity for galectin-7 [59], indicating that development of high-affinity monosaccharide-derived galectin-7-selective 315 inhibitors is possible. More recently, promising leads with the capacity to inhibit the in vitro invasive behavior of the human A549 lung cancer cells and the PC-3 prostate cancer cells were generated for further development of novel antitumor

320 drugs (60). However, whether the antimigratory effects shown by these compounds were galectin-specific remains to be confirmed. Nevertheless, as these compounds were prepared using thiodigalactoside 1 as a starting material, which is commercially available or, alternatively, that can easily be synthesized from galactose, they are attractive from a research and commercial point of view.

Others are working on the synthesis of wedge-like 327 glycodendrimers with several lactose moieties using 3,5 di-(2-aminoethoxy) benzoic acid as the branching unit 1611. When tested in solid-phase competition assays, 330 these glycodendrimers have been reported to successfully inhibit the binding function of galectin-1. Studies comparing their inhibitory capacity relative to monomeric compounds are highly in favor for further development of such glycobusters as effective blocking reagents against galectins, 335 suggesting that combining such multivalent scaffolding with monovalent ligands is a promising avenue 162-631. Synthetic lactulose amines (SLA) have also been described as potent and specific inhibitors of galectin-1 and galectin-3 164-651. There are three kinds of SLA: 1) N-lactulose-octamethylene- 340 diamine (LDO), 2) N,N'-dilactulose-octamethylenediamine (D-LDO) and 3) N.N-dilactulose-dodecamethylenediamine (D-LDD). Whereas LDO and D-LDO have been shown to inhibit the in vitro binding of both galectin-1 and galectin-3 to purified 90K, a highly glycosylated cell surface protein 345 normally expressed on T cells, D-LDD as been shown to interfere only with the binding of galectin-1 1651, indicating that a degree of specificity can be obtained using some of these compounds. Whether such inhibitors are efficient against galectin-7 remains unclear. 350

High throughput screening of peptides using phage display and combinatorial peptide library with knowledge-based input have both shown potential for generating specific inhibitors of galectins. The phage display has proven to be a very powerful technique to identify short pentapeptides 355 based on a common tyr-x-tyr motif of glycomimetic peptides that can inhibit the binding of several galectins in the millimolar range 166-671. Such peptides have proven to be very effective in their ability to inhibit in vitro the binding of galectin-3 to the purified tumor-specific Thomsen-Friedenreich 360 glycoantigen normally expressed on carcinoma cells [68]. Interestingly, André et al. 1691 have shown that the phage display method has yielded sequences binding at or near the carbohydrate-binding site. Using label-free galectin to dissociate phage-galectin complexes, these authors were able to select 365 for peptides interfering with both protein-carbohydrate and protein-protein interactions. Although they were not successful for all galectins tested, suggesting that either the phage library they had used might not have been optimal, or that not all galectins mediate protein-protein interactions, this 370 approach is nevertheless interesting as it opens the way to the development of inhibitors that could interfere with CRD-independent functions of particular galectins. Moreover, peptides are easier to synthesize than carbohydrates and their coding sequences can be readily integrated in genetically 375 engineered therapeutic approaches.

8. Targeting protein-protein interactions

Whereas the development of drugs inhibiting galectins have 380 by and large been focused of CRD-specific interactions, the 381

St-Pierre, Biron-Pain, Campion, Lavoie, Bouchard & Couillard



Figure 1. Expression of galectin-7 in normal human tissues. A. Expression of galectin-7 in the normal esophagus tissue showing moderate to strong nuclear and cytoplasmic staining in mucosal squamous epithelium. B. and C. Strong cytoplasmic and nuclear staining in squamous epithelium and sebaceous glands. D. Strong expression of galectin-7 in thymic dendritic and epithelial cells, and lymphocytes showing frequent faint nuclear staining. No significant expression of galectin-7 is detected in skeletal muscle (E) and in thyroid (F).

- idea that perhaps attention should also be directed to the nuclear activity of galectins that would be independent of carbohydrate recognition is slowly emerging. This possibility
 is supported by studies such as those showing that galectin-1
- and galectin-3 bind to nuclear proteins of the spliceosome complex and is thus involved in pre-mRNA splicing [70]. This idea has received the strong support of several investigators, including Voss and colleagues [71] who showed that
- 390 the splicing functions of galectin-1 could be dissociated from its carbohydrate-binding activity. In their work, they report that a mutant, unable to bind saccharides, retained both its ability to reconstitute the splicing of galectin-depleted nuclear extracts and its physical association with general 395 transcription factor II-I (TFII-I). TFII-I is activated by a
- variety of signaling pathways and is involved in both basal transcription and signal transduction activation or repression. Previous studies on galectin-3 also showed that specific functions of some galectins could be dissociated from their CRD.
- 400 Wang et al. [72] have indeed shown that nuclear galectins can interact through protein-protein interaction with a polypeptide splicing factor via their N-terminal domain of ~ 130 amino acids, which contains several repeats of the PGAYPGXXX motif. As binding of galectin-1 to such splicing
- 405 factor is CRD-dependent, the observation that galectin-3 is ≤ 10-fold more efficient in reconstituting splicing activity in galectin-depleted nuclear extracts compared to galectin-1, suggests that protein-protein interactions are the chief contributors to this function. Whether such a nuclear function
- 410 is associated with galectin-7 remains an interesting possibility.411 However, many researchers, including our group, have

consistently found high levels of galectin-7 in a cytoplasmic 412 and nuclear form. In fact, microarray studies done with cells that were susceptible to apoptosis by galectin-7 revealed that most of the genes that were modulated by galectin-7 have 415 been associated with intracellular functions, such as apoptosis and the redox-status. Although the existence of soluble forms of galectin-7 has been documented [73], high levels of galectin-7 have been consistently found in the cytoplasm and nuclei of various cell types (Figure 1). The recent data from Saussez et al. [74] 420 have also shown that increased expression of galectin-7 in dysplasias was accompanied by a shift from the cytoplasmic compartment to the nucleus. More specifically, they showed that initiation of tumorigenesis in laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) is associated with nuclear localization of 425 galectin-7. In carcinomas it is shifted back to cytoplasmic sites. This observation was specific to galectin-7 as the presence of galectin-1, in contrast, remained in the nucleus during the course of malignant progression. Moreover, a recent study provides support for the idea that galectin-7, like other galectins, 430 may also be engaged in intracellular protein-protein processes. Inagaki et al. [75] have shown that galectin-7 is a transcriptional regulator that antagonizes TGF-β-elicited stimulation of type I collagen and PAI-1 expression in response to HGF via protein-protein interaction with Smad3. In their study, 435 Inagaki and colleagues have shown that galectin-7-specific siRNA inhibited HGF-induced nuclear export of Smad3, a transcriptional factor linked to the TGF-B signaling cascade. In cancer, Smad3 mediates the tumor-suppressor activity of TGF-B, which regulates genes such as COL1A2, one of the 440 chief components of the ECM, and PAI-1, the principal 441

Table 1. Roles of galectin-7 in cancer.

Cancer	Cell/tissue	Cancer stage	Implication of galectin-7	Distribution	Ref.
Transformed keratinocytes	SV-40 transformed human keratinocytes	Transformed cells	Expression of galectin-7 was found to be suppressed by retinoic acid	ND	[14]
Mammary carcinoma	Rat mammary carcinoma	ND	Over-expressed at the mRNA level in mammary tumors as compared to normal tissues	ND	[27]
Colon carcinoma	Human DLD-1 cells	ND	Galectin-7 is a p53 induced gene in early steps of apoptosis	ND	[20]
	Human DLD-1 and (and HeLa cells)	ND	Galectin-7 accelerates apoptosis in caspase-dependant pathway; associated with cytochrome c release and JNK activation	ND	[21]
	Human DLD-1 cells	ND	Galectin-7 has a suppressive effect on tumor growth	ND	[24]
Urothelial cancer	Human bladder tumors	Highly differentiated	Over-expressed	ND	[79]
	TCC of the bladder and upper urinary tract	Muscle invasive tumors	Increased expression	Cytoplasmic	[80]
	Human bladder specimens	Bladder cancer with extra-vesicle invasion; postoperative systemic chemotherapy	CDDP induces galectin-7 in cell lines with wild type p53 (increase apoptosis) Lower expression in urothelial carcinoma than in normal urothelium	ND	[22]
SCC	TR146, SCC13, A431 cells	ND	No expression of galectin-7; Variability in the differentiation pattern	ND	[15]
	UVB-induced keratinocytes	Cutaneous tumors	Increased expression of galectin-7 mRNA and protein in keratinocytes after UVB irradiations; UVB-induced apoptosis	ND	[19]
	Primary buccal SCC	Aggressive	Over-expressed in buccal SCC tissues as compared to normal buccal mucosa	ND	[81]
	Hypopharyngeal and laryngeal	Low grade dysplasia and carcinoma	Increased expression	Nuclear	[74]
Thyroid	Tissues of thyroid tumors	Benign and malignant	Decrease of galectin-7 expression in adenomas compared to carcinomas	ND	(28)
Neuroblastoma	Human neuroblastoma cells	ND	Galectin-7 acts as a lectin on the cell surface; reduced cancer cell proliferation	Extracellular	[23]
Lymphoma/ leukemia	T-lymphoma cell lines	Aggressive	Increased expression observed in aggressive lymphoma variants	ND	[30]
	T-lymphoma cell lines	ND	Over-expression of galectin-7 accelerates growth of thymic lymphoma and metastasis	ND	[32]
	T-lymphoma cell lines and cells from various human hematological malignancies	ND	Galectin-7-specific antisense inhibits dissemination of lymphoma to peripheral organs; increased expression in human B lymphoid neoplasms	ND	[31]

CDDP: cis-diamminedichloroplatinum; JNK: C-Jun-N-terminal kinase; ND: Not determined; SCC: Squamous cell carcinoma; TCC: Transitional cell cancers; UVB: Ultraviolet B.

442 activator of tissue plasminogen activator. Whether a shift of galectin-7 from the nucleus to the cytoplasm alters the equilibrium between galectin-7 and its nuclear substrates in the
 445 cytoplasm or the nucleus via protein-protein interaction remains an intriguing possibility and underscores the need

to consider the development of peptide-based inhibitors.

9. Expert opinion

450

The development of galectin-7-specific drugs remains a fantastic challenge *per se* for several reasons. The first challenge is to narrow the spectrum of the drugs that binds the CRD, which shares strong homology with all members of a large family of proteins, involved in such a large spectrum of physiological processes. Combining high affinity to specificity while favoring bioavailability will be a tremendous task. The second challenge stems from the fact that galectin-7 is still an enigmatic protein with regard to its implication in various types of cancer (Table 1). In some, such as colon cancer, it

- 460 types of cancer (Table 1). In some, such as colon cancer, it has been associated with proapoptotic functions, whereas in others, such as hematological malignancies, mammary cancer and squamous cell carcinomas, it has been associated with neoplastic progression and metastasis. Of course, it is possible
- 465 that these 'good' and 'bad' roles may be related to cell types and/or disease stage. Hence, it is important to pursue our quest to identify the deleterious galectin activities while sparing any non-contributory or beneficial activities. Results from genetically engineered mouse models have shown that
- 470 galectin-7 may be a dispensable protein for all vital functions, as they do not display overt phenotypes about survival and fertility [76]. Nevertheless, results from such studies have shown that suppression of galectin-7, which is strongly expressed in keratinocytes, may disturb the epidermal
- response to environmental injury such as UVB response. For this purpose, basic and translational researchers must continue to develop and validate assays to facilitate testing of novel drugs that would modulate its activities while carefully evaluating such potential side effects. They also need to develop animal models that recapitulate clinical trial design and pay

attention to the stage and type of cancer that is likely to be 481 evaluated in clinical versus preclinical studies. A third but critical challenge is to identify the ligands that bind to galectin. Here, one must be open to the possibility that such ligands might operate by means of CRD-independent interactions, 485 as suggested by data obtained with other galectins. This issue is of course critical as most of the efforts so far have been focused on the development of CRD-specific inhibitory drugs. In this regard, the use of phage display strategies to identify peptides or blocking monoclonal antibodies that 490 could interfere with the physical association between galectin-7 and its specific ligands, whether occurring through a CRD or outside its CRD, may represent a possible approach. Such a strategy has been successfully used to design blocking antibodies specific for members of the MMP family that 495 harbor similarity in structure of their catalytic pocket that had made so difficult the design of truly specific small molecule inhibitors 1771. Finally, a fourth challenge is the delivery of such drugs to the relevant cellular compartment. It is becoming clear that galectin-7, like many other galectins, has impor-500 tant intracellular functions, including nuclear functions. As nuclear protein import is stimulated in proliferating cells compared to quiescent cells 1781, it will be important to investigate nucleocytoplasmic trafficking of galectin-7 and how its modulation and putative drugs will affect its functions. 505 We are confident, however, that future collaborations between basic cancer researchers, clinicians, the pharmaceutical industry will improve chances of successfully developing novel therapeutic strategies.

Acknowledgements

510

515

Supported by a grant from the Canadian Institute for Health Research (Grant No. MOP-89697).

Declaration of interest

The authors state no conflict of interest and have received no payment in preparation of this manuscript. 519

Galectin-7 in cancer

Bibliography

Papers of special note have been highlighted as either of interest (*) or of considerable interest (**) to readers.

- Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, et al. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. Cell 1994;76:597-8
- Barboni EA, Bawumia S, Henrick K, et al. Molecular modeling and mutagenesis studies of the N-terminal domains of galectin-3: evidence for participation with the C-terminal carbohydrate recognition domain in oligosaccharide binding. Glycobiology 2000;10:1201-8
- Ochieng J, Furtak V, Lukyanov P. Extracellular functions of galectin-3. Glycoconj J 2004;19:527-35
- Chung CD, Patel VP, Moran M, et al. Galectin-1 induces partial TCR zeta-chain phosphorylation and antagonizes processive TCR signal transduction. J Immunol 2000;165:3722-9
- Demetriou M, Granovsky M, Quaggin S, et al. Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. Nature 2001;409:733-9
- Perillo NL, Pace KE, Seilhamer JJ, et al. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. Nature 1995;378:736-9
- Walzel H, Blach M, Hirabayashi J, et al. Involvement of CD2 and CD3 in galectin-1 induced signaling in human Jurkat T-cells. Glycobiology 2000;10:131-40
- Zhu C, Anderson AC, Schubart A, et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. Nat Immunol 2005;6:1245-52
- Garin MI, Chu CC, Golshayan D, et al. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. Blood 2007;109:2058-65
- Prieto VG, Mourad-Zeidan AA, Melnikova V, et al. Galectin-3 expression is associated with tumor progression and pattern of sun exposure in melanoma. Clin Cancer Res 2006;12:6709-15
- Takenaka Y, Fukumori T, Yoshii T, et al. Nuclear export of phosphorylated galectin-3 regulates its antiapoptotic activity in response to chemotherapeutic drugs. Mol Cell Biol 2004;24:4395-406
- Kasai K, Hirabayashi J. Galectins: a family of animal lectins that decipher glycocodes. J Biochem 1996;119:1-8

- Liu FT, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression. Nat Rev Cancer 2005;5:29-41
- A thorough review of the roles of different members of galectins in cancer.
- Magnaldo T, Fowlis D, Darmon M. Galectin-7, a human 14-kDa S-lectin, specifically expressed in keratinocytes and sensitive to retinoic acid. Dev Biol 1995;168:259-71
- Magnaldo T, Fowlis D, Darmon M. Galectin-7, a marker of all types of stratified epithelia. Differentiation 1998;63:159-68
- Cao Z, Said N, Amin S, et al. Galectins-3 and -7, but not galectin-1, play a role in re-epithelialization of wounds. J Biol Chem 2002;277:42299-305
- Cao Z, Wu HK, Bruce A, et al. Detection of differentially expressed genes in healing mouse corneas, using cDNA microarrays. Invest Ophthalmol Vis Sci 2002;43:2897-904
- Cao Z, Said N, Wu HK, et al. Galectin-7 as a potential mediator of corneal epithelial cell migration. Arch Ophthalmol 2003;121:82-6
- Bernerd F, Sarasin A, Magnaldo T. Galectin-7 overexpression is associated with the apoptotic process in UVB-induced sunburn keratinocytes. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:11329-34
- Polyak K, Xia Y, Zweier JL, et al. A model for p53-induced apoptosis. Nature 1997;389:300-5
- Kuwabara I, Kuwabara Y, Yang RY, et al. Galectin-7 (PIG1) exhibits pro-apoptotic function through JNK activation and mitochondrial cytochrome c release. J Biol Chem 2002;277:3487-97
- 22. Matsui Y, Ueda S, Watanabe J, et al. Sensitizing effect of galectin-7 in urothelial cancer to cisplatin through the accumulation of intracellular reactive oxygen species. Cancer Res 2007;67:1212-20
- Kopitz J, Andre S, von Reitzenstein C, et al. Homodimeric galectin-7 (p53-induced gene 1) is a negative growth regulator for human neuroblastoma cells. Oncogene 2003;22:6277-88
- Ueda S, Kuwabara I, Liu FT. Suppression of tumor growth by galectin-7 gene transfer. Cancer Res 2004;64:5672-6
- 25. Fukumori T, Takenaka Y, Yoshii T, et al. CD29 and CD7 mediate

galectin-3-induced type 11 T-cell apoptosis. Cancer Res 2003;63:8302-11

- Lu LFI, Nakagawa R, Kashio Y, et al. Characterization of galectin-9-induced death of Jurkat T cells. J Biochem 2007;141:157-72
- Lu J, Pei H, Kaeck M, Thompson HJ. Gene expression changes associated with chemically induced rat mammary carcinogenesis. Mol Carcinog 1997;20:204-15
- Rorive S, Eddafali B, Fernandez S, 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;15:1294-301
- 29. Saussez S, Kiss R. Galectin-7. Cell Mol Life Sci 2006;63:686-97
- A comprehensive review on galectin-7 with discussion of its positive and negative roles in different types of cancer.
- Moisan S, Demers M, Mercier J, et al. Upregulation of galectin-7 in murine lymphoma cells is associated with progression toward an aggressive phenotype. Leukemia 2003;17:751-9
- Demers M, Biron-Pain K, Hebert J, et al. Galectin-7 in lymphoma: elevated expression in human lymphoid malignancies and decreased lymphoma dissemination by antisense strategies in experimental model. Cancer Res 2007;67:2824-9
- Demers M, Magnaldo T, St-Pierre Y. A novel function for galectin-7: promoting tumorigenesis by up-regulating MMP-9 gene expression. Cancer Res 2005;65:5205-10
- In vivo evidence that galectin-7 increases the metastatic behavior of lymphoma cells.
- McCawley LJ, Matrisian LM. Tumor progression: defining the soil round the tumor seed. Curr Biol 2001;11:R25-7
- 34. Bernhard EJ, Gruber SB, Muschel RJ. 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 USA 1994;91:4293-7
- 35. Aoudjit F, Masure S, Opdenakker G, et al. Gelatinase B (MMP-9), but not its inhibitor (TIMP-1), dictates the growth rate of experimental thymic lymphoma. Int J Cancer 1999;82:743-7

St-Pierre, Biron-Pain, Campion, Lavoie, Bouchard & Couillard

- 36. Chantrain CF, Shimada H, Jodele S, et al. Stromal matrix metalloproteinase-9 regulates the vascular architecture in neuroblastoma by promoting pericyte recruitment. Cancer Res 2004;64:1675-86
- Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, et al. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. Cell 2000;103:481-90
- Gorden DL, Fingleton B, Crawford HC, et al. Resident stromal cell-derived MMP-9 promotes the growth of colorectal metastases in the liver microenvironment. Int J Cancer 2007;121:495-500
- Kondraganti S, Mohanam S, Chintala SK, et al. Selective suppression of matrix metalloproteinase-9 in human glioblastoma cells by antisense gene transfer impairs glioblastoma cell invasion. Cancer Res 2000;60:6851-5
- 40. Saussez S, Cludts S, Capouillez A, et al. Identification of matrix metalloproteinase-9 as an independent prognostic marker in laryngeal and hypopharyngeal cancer with opposite correlations to adhesion/growth-regulatory galectins-1 and -7. Int J Oncol 2009;34:433-9
- Clinical studies further extending the correlation between MMP-9 and galectin-7.
- Hikita C, Vijayakumar S, Takito J, et al. Induction of terminal differentiation in epithelial cells requires polymerization of hensin by galectin 3. J Cell Biol 2000;151:1235-46
- Hittelet A, Legendre H, Nagy N, et al. Upregulation of galectins-1 and -3 in human colon cancer and their role in regulating cell migration. Int J Cancer 2003;103:370-9
- Moiseeva EP, Williams B, Goodall AH, et al. Galectin-1 interacts with beta-1 subunit of integrin. Biochem Biophys Res Commun 2003;310:1010-6
- Gendronneau G, Sidhu SS, Delacour D, et al. Galectin-7 in the control of epidermal homeostasis after injury. Mol Biol Cell 2008;19:5541-9
- First report of galectin-7-deficient mice to investigate its effect on proliferation and apoptosis of keratinocytes.
- Yamaguchi H, Pixley F, Condeelis J. Invadopodia and podosomes in tumor invasion. Eur J Cell Biol 2006;85:213-8

- Coussens LM, Werb Z. Inflammatory cells and cancer: think different! J Exp Med 2001;193:F23-6
- A landmark review on the importance of inflammatory mediators, including MMPs, in tumor progression.
- Kim DH, Kim JH, Kim EH, et al. 15-Deoxy-{Delta}12,14-prostaglandin J2 upregulates the expression of heme oxygenase-1 and subsequently matrix metalloproteinase-1 in human breast cancer cells: possible roles of iron and ROS. Carcinogenesis 2009;30:645-54
- Liu FT. Galectins: novel anti-inflammatory drug targets. Expert Opin Ther Targets 2002;6:461-8
- Leonidas DD, Vatzaki EH, Vorum H, et al. Structural basis for the recognition of carbohydrates by human galectin-7. Biochemistry 1998;37:13930-40
- Nangia-Makker P, Hogan V, Honjo Y, 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;94:1854-62
- Pienta KJ, Naik H, Akhtar A, et al. Inhibition of spontaneous metastasis in a rat prostate cancer model by oral administration of modified citrus pectin. J Natl Cancer Inst 1995;87:348-53
- 52. Chauhan D, Li G, Podar K, et al. A novel carbohydrate-based therapeutic GCS-100 overcomes bortezomib resistance and enhances dexamethasone-induced apoptosis in multiple myeloma cells. Cancer Res 2005;65:8350-8
- Available from: http://clinicaltrials.gov/ct2/ results?term=GCS-100
- Collins PM, Hidari KJ, Blanchard H. Slow diffusion of lactose out of galectin-3 crystals monitored by X-ray crystallography: possible implications for ligand-exchange protocols. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 2007;63:415-9
- Scott SA, Scott K, Blanchard H. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of recombinant human galectin-1. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun 2007;63:967-71
- Carlsson S, Oberg CT, Carlsson MC, et al. Affinity of galectin-8 and its carbohydrate recognition domains for ligands in solution and at the cell surface. Glycobiology 2007;17:663-76

- 57. Cumpstey I, Sundin A, Leffler H, et al. C2-symmetrical thiodigalactoside bis-benzamido derivatives as high-affinity inhibitors of galectin-3: efficient lectin inhibition through double arginine-arene interactions. Angew Chem Int Ed Engl 2005;44:5110-2
- 58. Sörme P, Arnoux P, Kahl-Knutsson B, et al. Structural and thermodynamic studies on cation-Pi interactions in lectin-ligand complexes: high-affinity galectin-3 inhibitors through fine-tuning of an arginine-arene interaction. J Am Chem Soc 2005;127:1737-43
- 59. Cumpstey I, Carlsson S, Leffler H, et al. 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;3:1922-32
- Delaine T, Cumpstey I, Ingrassia L, et al. Galectin-inhibitory thiodigalactoside ester derivatives have anti-migratory effects in cultured lung and prostate cancer cells. J Med Chem 2008;51:8109-14
- Andre S, Pieters RJ, Vrasidas I, et al. Wedgelike glycodendrimers as inhibitors of binding of mammalian galectins to glycoproteins, lactose maxiclusters, and cell surface glycoconjugates. Chembiochem 2001;2:822-30
- 62. André S, Liu B, Gabius HJ, Roy R. First demonstration of differential inhibition of lectin binding by synthetic tri- and tetravalent glycoclusters from cross-coupling of rigidified 2-propynyl lactoside. Org Biomol Chem 2003;1:3909-16
- 63. Vrasidas I, André S, Valentini P, et al. Rigidified multivalent lactose molecules and their interactions with mammalian galectins: a route to selective inhibitors. Org Biomol Chem 2003;1:803-10
- Stillman BN, Hsu DK, Pang M, et al. Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induce T cell death. J Immunol 2006;176:778-89
- 65. Rabinovich GA, Cumashi A, Bianco GA, 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;16:210-20
- 66. Arnusch CJ, Andre S, Valentini P, et al. Interference of the galactose-dependent

Galectin-7 in cancer

binding of lectins by novel pentapeptide ligands. Bioorg Med Chem Lett 2004:14:1437-40

- 67. Pieters RJ. Inhibition and detection of galectins. Chembiochem 2006;7:721-8
- Zou J, Glinsky VV, Landon LA, et al. Peptides specific to the galectin-3 carbohydrate recognition domain inhibit metastasis-associated cancer cell adhesion. Carcinogenesis 2005;26:309-18
- 69. André S, Arnusch CJ, Kuwabara I, et al. Identification of peptide ligands for malignancy- and growth-regulating galectins using random phage-display and designed combinatorial peptide libraries. Bioorg Med Chem 2005;13:563-73
- Park JW, Voss PG, Grabski S, et al. Association of galectin-1 and galectin-3 with Gemin4 in complexes containing the SMN protein. Nucleic Acids Res 2001;29:3595-602
- Voss PG, Gray RM, Dickey SW, et al. Dissociation of the carbohydrate-binding and splicing activities of galectin-1. Arch Biochem Biophys 2008;478:18-25
- Wang W, Park JW, Wang JL, et al. Immunoprecipitation of spliceosomal RNAs by antisera to galectin-1 and galectin-3. Nucleic Acids Res 2006;34:5166-74

- Liu FT, Patterson RJ, Wang JL. Intracellular functions of galectins. Biochim Biophys Acta 2002;1572:263-73
- 74. Saussez S, Decaestecker C, Lorfevre F, et al. Increased expression and altered intracellular distribution of adhesion/growth-regulatory lectins galectins-1 and -7 during tumour progression in hypopharyngeal and laryngeal squamous cell carcinomas. Histopathology 2008;52:483-93
- 75. Inagaki Y, Higashi K, Kushida M, et al. Hepatocyte growth factor suppresses profibrogenic signal transduction via nuclear export of Smad3 with galectin-7. Gastroenterology 2008;134:1180-90
- First evidence that intracellular galectin-7 physically interacts with Smad3 and may act as a transcriptional modulator.
- Gendronneau G, Sidhu SS, Delacour D, et al. Galectin-7 in the control of epidermal homeostasis after injury.? Mol Biol Cell 2008;19:5541-9
- Overall CM, Kleifeld O. Towards third generation matrix metalloproteinase inhibitors for cancer therapy. Br J Cancer 2006;94:941-6
- Feldherr CM, Akin D. Signal-mediated nuclear transport in proliferating and growth-arrested BALB/c 3T3 cells.
 J Cell Biol 1991;115:933-9

- 79. Ostergaard M, Rasmussen HH, Nielsen HV, et al. Proteome profiling of bladder squamous cell carcinomas: identification of markers that define their degree of differentiation. Cancer Res 1997;57:4111-7
- Langbein S, Brade J, Badawai JK, et al. Gene-expression signature of adhesion/growth-regulatory tissue lectins (galectins) in transitional cell cancer and its prognostic relevance. Histopathology 2007;51:681-90
- Chen J, He QY, Yuen AP, Chiu JF. Proteomics of buccal squamous cell carcinoma: the involvement of multiple pathways in tumorigenesis. Proteomics 2004;4:2465-75

Affiliation

Yves St-Pierre[†], Katherine Biron-Pain, Carole Campion, Geneviève Lavoie, Frédéric Bouchard & Julie Couillard [†]Author for correspondence INRS-Institut Armand-Frappier, 531 Boul. Des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7 Tel: +1 450 686 5354; Fax: +1 450 686 5501; E-mail: yves.st-pierre@iaf.inrs.ca

ANNEXE B



Induction de l'expression du gène *galectine-7* dans les cellules B16F1 suite à un traitement à la 5'-aza-Cdr. L'expression de galectine-7 au niveau de l'ARNm a été détectée par une analyse RT-PCR.

ANNEXE C



Effet de la surexpression de galectine-7 dans les cellules de mélanome sur l'expression de MMP-9 dans les cellules péritumorales. Évaluation de l'activation du transgène *proMMP-9*-Luc dans A) la rate, B) les poumons et C) le foie des souris C57BL\6-Tg(*proMMP9-Luc*) ayant été injectées par voie sous-cutanée avec 5×10^4 cellules de mélanome B16F1 surexprimant ou non la galectine-7, par essai luciférase. Les organes ont été collectés entre 18 et 22 jours suivant l'injection des cellules tumorales. Les organes de souris C57BL\6-Tg(*proMMP9-Luc*) ont été utilisés comme témoin.

BIBLIOGRAPHIE

- 1. Liu, F. T., and Rabinovich, G. A. (2005) Nat. Rev. Cancer 5, 29-41
- 2. Liu, F. T., and Rabinovich, G. A. (2010) Ann. N. Y. Acad. Sci. 1183, 158-182
- 3. Barondes, S. H., Cooper, D. N., Gitt, M. A., and Leffler, H. (1994) J. Biol. Chem. 269, 20807-20810
- 4. Lobsanov, Y. D., Gitt, M. A., Leffler, H., Barondes, S. H., and Rini, J. M. (1993) J. Biol. Chem. 268, 27034-27038
- 5. Seetharaman, J., Kanigsberg, A., Slaaby, R., Leffler, H., Barondes, S. H., and Rini, J. M. (1998) J. Biol. Chem. 273, 13047-13052
- 6. Leonidas, D. D., Vatzaki, E. H., Vorum, H., Celis, J. E., Madsen, P., and Acharya, K. R. (1998) *Biochemistry* 37, 13930-13940
- 7. Cho, M., and Cummings, R. D. (1995) J. Biol. Chem. 270, 5198-5206
- 8. Lopez-Lucendo, M. F., Solis, D., Andre, S., Hirabayashi, J., Kasai, K., Kaltner, H., Gabius, H. J., and Romero, A. (2004) *J. Mol. Biol.* 343, 957-970
- Leppanen, A., Stowell, S., Blixt, O., and Cummings, R. D. (2005) J. Biol. Chem. 280, 5549-5562
- 10. Hirabayashi, J., and Kasai, K. (1993) Glycobiology 3, 297-304
- 11. Dumic, J., Dabelic, S., and Flogel, M. (2006) Biochim. Biophys. Acta 1760, 616-635
- 12. Brewer, C. F., Miceli, M. C., and Baum, L. G. (2002) Curr. Opin. Struct. Biol. 12, 616-623
- 13. Sacchettini, J. C., Baum, L. G., and Brewer, C. F. (2001) *Biochemistry* 40, 3009-3015
- 14. Yang, R. Y., Rabinovich, G. A., and Liu, F. T. (2008) Expert Rev. Mol. Med. 10, e17
- 15. Seelenmeyer, C., Wegehingel, S., Tews, I., Kunzler, M., Aebi, M., and Nickel, W. (2005) J. Cell Biol. 171, 373-381
- 16. Elola, M. T., Wolfenstein-Todel, C., Troncoso, M. F., Vasta, G. R., and Rabinovich, G. A. (2007) *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 1679-1700
- 17. Mehul, B., and Hughes, R. C. (1997) J. Cell Sci. 110 (Pt 10), 1169-1178
- 18. Nickel, W. (2005) *Traffic* 6, 607-614
- 19. Menon, R. P., and Hughes, R. C. (1999) Eur. J. Biochem. 264, 569-576
- 20. Poirier, F. (2002) Biochem. Soc. Symp., 95-103
- 21. Poirier, F., Timmons, P. M., Chan, C. T., Guenet, J. L., and Rigby, P. W. (1992) Development 115, 143-155
- 22. Gendronneau, G., Sidhu, S. S., Delacour, D., Dang, T., Calonne, C., Houzelstein, D., Magnaldo, T., and Poirier, F. (2008) *Mol. Biol. Cell* 19, 5541-5549
- 23. Barondes, S. H., Castronovo, V., Cooper, D. N., Cummings, R. D., Drickamer, K., Feizi, T., Gitt, M. A., Hirabayashi, J., Hughes, C., Kasai, K., and et al. (1994) *Cell* 76, 597-598
- 24. Blaser, C., Kaufmann, M., Muller, C., Zimmermann, C., Wells, V., Mallucci, L., and Pircher, H. (1998) *Eur. J. Immunol.* 28, 2311-2319
- 25. Choi, J. Y., van Wijnen, A. J., Aslam, F., Leszyk, J. D., Stein, J. L., Stein, G. S., Lian, J. B., and Penman, S. (1998) *J. Cell Sci.* 111 (Pt 20), 3035-3043
- 26. Heilmann, S., Hummel, T., Margolis, F. L., Kasper, M., and Witt, M. (2000) *Histochem. Cell Biol.* 113, 241-245
- 27. Zuniga, E., Rabinovich, G. A., Iglesias, M. M., and Gruppi, A. (2001) J. Leukoc. Biol. 70, 73-79
- 28. Liu, F. T., Hsu, D. K., Zuberi, R. I., Kuwabara, I., Chi, E. Y., and Henderson, W. R., Jr. (1995) *Am. J. Pathol.* 147, 1016-1028

- 29. Joo, H. G., Goedegebuure, P. S., Sadanaga, N., Nagoshi, M., von Bernstorff, W., and Eberlein, T. J. (2001) *J. Leukoc. Biol.* 69, 555-564
- 30. Stock, M., Schafer, H., Stricker, S., Gross, G., Mundlos, S., and Otto, F. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 17360-17367
- 31. Nio, J., Kon, Y., and Iwanaga, T. (2005) J. Histochem. Cytochem. 53, 1323-1334
- 32. Chen, H. Y., Sharma, B. B., Yu, L., Zuberi, R., Weng, I. C., Kawakami, Y., Kawakami, T., Hsu, D. K., and Liu, F. T. (2006) *J. Immunol.* 177, 4991-4997
- Ocklenburg, F., Moharregh-Khiabani, D., Geffers, R., Janke, V., Pfoertner, S., Garritsen, H., Groebe, L., Klempnauer, J., Dittmar, K. E., Weiss, S., Buer, J., and Probst-Kepper, M. (2006) Lab. Invest. 86, 724-737
- 34. Sarafian, V., Jans, R., and Poumay, Y. (2006) Arch. Dermatol. Res. 298, 73-81
- 35. de la Fuente, H., Perez-Gala, S., Bonay, P., Cruz-Adalia, A., Cibrian, D., Sanchez-Cuellar, S., Dauden, E., Fresno, M., Garcia-Diez, A., and Sanchez-Madrid, F. (2012) *J. Pathol.*
- 36. Stancic, M., Slijepcevic, D., Nomden, A., Vos, M. J., de Jonge, J. C., Sikkema, A. H., Gabius, H. J., Hoekstra, D., and Baron, W. (2012) *Glia*
- 37. Zappelli, C., van der Zwaan, C., Thijssen-Timmer, D. C., Mertens, K., and Meijer, A. B. (2012) J. Biol. Chem. 287, 8327-8335
- 38. Dyer, K. D., and Rosenberg, H. F. (2001) Life Sci. 69, 201-212
- Kubach, J., Lutter, P., Bopp, T., Stoll, S., Becker, C., Huter, E., Richter, C., Weingarten, P., Warger, T., Knop, J., Muliner, S., Wijdenes, J., Schild, H., Schmitt, E., and Jonuleit, H. (2007) Blood 110, 1550-1558
- 40. Hotta, K., Funahashi, T., Matsukawa, Y., Takahashi, M., Nishizawa, H., Kishida, K., Matsuda, M., Kuriyama, H., Kihara, S., Nakamura, T., Tochino, Y., Bodkin, N. L., Hansen, B. C., and Matsuzawa, Y. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 34089-34097
- 41. Harrison, W. J., Bull, J. J., Seltmann, H., Zouboulis, C. C., and Philpott, M. P. (2007) J. Investig. Dermatol. 127, 1309-1317
- 42. Dunphy, J. L., Barcham, G. J., Bischof, R. J., Young, A. R., Nash, A., and Meeusen, E. N. (2002) J. Biol. Chem. 277, 14916-14924
- 43. Lewis, S. K., Farmer, J. L., Burghardt, R. C., Newton, G. R., Johnson, G. A., Adelson, D. L., Bazer, F. W., and Spencer, T. E. (2007) *Biol. Reprod.* 77, 1027-1036
- 44. Chiariotti, L., Salvatore, P., Frunzio, R., and Bruni, C. B. (2004) Glycoconj. J. 19, 441-449
- 45. Maquoi, E., van den Brule, F. A., Castronovo, V., and Foidart, J. M. (1997) *Placenta* 18, 433-439
- 46. Salvatore, P., Contursi, C., Benvenuto, G., Bruni, C. B., and Chiariotti, L. (1995) *FEBS Lett.* 373, 159-163
- 47. De Gregorio, E., Chiariotti, L., and Di Nocera, P. P. (2001) Gene 268, 215-223
- 48. Lu, Y., and Lotan, R. (1999) Biochim. Biophys. Acta 1444, 85-91
- 49. Lu, Y., Lotan, D., and Lotan, R. (2000) Biochim. Biophys. Acta 1491, 13-19
- 50. Lohr, M., Lensch, M., Andre, S., Kaltner, H., Siebert, H. C., Smetana, K., Jr., Sinowatz, F., and Gabius, H. J. (2007) *Folia Biol. (Praha)* 53, 109-128
- 51. Zhao, X. Y., Zhao, K. W., Jiang, Y., Zhao, M., and Chen, G. Q. (2011) *J. Biol. Chem.* 286, 36808-36819
- 52. Zhao, X. Y., Chen, T. T., Xia, L., Guo, M., Xu, Y., Yue, F., Jiang, Y., Chen, G. Q., and Zhao, K. W. (2010) *Carcinogenesis* 31, 1367-1375
- 53. Toscano, M. A., Campagna, L., Molinero, L. L., Cerliani, J. P., Croci, D. O., Ilarregui, J. M., Fuertes, M. B., Nojek, I. M., Fededa, J. P., Zwirner, N. W., Costas, M. A., and Rabinovich, G. A. (2011) *Mol. Immunol.* 48, 1940-1949
- 54. Satelli, A., and Rao, U. S. (2011) Cancer Lett. 301, 38-46

- 55. Chiariotti, L., Benvenuto, G., Zarrilli, R., Rossi, E., Salvatore, P., Colantuoni, V., and Bruni, C. B. (1994) *Cell Growth Differ*. 5, 769-775
- 56. Benvenuto, G., Carpentieri, M. L., Salvatore, P., Cindolo, L., Bruni, C. B., and Chiariotti, L. (1996) *Mol. Cell. Biol.* 16, 2736-2743
- 57. Salvatore, P., Benvenuto, G., Caporaso, M., Bruni, C. B., and Chiariotti, L. (1998) FEBS Lett. 421, 152-158
- 58. Salvatore, P., Benvenuto, G., Pero, R., Lembo, F., Bruni, C. B., and Chiariotti, L. (2000) Int. J. Oncol. 17, 1015-1018
- 59. Gillenwater, A., Xu, X. C., Estrov, Y., Sacks, P. G., Lotan, D., and Lotan, R. (1998) *Int. J. Cancer* 75, 217-224
- 60. Voss, P. G., Tsay, Y. G., and Wang, J. L. (1994) *Glycoconj. J.* 11, 353-362
- 61. Kadrofske, M. M., Openo, K. P., and Wang, J. L. (1998) Arch. Biochem. Biophys. 349, 7-20
- 62. Rosenberg, I. M., Iyer, R., Cherayil, B., Chiodino, C., and Pillai, S. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 12393-12400
- 63. Raimond, J., Rouleux, F., Monsigny, M., and Legrand, A. (1995) FEBS Lett. 363, 165-169
- 64. Guittaut, M., Charpentier, S., Normand, T., Dubois, M., Raimond, J., and Legrand, A. (2001) J. Biol. Chem. 276, 2652-2657
- 65. Li, F., Kato, I., Kawaguchi, H., Takasawa, K., Hibino, Y., and Hiraga, K. (2006) *Gene* 367, 46-55
- 66. Dumic, J., Lauc, G., and Flogel, M. (2000) Cell. Physiol. Biochem. 10, 149-158
- 67. Kim, K., Mayer, E. P., and Nachtigal, M. (2003) *Biochim. Biophys. Acta* 1641, 13-23
- 68. Noma, N., Simizu, S., Kambayashi, Y., Kabe, Y., Suematsu, M., and Umezawa, K. (2012) Oncol. Rep. 27, 2080-2084
- 69. Hsu, D. K., Hammes, S. R., Kuwabara, I., Greene, W. C., and Liu, F. T. (1996) *Am. J. Pathol.* 148, 1661-1670
- 70. Zhang, H. Y., Jin, L., Stilling, G. A., Ruebel, K. H., Coonse, K., Tanizaki, Y., Raz, A., and Lloyd, R. V. (2009) *Endocrine* 35, 101-111
- 71. 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, 1136-1140
- 72. Ahmed, H., Banerjee, P. P., and Vasta, G. R. (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358, 241-246
- 73. Mazurek, N., Conklin, J., Byrd, J. C., Raz, A., and Bresalier, R. S. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 36311-36315
- 74. Takenaka, Y., Fukumori, T., Yoshii, T., Oka, N., Inohara, H., Kim, H. R., Bresalier, R. S., and Raz, A. (2004) *Mol. Cell. Biol.* 24, 4395-4406
- 75. Yoshii, T., Fukumori, T., Honjo, Y., Inohara, H., Kim, H. R., and Raz, A. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 6852-6857
- 76. Mazurek, N., Sun, Y. J., Price, J. E., Ramdas, L., Schober, W., Nangia-Makker, P., Byrd, J. C., Raz, A., and Bresalier, R. S. (2005) *Cancer Res.* 65, 10767-10775
- 77. Balan, V., Nangia-Makker, P., Jung, Y. S., Wang, Y., and Raz, A. (2010) *Biochim. Biophys. Acta* 1803, 1198-1205
- 78. Gitt, M. A., Massa, S. M., Leffler, H., and Barondes, S. H. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 10601-10606
- 79. Sturm, A., Lensch, M., Andre, S., Kaltner, H., Wiedenmann, B., Rosewicz, S., Dignass, A. U., and Gabius, H. J. (2004) J. Immunol. 173, 3825-3837

- 80. Sakakura, C., Hasegawa, K., Miyagawa, K., Nakashima, S., Yoshikawa, T., Kin, S., Nakase, Y., Yazumi, S., Yamagishi, H., Okanoue, T., Chiba, T., and Hagiwara, A. (2005) *Clin. Cancer Res.* 11, 6479-6488
- 81. Gitt, M. A., Xia, Y. R., Atchison, R. E., Lusis, A. J., Barondes, S. H., and Leffler, H. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 2961-2970
- 82. Bidon, N., Brichory, F., Thomas, D., Cavalier, A., Caulet-Maugendre, S., Bourguet, P., and Dazord, L. (2001) *Anticancer Res.* 21, 1049-1055
- Yoshida, H., Imaizumi, T., Kumagai, M., Kimura, K., Satoh, C., Hanada, N., Fujimoto, K., Nishi, N., Tanji, K., Matsumiya, T., Mori, F., Cui, X. F., Tamo, W., Shibata, T., Takanashi, S., Okumura, K., Nakamura, T., Wakabayashi, K., Hirashima, M., Sato, Y., and Satoh, K. (2001) *Neuroreport* 12, 3755-3758
- 84. Chabot, S., Kashio, Y., Seki, M., Shirato, Y., Nakamura, K., Nishi, N., Nakamura, T., Matsumoto, R., and Hirashima, M. (2002) *Glycobiology* 12, 111-118
- Imaizumi, T., Kumagai, M., Sasaki, N., Kurotaki, H., Mori, F., Seki, M., Nishi, N.,
 Fujimoto, K., Tanji, K., Shibata, T., Tamo, W., Matsumiya, T., Yoshida, H., Cui, X. F.,
 Takanashi, S., Hanada, K., Okumura, K., Yagihashi, S., Wakabayashi, K., Nakamura, T.,
 Hirashima, M., and Satoh, K. (2002) J. Leukoc. Biol. 72, 486-491
- 86. Ishikawa, A., Imaizumi, T., Yoshida, H., Nishi, N., Nakamura, T., Hirashima, M., and Satoh, K. (2004) *Immunol. Cell Biol.* 82, 410-414
- 87. Alam, S., Li, H., Margariti, A., Martin, D., Zampetaki, A., Habi, O., Cockerill, G., Hu, Y., Xu, Q., and Zeng, L. (2011) *J. Biol. Chem.* 286, 44211-44217
- 88. Liu, F. T., Patterson, R. J., and Wang, J. L. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* 1572, 263-273
- 89. Wang, J. L., Gray, R. M., Haudek, K. C., and Patterson, R. J. (2004) *Biochim. Biophys.* Acta 1673, 75-93
- 90. Sherr, C. J. (1996) Science 274, 1672-1677
- 91. Kim, H. R., Lin, H. M., Biliran, H., and Raz, A. (1999) Cancer Res. 59, 4148-4154
- 92. Takenaka, Y., Inohara, H., Yoshii, T., Oshima, K., Nakahara, S., Akahani, S., Honjo, Y., Yamamoto, Y., Raz, A., and Kubo, T. (2003) *Cancer Lett*. 195, 111-119
- 93. Levy, R., Grafi-Cohen, M., Kraiem, Z., and Kloog, Y. (2010) *Mol. Cancer Ther.* 9, 2208-2219
- 94. Nakahara, S., and Raz, A. (2007) Cancer Metastasis Rev. 26, 605-610
- 95. Shimura, T., Takenaka, Y., Fukumori, T., Tsutsumi, S., Okada, K., Hogan, V., Kikuchi, A., Kuwano, H., and Raz, A. (2005) *Cancer Res.* 65, 3535-3537
- Chen, H. Y., Fermin, A., Vardhana, S., Weng, I. C., Lo, K. F., Chang, E. Y., Maverakis, E., Yang, R. Y., Hsu, D. K., Dustin, M. L., and Liu, F. T. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 14496-14501
- Fischer, C., Sanchez-Ruderisch, H., Welzel, M., Wiedenmann, B., Sakai, T., Andre, S., Gabius, H. J., Khachigian, L., Detjen, K. M., and Rosewicz, S. (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 37266-37277
- 98. Gonzalez, M. M., Yoshizaki, L., Wolfenstein-Todel, C., and Fink, N. E. (2012) *Protein J.* 31, 8-14
- 99. Arbel-Goren, R., Levy, Y., Ronen, D., and Zick, Y. (2005) J. Biol. Chem. 280, 19105-19114
- 100. Yang, R. Y., Hsu, D. K., Yu, L., Ni, J., and Liu, F. T. (2001) J. Biol. Chem. 276, 20252-20260
- Fukumori, T., Oka, N., Takenaka, Y., Nangia-Makker, P., Elsamman, E., Kasai, T., Shono, M., Kanayama, H. O., Ellerhorst, J., Lotan, R., and Raz, A. (2006) *Cancer Res.* 66, 3114-3119
- 102. Fukumori, T., Takenaka, Y., Yoshii, T., Kim, H. R., Hogan, V., Inohara, H., Kagawa, S., and Raz, A. (2003) *Cancer Res.* 63, 8302-8311

- 103. Hoyer, K. K., Pang, M., Gui, D., Shintaku, I. P., Kuwabara, I., Liu, F. T., Said, J. W., Baum, L. G., and Teitell, M. A. (2004) *Am. J. Pathol.* 164, 893-902
- 104. Oka, N., Nakahara, S., Takenaka, Y., Fukumori, T., Hogan, V., Kanayama, H. O., Yanagawa, T., and Raz, A. (2005) *Cancer Res.* 65, 7546-7553
- 105. Lee, Y. J., Song, Y. K., Song, J. J., Siervo-Sassi, R. R., Kim, H. R., Li, L., Spitz, D. R., Lokshin, A., and Kim, J. H. (2003) *Exp. Cell Res.* 288, 21-34
- 106. Califice, S., Castronovo, V., Bracke, M., and van den Brule, F. (2004) Oncogene 23, 7527-7536
- 107. Perillo, N. L., Pace, K. E., Seilhamer, J. J., and Baum, L. G. (1995) Nature 378, 736-739
- 108. Perillo, N. L., Uittenbogaart, C. H., Nguyen, J. T., and Baum, L. G. (1997) *J. Exp. Med.* 185, 1851-1858
- Perone, M. J., Larregina, A. T., Shufesky, W. J., Papworth, G. D., Sullivan, M. L.,
 Zahorchak, A. F., Stolz, D. B., Baum, L. G., Watkins, S. C., Thomson, A. W., and Morelli,
 A. E. (2006) J. Immunol. 176, 7207-7220
- 110. He, J., and Baum, L. G. (2004) J. Biol. Chem. 279, 4705-4712
- 111. Stillman, B. N., Hsu, D. K., Pang, M., Brewer, C. F., Johnson, P., Liu, F. T., and Baum, L. G. (2006) *J. Immunol.* 176, 778-789
- 112. Hadari, Y. R., Arbel-Goren, R., Levy, Y., Amsterdam, A., Alon, R., Zakut, R., and Zick, Y. (2000) *J. Cell Sci.* 113 (Pt 13), 2385-2397
- 113. Wada, J., Ota, K., Kumar, A., Wallner, E. I., and Kanwar, Y. S. (1997) *J. Clin. Investig.* 99, 2452-2461
- 114. Vyakarnam, A., Dagher, S. F., Wang, J. L., and Patterson, R. J. (1997) *Mol. Cell. Biol.* 17, 4730-4737
- 115. Park, J. W., Voss, P. G., Grabski, S., Wang, J. L., and Patterson, R. J. (2001) Nucleic Acids Res. 29, 3595-3602
- 116. Paushkin, S., Gubitz, A. K., Massenet, S., and Dreyfuss, G. (2002) *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 305-312
- 117. Camby, I., Le Mercier, M., Lefranc, F., and Kiss, R. (2006) Glycobiology 16, 137R-157R
- 118. Wang, W., Park, J. W., Wang, J. L., and Patterson, R. J. (2006) *Nucleic Acids Res.* 34, 5166-5174
- 119. Thurston, T. L., Wandel, M. P., von Muhlinen, N., Foeglein, A., and Randow, F. (2012) Nature 482, 414-418
- 120. Yang, R. Y., Yu, L., Graham, J. L., Hsu, D. K., Lloyd, K. C., Havel, P. J., and Liu, F. T. (2011) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108, 18696-18701
- 121. Bornstein, P., and Sage, E. H. (2002) Curr. Opin. Cell Biol. 14, 608-616
- 122. van den Brule, F. A., Buicu, C., Baldet, M., Sobel, M. E., Cooper, D. N., Marschal, P., and Castronovo, V. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209, 760-767
- 123. van den Brule, F., Califice, S., Garnier, F., Fernandez, P. L., Berchuck, A., and Castronovo, V. (2003) *Lab. Invest.* 83, 377-386
- 124. Horiguchi, N., Arimoto, K., Mizutani, A., Endo-Ichikawa, Y., Nakada, H., and Taketani, S. (2003) J Biochem 134, 869-874
- 125. Gu, M., Wang, W., Song, W. K., Cooper, D. N., and Kaufman, S. J. (1994) *J. Cell Sci.* 107 (Pt 1), 175-181
- 126. Kuwabara, I., and Liu, F. T. (1996) J. Immunol. 156, 3939-3944
- 127. Matarrese, P., Fusco, O., Tinari, N., Natoli, C., Liu, F. T., Semeraro, M. L., Malorni, W., and Iacobelli, S. (2000) Int. J. Cancer 85, 545-554
- 128. Ochieng, J., Leite-Browning, M. L., and Warfield, P. (1998) *Biochem. Biophys. Res.* Commun. 246, 788-791

- 129. Nangia-Makker, P., Balan, V., and Raz, A. (2008) Cancer Microenviron. 1, 43-51
- 130. Levy, Y., Arbel-Goren, R., Hadari, Y. R., Eshhar, S., Ronen, D., Elhanany, E., Geiger, B., and Zick, Y. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 31285-31295
- 131. Kasamatsu, A., Uzawa, K., Nakashima, D., Koike, H., Shiiba, M., Bukawa, H., Yokoe, H., and Tanzawa, H. (2005) *Int. J. Mol. Med.* 16, 269-273
- 132. Irie, A., Yamauchi, A., Kontani, K., Kihara, M., Liu, D., Shirato, Y., Seki, M., Nishi, N., Nakamura, T., Yokomise, H., and Hirashima, M. (2005) *Clin. Cancer Res.* 11, 2962-2968
- 133. Zick, Y., Eisenstein, M., Goren, R. A., Hadari, Y. R., Levy, Y., and Ronen, D. (2004) *Glycoconj. J.* 19, 517-526
- 134. Tinari, N., Kuwabara, I., Huflejt, M. E., Shen, P. F., Iacobelli, S., and Liu, F. T. (2001) Int. J. Cancer 91, 167-172
- 135. Inohara, H., Akahani, S., Koths, K., and Raz, A. (1996) Cancer Res. 56, 4530-4534
- 136. Glinsky, V. V., Huflejt, M. E., Glinsky, G. V., Deutscher, S. L., and Quinn, T. P. (2000) *Cancer Res.* 60, 2584-2588
- 137. Baum, L. G., Pang, M., Perillo, N. L., Wu, T., Delegeane, A., Uittenbogaart, C. H., Fukuda, M., and Seilhamer, J. J. (1995) *J. Exp. Med.* 181, 877-887
- 138. Khaldoyanidi, S. K., Glinsky, V. V., Sikora, L., Glinskii, A. B., Mossine, V. V., Quinn, T. P., Glinsky, G. V., and Sriramarao, P. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 4127-4134
- 139. Krishnan, V., Bane, S. M., Kawle, P. D., Naresh, K. N., and Kalraiya, R. D. (2005) *Clin. Exp. Metastasis* 22, 11-24
- 140. Swarte, V. V., Mebius, R. E., Joziasse, D. H., Van den Eijnden, D. H., and Kraal, G. (1998) Eur. J. Immunol. 28, 2864-2871
- 141. Matsumoto, R., Matsumoto, H., Seki, M., Hata, M., Asano, Y., Kanegasaki, S., Stevens, R. L., and Hirashima, M. (1998) J. Biol. Chem. 273, 16976-16984
- 142. Kageshita, T., Kashio, Y., Yamauchi, A., Seki, M., Abedin, M. J., Nishi, N., Shoji, H., Nakamura, T., Ono, T., and Hirashima, M. (2002) *Int. J. Cancer* 99, 809-816
- 143. Fulcher, J. A., Hashimi, S. T., Levroney, E. L., Pang, M., Gurney, K. B., Baum, L. G., and Lee, B. (2006) *J. Immunol.* 177, 216-226
- 144. Mott, J. D., and Werb, Z. (2004) Curr. Opin. Cell Biol. 16, 558-564
- Fulcher, J. A., Chang, M. H., Wang, S., Almazan, T., Hashimi, S. T., Eriksson, A. U., Wen, X., Pang, M., Baum, L. G., Singh, R. R., and Lee, B. (2009) *J. Biol. Chem.* 284, 26860-26870
- 146. Moiseeva, E. P., Spring, E. L., Baron, J. H., and de Bono, D. P. (1999) *J. Vasc. Res.* 36, 47-58
- 147. Camby, I., Belot, N., Lefranc, F., Sadeghi, N., de Launoit, Y., Kaltner, H., Musette, S., Darro, F., Danguy, A., Salmon, I., Gabius, H. J., and Kiss, R. (2002) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 61, 585-596
- 148. Rorive, S., Belot, N., Decaestecker, C., Lefranc, F., Gordower, L., Micik, S., Maurage, C. A., Kaltner, H., Ruchoux, M. M., Danguy, A., Gabius, H. J., Salmon, I., Kiss, R., and Camby, I. (2001) *Glia* 33, 241-255
- 149. Thijssen, V. L., Postel, R., Brandwijk, R. J., Dings, R. P., Nesmelova, I., Satijn, S., Verhofstad, N., Nakabeppu, Y., Baum, L. G., Bakkers, J., Mayo, K. H., Poirier, F., and Griffioen, A. W. (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103, 15975-15980
- 150. Maeda, N., Kawada, N., Seki, S., Arakawa, T., Ikeda, K., Iwao, H., Okuyama, H., Hirabayashi, J., Kasai, K., and Yoshizato, K. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 18938-18944
- 151. He, J., and Baum, L. G. (2006) Lab. Invest. 86, 578-590

- 152. Delbrouck, C., Doyen, I., Belot, N., Decaestecker, C., Ghanooni, R., de Lavareille, A., Kaltner, H., Choufani, G., Danguy, A., Vandenhoven, G., Gabius, H. J., Hassid, S., and Kiss, R. (2002) *Lab. Invest.* 82, 147-158
- 153. Hittelet, A., Legendre, H., Nagy, N., Bronckart, Y., Pector, J. C., Salmon, I., Yeaton, P., Gabius, H. J., Kiss, R., and Camby, I. (2003) *Int. J. Cancer* 103, 370-379
- 154. Fukushi, J., Makagiansar, I. T., and Stallcup, W. B. (2004) Mol. Biol. Cell 15, 3580-3590
- 155. Sano, H., Hsu, D. K., Yu, L., Apgar, J. R., Kuwabara, I., Yamanaka, T., Hirashima, M., and Liu, F. T. (2000) *J. Immunol.* 165, 2156-2164
- 156. Savino, W., Mendes-Da-Cruz, D. A., Smaniotto, S., Silva-Monteiro, E., and Villa-Verde, D. M. (2004) J. Leukoc. Biol. 75, 951-961
- 157. Melo, F. H., Butera, D., Junqueira Mde, S., Hsu, D. K., Moura da Silva, A. M., Liu, F. T., Santos, M. F., and Chammas, R. (2011) *PLoS ONE* 6, e29313
- 158. Lagana, A., Goetz, J. G., Cheung, P., Raz, A., Dennis, J. W., and Nabi, I. R. (2006) *Mol. Cell. Biol.* 26, 3181-3193
- 159. Saravanan, C., Liu, F. T., Gipson, I. K., and Panjwani, N. (2009) J. Cell Sci. 122, 3684-3693
- 160. Baseras, B., Gaida, M. M., Kahle, N., Schuppel, A. K., Kathrey, D., Prior, B., Wente, M., and Hansch, G. M. (2012) *Immunobiology* 217, 83-90
- 161. Puthenedam, M., Wu, F., Shetye, A., Michaels, A., Rhee, K. J., and Kwon, J. H. (2011) Inflamm. Bowel Dis. 17, 260-267
- 162. Le Marer, N., and Hughes, R. C. (1996) J. Cell. Physiol. 168, 51-58
- Camby, I., Belot, N., Rorive, S., Lefranc, F., Maurage, C. A., Lahm, H., Kaltner, H., Hadari, Y., Ruchoux, M. M., Brotchi, J., Zick, Y., Salmon, I., Gabius, H. J., and Kiss, R. (2001) Brain Pathol. 11, 12-26
- 164. Diskin, S., Cao, Z., Leffler, H., and Panjwani, N. (2009) Glycobiology 19, 29-37
- 165. Levy, Y., Ronen, D., Bershadsky, A. D., and Zick, Y. (2003) J. Biol. Chem. 278, 14533-14542
- 166. Matsushita, N., Nishi, N., Seki, M., Matsumoto, R., Kuwabara, I., Liu, F. T., Hata, Y., Nakamura, T., and Hirashima, M. (2000) J. Biol. Chem. 275, 8355-8360
- 167. Matsumoto, R., Hirashima, M., Kita, H., and Gleich, G. J. (2002) *J. Immunol.* 168, 1961-1967
- 168. Rabinovich, G. A., Baum, L. G., Tinari, N., Paganelli, R., Natoli, C., Liu, F. T., and Iacobelli, S. (2002) *Trends Immunol.* 23, 313-320
- 169. Offner, H., Celnik, B., Bringman, T. S., Casentini-Borocz, D., Nedwin, G. E., and Vandenbark, A. A. (1990) *J. Neuroimmunol.* 28, 177-184
- 170. Rabinovich, G. A., Daly, G., Dreja, H., Tailor, H., Riera, C. M., Hirabayashi, J., and Chernajovsky, Y. (1999) *J. Exp. Med.* 190, 385-398
- 171. Santucci, L., Fiorucci, S., Rubinstein, N., Mencarelli, A., Palazzetti, B., Federici, B., Rabinovich, G. A., and Morelli, A. (2003) *Gastroenterology* 124, 1381-1394
- 172. Toscano, M. A., Commodaro, A. G., Ilarregui, J. M., Bianco, G. A., Liberman, A., Serra, H. M., Hirabayashi, J., Rizzo, L. V., and Rabinovich, G. A. (2006) *J. Immunol.* 176, 6323-6332
- 173. Santucci, L., Fiorucci, S., Cammilleri, F., Servillo, G., Federici, B., and Morelli, A. (2000) Hepatology 31, 399-406
- 174. Perone, M. J., Bertera, S., Tawadrous, Z. S., Shufesky, W. J., Piganelli, J. D., Baum, L. G., Trucco, M., and Morelli, A. E. (2006) *J. Immunol.* 177, 5278-5289
- 175. van der Leij, J., van den Berg, A., Blokzijl, T., Harms, G., van Goor, H., Zwiers, P., van Weeghel, R., Poppema, S., and Visser, L. (2004) J. Pathol. 204, 511-518
- 176. Cedeno-Laurent, F., Opperman, M., Barthel, S. R., Kuchroo, V. K., and Dimitroff, C. J. (2012) J. Immunol. 188, 3127-3137

- 177. Jouault, T., El Abed-El Behi, M., Martinez-Esparza, M., Breuilh, L., Trinel, P. A., Chamaillard, M., Trottein, F., and Poulain, D. (2006) J. Immunol. 177, 4679-4687
- 178. Colnot, C., Ripoche, M. A., Milon, G., Montagutelli, X., Crocker, P. R., and Poirier, F. (1998) *Immunology* 94, 290-296
- 179. Jeon, S. B., Yoon, H. J., Chang, C. Y., Koh, H. S., Jeon, S. H., and Park, E. J. (2010) J. Immunol. 185, 7037-7046
- 180. Cortegano, I., del Pozo, V., Cardaba, B., de Andres, B., Gallardo, S., del Amo, A., Arrieta, I., Jurado, A., Palomino, P., Liu, F. T., and Lahoz, C. (1998) *J. Immunol.* 161, 385-389
- Lopez, E., del Pozo, V., Miguel, T., Sastre, B., Seoane, C., Civantos, E., Llanes, E., Baeza, M. L., Palomino, P., Cardaba, B., Gallardo, S., Manzarbeitia, F., Zubeldia, J. M., and Lahoz, C. (2006) J. Immunol. 176, 1943-1950
- 182. Zuberi, R. I., Hsu, D. K., Kalayci, O., Chen, H. Y., Sheldon, H. K., Yu, L., Apgar, J. R., Kawakami, T., Lilly, C. M., and Liu, F. T. (2004) *Am. J. Pathol.* 165, 2045-2053
- 183. Barrionuevo, P., Beigier-Bompadre, M., Ilarregui, J. M., Toscano, M. A., Bianco, G. A., Isturiz, M. A., and Rabinovich, G. A. (2007) *J. Immunol.* 178, 436-445
- 184. Sugimoto, N., Oida, T., Hirota, K., Nakamura, K., Nomura, T., Uchiyama, T., and Sakaguchi, S. (2006) *Int. Immunol.* 18, 1197-1209
- 185. Garin, M. I., Chu, C. C., Golshayan, D., Cernuda-Morollon, E., Wait, R., and Lechler, R. I. (2007) *Blood* 109, 2058-2065
- 186. Chung, C. D., Patel, V. P., Moran, M., Lewis, L. A., and Miceli, M. C. (2000) *J. Immunol.* 165, 3722-3729
- 187. Leffler, H., Carlsson, S., Hedlund, M., Qian, Y., and Poirier, F. (2004) *Glycoconj. J.* 19, 433-440
- 188. Gauthier, L., Rossi, B., Roux, F., Termine, E., and Schiff, C. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 13014-13019
- 189. Rossi, B., Espeli, M., Schiff, C., and Gauthier, L. (2006) J. Immunol. 177, 796-803
- 190. Karlsson, A., Christenson, K., Matlak, M., Bjorstad, A., Brown, K. L., Telemo, E., Salomonsson, E., Leffler, H., and Bylund, J. (2009) *Glycobiology* 19, 16-20
- 191. Caberoy, N. B., Alvarado, G., Bigcas, J. L., and Li, W. (2012) J. Cell. Physiol. 227, 401-407
- 192. Esteban, A., Popp, M. W., Vyas, V. K., Strijbis, K., Ploegh, H. L., and Fink, G. R. (2011) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108, 14270-14275
- 193. Kohatsu, L., Hsu, D. K., Jegalian, A. G., Liu, F. T., and Baum, L. G. (2006) *J. Immunol.* 177, 4718-4726
- 194. Fradin, C., Poulain, D., and Jouault, T. (2000) Infect. Immun. 68, 4391-4398
- 195. Ozaki, K., Inoue, K., Sato, H., Iida, A., Ohnishi, Y., Sekine, A., Odashiro, K., Nobuyoshi, M., Hori, M., Nakamura, Y., and Tanaka, T. (2004) *Nature* 429, 72-75
- 196. Hokama, A., Mizoguchi, E., Sugimoto, K., Shimomura, Y., Tanaka, Y., Yoshida, M., Rietdijk, S. T., de Jong, Y. P., Snapper, S. B., Terhorst, C., Blumberg, R. S., and Mizoguchi, A. (2004) *Immunity* 20, 681-693
- 197. Oomizu, S., Arikawa, T., Niki, T., Kadowaki, T., Ueno, M., Nishi, N., Yamauchi, A., and Hirashima, M. (2012) *Clin. Immunol.* 143, 51-58
- 198. Nishi, N., Shoji, H., Seki, M., Itoh, A., Miyanaka, H., Yuube, K., Hirashima, M., and Nakamura, T. (2003) *Glycobiology* 13, 755-763
- 199. Pace, K. E., Hahn, H. P., Pang, M., Nguyen, J. T., and Baum, L. G. (2000) *J. Immunol.* 165, 2331-2334
- 200. Walzel, H., Blach, M., Hirabayashi, J., Kasai, K. I., and Brock, J. (2000) *Glycobiology* 10, 131-140
- 201. Pace, K. E., Lee, C., Stewart, P. L., and Baum, L. G. (1999) J. Immunol. 163, 3801-3811

- 202. Nguyen, J. T., Evans, D. P., Galvan, M., Pace, K. E., Leitenberg, D., Bui, T. N., and Baum, L. G. (2001) *J. Immunol.* 167, 5697-5707
- 203. Galvan, M., Tsuboi, S., Fukuda, M., and Baum, L. G. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 16730-16737
- 204. Amano, M., Galvan, M., He, J., and Baum, L. G. (2003) J. Biol. Chem. 278, 7469-7475
- 205. Earl, L. A., Bi, S., and Baum, L. G. (2010) J. Biol. Chem. 285, 2232-2244
- 206. Allione, A., Wells, V., Forni, G., Mallucci, L., and Novelli, F. (1998) *J. Immunol.* 161, 2114-2119
- Rabinovich, G. A., Alonso, C. R., Sotomayor, C. E., Durand, S., Bocco, J. L., and Riera, C. M. (2000) *Cell Death Differ*. 7, 747-753
- 208. Matarrese, P., Tinari, A., Mormone, E., Bianco, G. A., Toscano, M. A., Ascione, B., Rabinovich, G. A., and Malorni, W. (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 6969-6985
- 209. Hahn, H. P., Pang, M., He, J., Hernandez, J. D., Yang, R. Y., Li, L. Y., Wang, X., Liu, F. T., and Baum, L. G. (2004) *Cell Death Differ*. 11, 1277-1286
- 210. Ion, G., Fajka-Boja, R., Toth, G. K., Caron, M., and Monostori, E. (2005) *Cell Death Differ*. 12, 1145-1147
- 211. Endharti, A. T., Zhou, Y. W., Nakashima, I., and Suzuki, H. (2005) *Eur. J. Immunol.* 35, 86-97
- 212. mkknYang, R. Y., Hsu, D. K., and Liu, F. T. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93, 6737-6742
- 213. Demetriou, M., Granovsky, M., Quaggin, S., and Dennis, J. W. (2001) *Nature* 409, 733-739
- 214. Zhu, C., Anderson, A. C., Schubart, A., Xiong, H., Imitola, J., Khoury, S. J., Zheng, X. X., Strom, T. B., and Kuchroo, V. K. (2005) *Nat Immunol* 6, 1245-1252
- Levroney, E. L., Aguilar, H. C., Fulcher, J. A., Kohatsu, L., Pace, K. E., Pang, M., Gurney, K. B., Baum, L. G., and Lee, B. (2005) *J. Immunol.* 175, 413-420
- Yang, M. L., Chen, Y. H., Wang, S. W., Huang, Y. J., Leu, C. H., Yeh, N. C., Chu, C. Y., Lin,
 C. C., Shieh, G. S., Chen, Y. L., Wang, J. R., Wang, C. H., Wu, C. L., and Shiau, A. L. (2011)
 J. Virol. 85, 10010-10020
- 217. Rajasagi, N. K., Suryawanshi, A., Sehrawat, S., Reddy, P. B., Mulik, S., Hirashima, M., and Rouse, B. T. (2012) *J. Immunol.*
- St-Pierre, C., Manya, H., Ouellet, M., Clark, G. F., Endo, T., Tremblay, M. J., and Sato, S. (2011) J. Virol. 85, 11742-11751
- 219. Elahi, S., Niki, T., Hirashima, M., and Horton, H. (2012) Blood
- 220. Danguy, A., Camby, I., and Kiss, R. (2002) Biochim. Biophys. Acta 1572, 285-293
- 221. Rabinovich, G. A. (2005) Br. J. Cancer 92, 1188-1192
- 222. Wu, H., Chen, P., Liao, R., Li, Y. W., Yi, Y., Wang, J. X., Sun, T. W., Zhou, J., Shi, Y. H., Yang, X. R., Jin, J. J., Cheng, Y. F., Fan, J., and Qiu, S. J. (2012) *J. Gastroenterol. Hepatol.*
- 223. van den Brule, F. A., Waltregny, D., and Castronovo, V. (2001) J. Pathol. 193, 80-87
- Cindolo, L., Benvenuto, G., Salvatore, P., Pero, R., Salvatore, G., Mirone, V., Prezioso,
 D., Altieri, V., Bruni, C. B., and Chiariotti, L. (1999) *Int. J. Cancer* 84, 39-43
- 225. Sanjuan, X., Fernandez, P. L., Castells, A., Castronovo, V., van den Brule, F., Liu, F. T., Cardesa, A., and Campo, E. (1997) *Gastroenterology* 113, 1906-1915
- 226. Szoke, T., Kayser, K., Baumhakel, J. D., Trojan, I., Furak, J., Tiszlavicz, L., Horvath, A., Szluha, K., Gabius, H. J., and Andre, S. (2005) *Oncology* 69, 167-174
- 227. Kamper, P., Ludvigsen, M., Bendix, K., Hamilton-Dutoit, S., Rabinovich, G. A., Moller, M. B., Nyengaard, J. R., Honore, B., and d'Amore, F. (2011) *Blood* 117, 6638-6649
- 228. Konstantinov, K. N., Robbins, B. A., and Liu, F. T. (1996) Am. J. Pathol. 148, 25-30

- 229. Fernandez, P. L., Merino, M. J., Gomez, M., Campo, E., Medina, T., Castronovo, V., Sanjuan, X., Cardesa, A., Liu, F. T., and Sobel, M. E. (1997) *J. Pathol.* 181, 80-86
- 230. Xu, X. C., el-Naggar, A. K., and Lotan, R. (1995) Am. J. Pathol. 147, 815-822
- 231. Rossi, E. D., Raffaelli, M., Mule, A., Miraglia, A., Lombardi, C. P., Vecchio, F. M., and Fadda, G. (2006) *Histopathology* 48, 795-800
- 232. Hsu, D. K., Dowling, C. A., Jeng, K. C., Chen, J. T., Yang, R. Y., and Liu, F. T. (1999) Int. J. Cancer 81, 519-526
- Young, A. N., Amin, M. B., Moreno, C. S., Lim, S. D., Cohen, C., Petros, J. A., Marshall, F.
 F., and Neish, A. S. (2001) Am. J. Pathol. 158, 1639-1651
- 234. Bresalier, R. S., Mazurek, N., Sternberg, L. R., Byrd, J. C., Yunker, C. K., Nangia-Makker, P., and Raz, A. (1998) *Gastroenterology* 115, 287-296
- Prieto, V. G., Mourad-Zeidan, A. A., Melnikova, V., Johnson, M. M., Lopez, A., Diwan, A. H., Lazar, A. J., Shen, S. S., Zhang, P. S., Reed, J. A., Gershenwald, J. E., Raz, A., and Bar-Eli, M. (2006) *Clin. Cancer Res.* 12, 6709-6715
- 236. Xie, L., Ni, W. K., Chen, X. D., Xiao, M. B., Chen, B. Y., He, S., Lu, C. H., Li, X. Y., Jiang, F., and Ni, R. Z. (2012) J. Cancer Res. Clin. Oncol.
- 237. Castronovo, V., Campo, E., van den Brule, F. A., Claysmith, A. P., Cioce, V., Liu, F. T., Fernandez, P. L., and Sobel, M. E. (1992) *J. Natl. Cancer Inst.* 84, 1161-1169
- 238. Castronovo, V., Van Den Brule, F. A., Jackers, P., Clausse, N., Liu, F. T., Gillet, C., and Sobel, M. E. (1996) *J. Pathol.* 179, 43-48
- 239. van den Brule, F. A., Price, J., Sobel, M. E., Lambotte, R., and Castronovo, V. (1994) Biochem. Biophys. Res. Commun. 201, 388-393
- 240. van den Brule, F. A., Buicu, C., Berchuck, A., Bast, R. C., Deprez, M., Liu, F. T., Cooper, D. N., Pieters, C., Sobel, M. E., and Castronovo, V. (1996) *Hum. Pathol.* 27, 1185-1191
- Wang, Y., Nangia-Makker, P., Tait, L., Balan, V., Hogan, V., Pienta, K. J., and Raz, A. (2009) Am. J. Pathol. 174, 1515-1523
- 242. Pacis, R. A., Pilat, M. J., Pienta, K. J., Wojno, K., Raz, A., Hogan, V., and Cooper, C. R. (2000) *Prostate* 44, 118-123
- 243. Merseburger, A. S., Kramer, M. W., Hennenlotter, J., Simon, P., Knapp, J., Hartmann, J. T., Stenzl, A., Serth, J., and Kuczyk, M. A. (2008) *Prostate* 68, 72-77
- 244. Park, S. H., Min, H. S., Kim, B., Myung, J., and Paek, S. H. (2008) *Neuropathology* 28, 497-506
- 245. Satelli, A., Rao, P. S., Thirumala, S., and Rao, U. S. (2011) Int. J. Cancer 129, 799-809
- 246. Su, Z. Z., Lin, J., Shen, R., Fisher, P. E., Goldstein, N. I., and Fisher, P. B. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 7252-7257
- 247. Kramer, M. W., Waalkes, S., Serth, J., Hennenlotter, J., Tezval, H., Stenzl, A., Kuczyk, M. A., and Merseburger, A. S. (2011) *Urol. Int.* 87, 143-150
- 248. Tureci, O., Schmitt, H., Fadle, N., Pfreundschuh, M., and Sahin, U. (1997) J. Biol. Chem. 272, 6416-6422
- 249. Yamaoka, K., Ohno, S., Kawasaki, H., and Suzuki, K. (1991) *Biochem. Biophys. Res.* Commun. 179, 272-279
- 250. Yamaoka, K., Mishima, K., Nagashima, Y., Asai, A., Sanai, Y., and Kirino, T. (2000) J. Neurosci. Res. 59, 722-730
- 251. Yoshii, T., Inohara, H., Takenaka, Y., Honjo, Y., Akahani, S., Nomura, T., Raz, A., and Kubo, T. (2001) Int. J. Oncol. 18, 787-792
- 252. Honjo, Y., Nangia-Makker, P., Inohara, H., and Raz, A. (2001) *Clin. Cancer Res.* 7, 661-668

- 253. Shalom-Feuerstein, R., Plowman, S. J., Rotblat, B., Ariotti, N., Tian, T., Hancock, J. F., and Kloog, Y. (2008) *Cancer Res.* 68, 6608-6616
- 254. Shalom-Feuerstein, R., Levy, R., Makovski, V., Raz, A., and Kloog, Y. (2008) *Biochim. Biophys. Acta* 1783, 985-993
- 255. Paz, A., Haklai, R., Elad-Sfadia, G., Ballan, E., and Kloog, Y. (2001) Oncogene 20, 7486-7493
- 256. Shalom-Feuerstein, R., Cooks, T., Raz, A., and Kloog, Y. (2005) *Cancer Res.* 65, 7292-7300
- 257. Lotan, R., Belloni, P. N., Tressler, R. J., Lotan, D., Xu, X. C., and Nicolson, G. L. (1994) *Glycoconj. J.* 11, 462-468
- 258. Thijssen, V. L., Barkan, B., Shoji, H., Aries, I. M., Mathieu, V., Deltour, L., Hackeng, T. M., Kiss, R., Kloog, Y., Poirier, F., and Griffioen, A. W. (2010) *Cancer Res.* 70, 6216-6224
- 259. Ito, K., and Ralph, S. J. (2012) Clin. Exp. Metastasis
- Yu, L. G., Andrews, N., Zhao, Q., McKean, D., Williams, J. F., Connor, L. J., Gerasimenko,
 O. V., Hilkens, J., Hirabayashi, J., Kasai, K., and Rhodes, J. M. (2007) *J. Biol. Chem.* 282, 773-781
- 261. Glinsky, V. V., Kiriakova, G., Glinskii, O. V., Mossine, V. V., Mawhinney, T. P., Turk, J. R., Glinskii, A. B., Huxley, V. H., Price, J. E., and Glinsky, G. V. (2009) *Neoplasia* 11, 901-909
- 262. Markowska, A. I., Liu, F. T., and Panjwani, N. (2010) J. Exp. Med. 207, 1981-1993
- 263. Mourad-Zeidan, A. A., Melnikova, V. O., Wang, H., Raz, A., and Bar-Eli, M. (2008) *Am. J. Pathol.* 173, 1839-1852
- 264. Lampugnani, M. G., Resnati, M., Raiteri, M., Pigott, R., Pisacane, A., Houen, G., Ruco, L. P., and Dejana, E. (1992) J. Cell Biol. 118, 1511-1522
- Singh, R. K., Gutman, M., Radinsky, R., Bucana, C. D., and Fidler, I. J. (1994) *Cancer Res.* 54, 3242-3247
- 266. Luca, M., Huang, S., Gershenwald, J. E., Singh, R. K., Reich, R., and Bar-Eli, M. (1997) *Am. J. Pathol.* 151, 1105-1113
- Liu, C., Calogero, A., Ragona, G., Adamson, E., and Mercola, D. (1996) Crit. Rev. Oncog.
 7, 101-125
- 268. Barrow, H., Guo, X., Wandall, H. H., Pedersen, J. W., Fu, B., Zhao, Q., Chen, C., Rhodes, J. M., and Yu, L. G. (2011) *Clin. Cancer Res.* 17, 7035-7046
- 269. Jung, J. H., Kim, H. J., Yeom, J., Yoo, C., Shin, J., Yoo, J., Kang, C. S., and Lee, C. (2011) J. Gastroenterol.
- Delgado, V. M., Nugnes, L. G., Colombo, L. L., Troncoso, M. F., Fernandez, M. M., Malchiodi, E. L., Frahm, I., Croci, D. O., Compagno, D., Rabinovich, G. A., Wolfenstein-Todel, C., and Elola, M. T. (2011) *FASEB J.* 25, 242-254
- 271. Ellerhorst, J. A., Stephens, L. C., Nguyen, T., and Xu, X. C. (2002) Prostate 50, 64-70
- 272. Ellerhorst, J., Troncoso, P., Xu, X. C., Lee, J., and Lotan, R. (1999) Urol. Res. 27, 362-367
- 273. Lin, C. I., Whang, E. E., Donner, D. B., Jiang, X., Price, B. D., Carothers, A. M., Delaine, T., Leffler, H., Nilsson, U. J., Nose, V., Moore, F. D., Jr., and Ruan, D. T. (2009) *Mol. Cancer Res.* 7, 1655-1662
- Cheng, Y. L., Huang, W. C., Chen, C. L., Tsai, C. C., Wang, C. Y., Chiu, W. H., Chen, Y. L., Lin, Y. S., Chang, C. F., and Lin, C. F. (2011) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 412, 334-340
- 275. Kadowaki, T., Arikawa, T., Shinonaga, R., Oomizu, S., Inagawa, H., Soma, G., Niki, T., and Hirashima, M. (2011) *Clin. Immunol*.

- 276. Kobayashi, T., Kuroda, J., Ashihara, E., Oomizu, S., Terui, Y., Taniyama, A., Adachi, S., Takagi, T., Yamamoto, M., Sasaki, N., Horiike, S., Hatake, K., Yamauchi, A., Hirashima, M., and Taniwaki, M. (2010) *Leukemia* 24, 843-850
- 277. Moiseeva, E. P., Williams, B., Goodall, A. H., and Samani, N. J. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310, 1010-1016
- Carcamo, C., Pardo, E., Oyanadel, C., Bravo-Zehnder, M., Bull, P., Caceres, M., Martinez, J., Massardo, L., Jacobelli, S., Gonzalez, A., and Soza, A. (2006) *Exp. Cell Res.* 312, 374-386
- Wu, M. H., Hong, T. M., Cheng, H. W., Pan, S. H., Liang, Y. R., Hong, H. C., Chiang, W. F., Wong, T. Y., Shieh, D. B., Shiau, A. L., Jin, Y. T., and Chen, Y. L. (2009) *Mol. Cancer Res.* 7, 311-318
- 280. Nangia-Makker, P., Wang, Y., Raz, T., Tait, L., Balan, V., Hogan, V., and Raz, A. (2010) Int. J. Cancer 127, 2530-2541
- 281. Nangia-Makker, P., Raz, T., Tait, L., Hogan, V., Fridman, R., and Raz, A. (2007) *Cancer Res.* 67, 11760-11768
- 282. Fry, S. A., Van den Steen, P. E., Royle, L., Wormald, M. R., Leathem, A. J., Opdenakker, G., McDonnell, J. M., Dwek, R. A., and Rudd, P. M. (2006) *Biochemistry* 45, 15249-15258
- 283. Ortega, N., Behonick, D. J., Colnot, C., Cooper, D. N., and Werb, Z. (2005) *Mol. Biol. Cell* 16, 3028-3039
- 284. Ochieng, J., Green, B., Evans, S., James, O., and Warfield, P. (1998) *Biochim. Biophys.* Acta 1379, 97-106
- 285. Ochieng, J., Fridman, R., Nangia-Makker, P., Kleiner, D. E., Liotta, L. A., Stetler-Stevenson, W. G., and Raz, A. (1994) *Biochemistry* 33, 14109-14114
- 286. Kim, S. J., Shin, J. Y., Lee, K. D., Bae, Y. K., Choi, I. J., Park, S. H., and Chun, K. H. (2011) PLoS ONE 6, e25103
- 287. Kim, S. J., Choi, I. J., Cheong, T. C., Lee, S. J., Lotan, R., Park, S. H., and Chun, K. H. (2010) Gastroenterology 138, 1035-1045 e1031-1032
- 288. Wang, Y. G., Kim, S. J., Baek, J. H., Lee, H. W., Jeong, S. Y., and Chun, K. H. (2012) *Exp. Mol. Med.*
- 289. Cedeno-Laurent, F., and Dimitroff, C. J. (2011) Clin. Immunol.
- 290. Mobergslien, A., and Sioud, M. (2011) J. Leukoc. Biol.
- 291. Soldati, R., Berger, E., Zenclussen, A. C., Jorch, G., Lode, H. N., Salatino, M., Rabinovich, G. A., and Fest, S. (2011) Int. J. Cancer
- 292. Tang, D., Yuan, Z., Xue, X., Lu, Z., Zhang, Y., Wang, H., Chen, M., An, Y., Wei, J., Zhu, Y., Miao, Y., and Jiang, K. (2011) Int. J. Cancer
- 293. Rabinovich, G. A., Ramhorst, R. E., Rubinstein, N., Corigliano, A., Daroqui, M. C., Kier-Joffe, E. B., and Fainboim, L. (2002) *Cell Death Differ*. 9, 661-670
- Rubinstein, N., Alvarez, M., Zwirner, N. W., Toscano, M. A., Ilarregui, J. M., Bravo, A., Mordoh, J., Fainboim, L., Podhajcer, O. L., and Rabinovich, G. A. (2004) *Cancer Cell* 5, 241-251
- 295. Zubieta, M. R., Furman, D., Barrio, M., Bravo, A. I., Domenichini, E., and Mordoh, J. (2006) *Am. J. Pathol.* 168, 1666-1675
- 296. Rabinovich, G. A., Ariel, A., Hershkoviz, R., Hirabayashi, J., Kasai, K. I., and Lider, O. (1999) *Immunology* 97, 100-106
- 297. Demers, M., Magnaldo, T., and St-Pierre, Y. (2005) Cancer Res. 65, 5205-5210
- 298. Pienta, K. J., Naik, H., Akhtar, A., Yamazaki, K., Replogle, T. S., Lehr, J., Donat, T. L., Tait, L., Hogan, V., and Raz, A. (1995) *J Natl Cancer Inst* 87, 348-353

- 299. Nangia-Makker, P., Hogan, V., Honjo, Y., Baccarini, S., Tait, L., Bresalier, R., and Raz, A. (2002) J Natl Cancer Inst 94, 1854-1862
- 300. Kolatsi-Joannou, M., Price, K. L., Winyard, P. J., and Long, D. A. (2011) *PLoS ONE* 6, e18683
- Chauhan, D., Li, G., Podar, K., Hideshima, T., Neri, P., He, D., Mitsiades, N., Richardson, P., Chang, Y., Schindler, J., Carver, B., and Anderson, K. C. (2005) *Cancer Res* 65, 8350-8358
- 302. Collins, P. M., Hidari, K. I., and Blanchard, H. (2007) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 63, 415-419
- 303. Scott, S. A., Scott, K., and Blanchard, H. (2007) *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 63, 967-971
- Carlsson, S., Oberg, C. T., Carlsson, M. C., Sundin, A., Nilsson, U. J., Smith, D., Cummings, R. D., Almkvist, J., Karlsson, A., and Leffler, H. (2007) *Glycobiology* 17, 663-676
- 305. Cumpstey, I., Sundin, A., Leffler, H., and Nilsson, U. J. (2005) Angew Chem Int Ed Engl 44, 5110-5112
- 306. Cedeno-Laurent, F., Opperman, M. J., Barthel, S. R., Hays, D., Schatton, T., Zhan, Q., He, X., Matta, K. L., Supko, J. G., Frank, M. H., Murphy, G. F., and Dimitroff, C. J. (2012) *J. Investig. Dermatol.* 132, 410-420
- 307. Cumpstey, I., Carlsson, S., Leffler, H., and Nilsson, U. J. (2005) Org Biomol Chem 3, 1922-1932
- 308. Andre, S., Pieters, R. J., Vrasidas, I., Kaltner, H., Kuwabara, I., Liu, F. T., Liskamp, R. M., and Gabius, H. J. (2001) *Chembiochem* 2, 822-830
- 309. Rabinovich, G. A., Cumashi, A., Bianco, G. A., Ciavardelli, D., Iurisci, I., D'Egidio, M., Piccolo, E., Tinari, N., Nifantiev, N., and Iacobelli, S. (2006) *Glycobiology* 16, 210-220
- 310. Stillman, B. N., Hsu, D. K., Pang, M., Brewer, C. F., Johnson, P., Liu, F. T., and Baum, L. G. (2006) *J Immunol* 176, 778-789
- 311. Collins, P. M., Oberg, C. T., Leffler, H., Nilsson, U. J., and Blanchard, H. (2012) Chem. Biol. Drug Des. 79, 339-346
- 312. Masuyer, G., Jabeen, T., Oberg, C. T., Leffler, H., Nilsson, U. J., and Acharya, K. R. (2012) FEBS J. 279, 193-202
- 313. Arnusch, C. J., Andre, S., Valentini, P., Lensch, M., Russwurm, R., Siebert, H. C., Fischer, M. J., Gabius, H. J., and Pieters, R. J. (2004) *Bioorg Med Chem Lett* 14, 1437-1440
- 314. Pieters, R. J. (2006) Chembiochem 7, 721-728
- 315. Zou, J., Glinsky, V. V., Landon, L. A., Matthews, L., and Deutscher, S. L. (2005) *Carcinogenesis* 26, 309-318
- 316. Glinskii, O. V., Sud, S., Mossine, V. V., Mawhinney, T. P., Anthony, D. C., Glinsky, G. V., Pienta, K. J., and Glinsky, V. V. (2012) *Neoplasia* 14, 65-73
- 317. Park, J. W., Voss, P. G., Grabski, S., Wang, J. L., and Patterson, R. J. (2001) Nucleic Acids Res 29, 3595-3602
- 318. Voss, P. G., Gray, R. M., Dickey, S. W., Wang, W., Park, J. W., Kasai, K., Hirabayashi, J., Patterson, R. J., and Wang, J. L. (2008) Arch. Biochem. Biophys. 478, 18-25
- 319. Wang, W., Park, J. W., Wang, J. L., and Patterson, R. J. (2006) *Nucleic Acids Res* 34, 5166-5174
- 320. Demers, M., Rose, A. A., Grosset, A. A., Biron-Pain, K., Gaboury, L., Siegel, P. M., and St-Pierre, Y. (2010) Am. J. Pathol. 176, 3023-3031
- 321. 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, 5823-5829

- 322. Magnaldo, T., Bernerd, F., and Darmon, M. (1995) Dev. Biol. 168, 259-271
- 323. Hughes, R. C. (1999) Biochim. Biophys. Acta 1473, 172-185
- Kopitz, J., Andre, S., von Reitzenstein, C., Versluis, K., Kaltner, H., Pieters, R. J., Wasano, K., Kuwabara, I., Liu, F. T., Cantz, M., Heck, A. J., and Gabius, H. J. (2003) Oncogene 22, 6277-6288
- 325. Sato, M., Nishi, N., Shoji, H., Kumagai, M., Imaizumi, T., Hata, Y., Hirashima, M., Suzuki, S., and Nakamura, T. (2002) J Biochem 131, 255-260
- 326. Kuwabara, I., Kuwabara, Y., Yang, R. Y., Schuler, M., Green, D. R., Zuraw, B. L., Hsu, D. K., and Liu, F. T. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 3487-3497
- 327. Timmons, P. M., Colnot, C., Cail, I., Poirier, F., and Magnaldo, T. (1999) Int. J. Dev. Biol. 43, 229-235
- 328. Magnaldo, T., Fowlis, D., and Darmon, M. (1998) Differentiation 63, 159-168
- 329. Young, P. P., Modur, V., Teleron, A. A., and Ladenson, J. H. (2005) *Circulation* 111, 2382-2390
- 330. Delbrouck, C., Souchay, C., Kaltner, H., Andre, S., Gabius, H. J., Vandenhoven, G., and Hassid, S. (2005) *B-ENT* 1, 137-144
- 331. Matsui, Y., Ueda, S., Watanabe, J., Kuwabara, I., Ogawa, O., and Nishiyama, H. (2007) Cancer Res. 67, 1212-1220
- 332. Shen, J., Riggs, P. K., Hensley, S. C., Schroeder, L. J., Traner, A. R., Kochan, K. J., Person, M. D., and DiGiovanni, J. (2007) *Mol. Carcinog.* 46, 331-340
- 333. Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J. L., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1997) *Nature* 389, 300-305
- 334. Shen, J., Pavone, A., Mikulec, C., Hensley, S. C., Traner, A., Chang, T. K., Person, M. D., and Fischer, S. M. (2007) J. Proteome Res. 6, 273-286
- 335. Bernerd, F., Sarasin, A., and Magnaldo, T. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 11329-11334
- 336. Lee, J. S., Lee, Y., Jeon, B., Jeon, Y., Yoo, H., and Kim, T. Y. (2012) *J. Dermatol. Sci.* 65, 126-133
- 337. Cao, Z., Wu, H. K., Bruce, A., Wollenberg, K., and Panjwani, N. (2002) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 2897-2904
- 338. Moisan, S., Demers, M., Mercier, J., Magnaldo, T., Potworowski, E. F., and St-Pierre, Y. (2003) *Leukemia* 17, 751-759
- 339. Fuchs, E. (2007) Nature 445, 834-842
- 340. Brouard, M., and Barrandon, Y. (2003) Curr. Opin. Biotechnol. 14, 520-525
- 341. Fred Brewer, C. (2002) Biochim. Biophys. Acta 1572, 255-262
- 342. Hughes, R. C. (2001) Biochimie 83, 667-676
- 343. Cao, Z., Said, N., Wu, H. K., Kuwabara, I., Liu, F. T., and Panjwani, N. (2003) Arch. Ophthalmol. 121, 82-86
- 344. Cao, Z., Wu, H. K., Bruce, A., Wollenberg, K., and Panjwani, N. (2002) Invest Ophthalmol Vis Sci 43, 2897-2904
- 345. 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, 42299-42305
- 346. Cao, Z., Said, N., Wu, H. K., Kuwabara, I., Liu, F. T., and Panjwani, N. (2003) Arch Ophthalmol 121, 82-86
- 347. Gendronneau, G., Sidhu, S. S., Delacour, D., Dang, T., Calonne, C., Houzelstein, D., Magnaldo, T., and Poirier, F. (2008) *Mol Biol Cell* 19, 5541-5549
- 348. Yamaguchi, H., Pixley, F., and Condeelis, J. (2006) Eur J Cell Biol 85, 213-218
- 349. Bernerd, F., Magnaldo, T., and Darmon, M. (1992) J. Investig. Dermatol. 98, 902-910

- 350. Ueda, S., Kuwabara, I., and Liu, F. T. (2004) Cancer Res. 64, 5672-5676
- 351. Kuwabara, I., Kuwabara, Y., Yang, R. Y., Schuler, M., Green, D. R., Zuraw, B. L., Hsu, D. K., and Liu, F. T. (2002) *J Biol Chem* 277, 3487-3497
- 352. Villeneuve, C., Baricault, L., Canelle, L., Barboule, N., Racca, C., Monsarrat, B., Magnaldo, T., and Larminat, F. (2011) *Mol. Biol. Cell* 22, 999-1013
- 353. Fukumori, T., Takenaka, Y., Yoshii, T., Kim, H. R., Hogan, V., Inohara, H., Kagawa, S., and Raz, A. (2003) *Cancer Res* 63, 8302-8311
- 354. Hadari, Y. R., Arbel-Goren, R., Levy, Y., Amsterdam, A., Alon, R., Zakut, R., and Zick, Y. (2000) *J Cell Sci* 113 (Pt 13), 2385-2397
- 355. Kashio, Y., Nakamura, K., Abedin, M. J., Seki, M., Nishi, N., Yoshida, N., Nakamura, T., and Hirashima, M. (2003) *J Immunol* 170, 3631-3636
- 356. Lu, L. H., Nakagawa, R., Kashio, Y., Ito, A., Shoji, H., Nishi, N., Hirashima, M., Yamauchi, A., and Nakamura, T. (2007) *J Biochem* 141, 157-172
- 357. Inagaki, Y., Higashi, K., Kushida, M., Hong, Y. Y., Nakao, S., Higashiyama, R., Moro, T., Itoh, J., Mikami, T., Kimura, T., Shiota, G., Kuwabara, I., and Okazaki, I. (2008) *Gastroenterology* 134, 1180-1190
- 358. Zhu, H., Pei, H. P., Zeng, S., Chen, J., Shen, L. F., Zhong, M. Z., Yao, R. J., and Shen, H. (2009) *J. Proteome Res.* 8, 3969-3976
- 359. Lu, J., Pei, H., Kaeck, M., and Thompson, H. J. (1997) Mol. Carcinog. 20, 204-215
- Rorive, S., Eddafali, B., Fernandez, S., Decaestecker, C., Andre, S., Kaltner, H., Kuwabara, I., Liu, F. T., Gabius, H. J., Kiss, R., and Salmon, I. (2002) *Mod. Pathol.* 15, 1294-1301
- 361. Saussez, S., and Kiss, R. (2006) Cell Mol Life Sci 63, 686-697
- 362. Zhu, X., Ding, M., Yu, M. L., Feng, M. X., Tan, L. J., and Zhao, F. K. (2010) *BMC Cancer* 10, 290
- 363. Alves, P. M., Godoy, G. P., Gomes, D. Q., Medeiros, A. M., de Souza, L. B., da Silveira, E. J., Vasconcelos, M. G., and Queiroz, L. M. (2011) *Pathol. Res. Pract.* 207, 236-240
- 364. Demers, M., Biron-Pain, K., Hebert, J., Lamarre, A., Magnaldo, T., and St-Pierre, Y. (2007) *Cancer Res.* 67, 2824-2829
- 365. Aoudjit, F., Potworowski, E. F., Springer, T. A., and St-Pierre, Y. (1998) *J. Immunol.* 161, 2333-2338
- 366. Park, J. E., Chang, W. Y., and Cho, M. (2009) Oncol. Rep. 22, 1373-1379
- Takagi, D., Hato, N., Okada, M., Hakuba, N., Gyo, K., Shigemoto, K., Toda, T., Ogasawara, M., and Kameda, K. (2012) Otol. Neurotol. 33, 396-399
- 368. Saussez, S., Cludts, S., Capouillez, A., Mortuaire, G., Smetana, K., Jr., Kaltner, H., Andre, S., Leroy, X., Gabius, H. J., and Decaestecker, C. (2009) *Int. J. Oncol.* 34, 433-439
- Saussez, S., Cucu, D. R., Decaestecker, C., Chevalier, D., Kaltner, H., Andre, S., Wacreniez, A., Toubeau, G., Camby, I., Gabius, H. J., and Kiss, R. (2006) Ann. Surg. Oncol. 13, 999-1009
- 370. Greenlee, K. J., Werb, Z., and Kheradmand, F. (2007) Physiol. Rev. 87, 69-98
- 371. Kossakowska, A. E., Urbanski, S. J., and Janowska-Wieczorek, A. (2000) *Leuk*. *Lymphoma* 39, 485-493
- 372. Demers, M., Couillard, J., Belanger, S., and St-Pierre, Y. (2005) Crit. Rev. Immunol. 25, 493-523
- 373. Nagase, H., and Woessner, J. F., Jr. (1999) J. Biol. Chem. 274, 21491-21494
- 374. Sternlicht, M. D., and Werb, Z. (2001) Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 17, 463-516
- 375. Zucker, S., and Vacirca, J. (2004) Cancer Metastasis Rev. 23, 101-117

- 376. Berton, A., Rigot, V., Huet, E., Decarme, M., Eeckhout, Y., Patthy, L., Godeau, G., Hornebeck, W., Bellon, G., and Emonard, H. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 20458-20465
- 377. Acuff, H. B., Carter, K. J., Fingleton, B., Gorden, D. L., and Matrisian, L. M. (2006) *Cancer Res.* 66, 259-266
- 378. Aoudjit, F., Esteve, P. O., Desrosiers, M., Potworowski, E. F., and St-Pierre, Y. (1997) Int. J. Cancer 71, 71-78
- 379. Ortega, N., Wang, K., Ferrara, N., Werb, Z., and Vu, T. H. (2010) *Dis. Model. Mech.* 3, 224-235
- 380. Reponen, P., Sahlberg, C., Munaut, C., Thesleff, I., and Tryggvason, K. (1994) J. Cell Biol. 124, 1091-1102
- 381. Welgus, H. G., Campbell, E. J., Cury, J. D., Eisen, A. Z., Senior, R. M., Wilhelm, S. M., and Goldberg, G. I. (1990) *J. Clin. Investig.* 86, 1496-1502
- Ohno, I., Ohtani, H., Nitta, Y., Suzuki, J., Hoshi, H., Honma, M., Isoyama, S., Tanno, Y., Tamura, G., Yamauchi, K., Nagura, H., and Shirato, K. (1997) Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 16, 212-219
- 383. Kanbe, N., Tanaka, A., Kanbe, M., Itakura, A., Kurosawa, M., and Matsuda, H. (1999) *Eur. J. Immunol.* 29, 2645-2649
- 384. Weeks, B. S., Schnaper, H. W., Handy, M., Holloway, E., and Kleinman, H. K. (1993) J. Cell. Physiol. 157, 644-649
- 385. Albertsson, P., Kim, M. H., Jonges, L. E., Kitson, R. P., Kuppen, P. J., Johansson, B. R., Nannmark, U., and Goldfarb, R. H. (2000) *In Vivo* 14, 269-276
- 386. Bartholome, E. J., Van Aelst, I., Koyen, E., Kiss, R., Willems, F., Goldman, M., and Opdenakker, G. (2001) *J. Interferon Cytokine Res.* 21, 495-501
- Yao, P. M., Buhler, J. M., d'Ortho, M. P., Lebargy, F., Delclaux, C., Harf, A., and Lafuma,
 C. (1996) J. Biol. Chem. 271, 15580-15589
- 388. Atkinson, J. J., and Senior, R. M. (2003) Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 28, 12-24
- Schnaper, H. W., Grant, D. S., Stetler-Stevenson, W. G., Fridman, R., D'Orazi, G., Murphy, A. N., Bird, R. E., Hoythya, M., Fuerst, T. R., French, D. L., and et al. (1993) J. Cell. Physiol. 156, 235-246
- 390. Aoudjit, F., Potworowski, E. F., and St-Pierre, Y. (1998) J. Immunol. 160, 2967-2973
- 391. St-Pierre, Y., Couillard, J., and Van Themsche, C. (2004) *Expert Opin. Ther. Targets* 8, 473-489
- 392. Eberhardt, W., Huwiler, A., Beck, K. F., Walpen, S., and Pfeilschifter, J. (2000) J. Immunol. 165, 5788-5797
- 393. Shin, S. Y., Kim, J. H., Baker, A., Lim, Y., and Lee, Y. H. (2010) *Mol. Cancer Res.* 8, 507-519
- 394. Sato, H., and Seiki, M. (1993) Oncogene 8, 395-405
- 395. Kobayashi, T., Kishimoto, J., Ge, Y., Jin, W., Hudson, D. L., Ouahes, N., Ehama, R., Shinkai, H., and Burgeson, R. E. (2001) *EMBO Rep.* 2, 604-608
- 396. Yokoo, T., and Kitamura, M. (1996) Am. J. Physiol. 270, F123-130
- 397. Ricca, A., Biroccio, A., Del Bufalo, D., Mackay, A. R., Santoni, A., and Cippitelli, M. (2000) Int. J. Cancer 86, 188-196
- 398. Yan, C., Wang, H., and Boyd, D. D. (2001) J. Biol. Chem. 276, 1164-1172
- 399. Gum, R., Lengyel, E., Juarez, J., Chen, J. H., Sato, H., Seiki, M., and Boyd, D. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 10672-10680
- 400. Watabe, T., Yoshida, K., Shindoh, M., Kaya, M., Fujikawa, K., Sato, H., Seiki, M., Ishii, S., and Fujinaga, K. (1998) *Int. J. Cancer* 77, 128-137

- 401. Van den Steen, P. E., Dubois, B., Nelissen, I., Rudd, P. M., Dwek, R. A., and Opdenakker, G. (2002) Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 37, 375-536
- 402. Shao, H., Kono, D. H., Chen, L. Y., Rubin, E. M., and Kaye, J. (1997) *J. Exp. Med.* 185, 731-744
- 403. Ke, J., Gururajan, M., Kumar, A., Simmons, A., Turcios, L., Chelvarajan, R. L., Cohen, D. M., Wiest, D. L., Monroe, J. G., and Bondada, S. (2006) *J. Biol. Chem.* 281, 39806-39818
- 404. Cao, X. M., Guy, G. R., Sukhatme, V. P., and Tan, Y. H. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 1345-1349
- 405. Son, S. W., Min, B. W., Lim, Y., Lee, Y. H., and Shin, S. Y. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374, 777-782
- 406. Grimbacher, B., Aicher, W. K., Peter, H. H., and Eibel, H. (1998) *Rheumatol. Int.* 17, 185-192
- 407. Chaudhary, L. R., Cheng, S. L., and Avioli, L. V. (1996) Mol. Cell. Biochem. 156, 69-77
- 408. Ko, Y., Totzke, G., Seewald, S., Schmitz, U., Schiermeyer, B., Meyer zu Brickwedde, M. K., Vetter, H., and Sachinidis, A. (1995) *Eur. J. Cell Biol.* 68, 306-312
- 409. Delbridge, G. J., and Khachigian, L. M. (1997) Circ. Res. 81, 282-288
- 410. Santiago, F. S., Lowe, H. C., Day, F. L., Chesterman, C. N., and Khachigian, L. M. (1999) *Am. J. Pathol.* 154, 937-944
- Sukhatme, V. P., Cao, X. M., Chang, L. C., Tsai-Morris, C. H., Stamenkovich, D., Ferreira,
 P. C., Cohen, D. R., Edwards, S. A., Shows, T. B., Curran, T., and et al. (1988) *Cell* 53, 37-43
- 412. Bouchard, F., Belanger, S. D., Biron-Pain, K., and St-Pierre, Y. (2010) Blood 116, 759-766
- 413. Bae, S. K., Bae, M. H., Ahn, M. Y., Son, M. J., Lee, Y. M., Bae, M. K., Lee, O. H., Park, B. C., and Kim, K. W. (1999) *Cancer Res.* 59, 5989-5994
- 414. Fu, M., Zhu, X., Zhang, J., Liang, J., Lin, Y., Zhao, L., Ehrengruber, M. U., and Chen, Y. E. (2003) *Gene* 315, 33-41
- 415. Yan, S. F., Fujita, T., Lu, J., Okada, K., Shan Zou, Y., Mackman, N., Pinsky, D. J., and Stern, D. M. (2000) *Nat. Med.* 6, 1355-1361
- 416. Sells, S. F., Muthukumar, S., Sukhatme, V. P., Crist, S. A., and Rangnekar, V. M. (1995) Mol. Cell. Biol. 15, 682-692
- 417. Calogero, A., Cuomo, L., D'Onofrio, M., de Grazia, U., Spinsanti, P., Mercola, D., Faggioni, A., Frati, L., Adamson, E. D., and Ragona, G. (1996) *Oncogene* 13, 2105-2112
- Scharnhorst, V., Menke, A. L., Attema, J., Haneveld, J. K., Riteco, N., van Steenbrugge,
 G. J., van der Eb, A. J., and Jochemsen, A. G. (2000) *Oncogene* 19, 791-800
- 419. Fahmy, R. G., Dass, C. R., Sun, L. Q., Chesterman, C. N., and Khachigian, L. M. (2003) *Nat. Med.* 9, 1026-1032
- 420. Liu, C., Adamson, E., and Mercola, D. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 11831-11836
- Lucerna, M., Pomyje, J., Mechtcheriakova, D., Kadl, A., Gruber, F., Bilban, M., Sobanov, Y., Schabbauer, G., Breuss, J., Wagner, O., Bischoff, M., Clauss, M., Binder, B. R., and Hofer, E. (2006) *Cancer Res.* 66, 6708-6713
- 422. Chicoine, E., Esteve, P. O., Robledo, O., Van Themsche, C., Potworowski, E. F., and St-Pierre, Y. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297, 765-772
- 423. MacDougall, J. R., Bani, M. R., Lin, Y., Muschel, R. J., and Kerbel, R. S. (1999) Br. J. Cancer 80, 504-512
- 424. Trainer, D. L., Kline, T., Mallon, F., Greig, R., and Poste, G. (1985) *Cancer Res.* 45, 6124-6130
- 425. Sato, N., Maehara, N., Su, G. H., and Goggins, M. (2003) J. Natl. Cancer Inst. 95, 327-330

- 426. Ram, M., Sherer, Y., and Shoenfeld, Y. (2006) J. Clin. Immunol. 26, 299-307
- 427. Mostafa Mtairag, E., Chollet-Martin, S., Oudghiri, M., Laquay, N., Jacob, M. P., Michel, J. B., and Feldman, L. J. (2001) *Cardiovasc. Res.* 49, 882-890
- 428. Baram, D., Vaday, G. G., Salamon, P., Drucker, I., Hershkoviz, R., and Mekori, Y. A. (2001) *J. Immunol.* 167, 4008-4016
- 429. Schonbeck, U., Mach, F., Sukhova, G. K., Murphy, C., Bonnefoy, J. Y., Fabunmi, R. P., and Libby, P. (1997) *Circ. Res.* 81, 448-454
- 430. Werb, Z., Tremble, P. M., Behrendtsen, O., Crowley, E., and Damsky, C. H. (1989) *J. Cell Biol.* 109, 877-889
- 431. Ahmed, N., Pansino, F., Clyde, R., Murthi, P., Quinn, M. A., Rice, G. E., Agrez, M. V., Mok, S., and Baker, M. S. (2002) *Carcinogenesis* 23, 237-244
- 432. Wize, J., Sopata, I., Smerdel, A., and Maslinski, S. (1998) Inflamm. Res. 47, 325-327
- 433. DiPersio, C. M., Shao, M., Di Costanzo, L., Kreidberg, J. A., and Hynes, R. O. (2000) *J. Cell Sci.* 113 (Pt 16), 2909-2921
- 434. Morini, M., Mottolese, M., Ferrari, N., Ghiorzo, F., Buglioni, S., Mortarini, R., Noonan, D. M., Natali, P. G., and Albini, A. (2000) *Int. J. Cancer* 87, 336-342
- 435. Bond, M., Chase, A. J., Baker, A. H., and Newby, A. C. (2001) *Cardiovasc. Res.* 50, 556-565
- 436. Genersch, E., Hayess, K., Neuenfeld, Y., and Haller, H. (2000) J. Cell Sci. 113 Pt 23, 4319-4330
- 437. Xie, B., Laouar, A., and Huberman, E. (1998) J. Biol. Chem. 273, 11576-11582
- 438. Diaz-Meco, M. T., Dominguez, I., Sanz, L., Dent, P., Lozano, J., Municio, M. M., Berra, E., Hay, R. T., Sturgill, T. W., and Moscat, J. (1994) *EMBO J.* 13, 2842-2848
- Diaz-Meco, M. T., Lozano, J., Municio, M. M., Berra, E., Frutos, S., Sanz, L., and Moscat, J. (1994) J. Biol. Chem. 269, 31706-31710
- 440. Esteve, P. O., Chicoine, E., Robledo, O., Aoudjit, F., Descoteaux, A., Potworowski, E. F., and St-Pierre, Y. (2002) J. Biol. Chem. 277, 35150-35155
- 441. Lewis, T. S., Shapiro, P. S., and Ahn, N. G. (1998) Adv. Cancer Res. 74, 49-139
- 442. Cobb, M. H., and Goldsmith, E. J. (1995) J. Biol. Chem. 270, 14843-14846
- 443. McCawley, L. J., Li, S., Wattenberg, E. V., and Hudson, L. G. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 4347-4353
- 444. Schlessinger, J. (2000) Cell 103, 211-225
- 445. Simon, C., Hicks, M. J., Nemechek, A. J., Mehta, R., O'Malley, B. W., Jr., Goepfert, H., Flaitz, C. M., and Boyd, D. (1999) *Br. J. Cancer* 80, 1412-1419
- 446. Baud, V., and Karin, M. (2001) Trends Cell Biol. 11, 372-377
- 447. Johansson, N., Ala-aho, R., Uitto, V., Grenman, R., Fusenig, N. E., Lopez-Otin, C., and Kahari, V. M. (2000) *J. Cell Sci.* 113 Pt 2, 227-235
- 448. Allan, J. A., Docherty, A. J., Barker, P. J., Huskisson, N. S., Reynolds, J. J., and Murphy, G. (1995) *Biochem. J.* 309 (Pt 1), 299-306
- 449. Nair, R. R., and Boyd, D. D. (2005) Biochem. Soc. Trans. 33, 1135-1136
- 450. Toth, M., Chvyrkova, I., Bernardo, M. M., Hernandez-Barrantes, S., and Fridman, R. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308, 386-395
- 451. Hahn-Dantona, E., Ramos-DeSimone, N., Sipley, J., Nagase, H., French, D. L., and Quigley, J. P. (1999) Ann. N. Y. Acad. Sci. 878, 372-387
- 452. Lambert, E., Dasse, E., Haye, B., and Petitfrere, E. (2004) Crit. Rev. Oncol. Hematol. 49, 187-198
- 453. Nagase, H. (1997) Biol. Chem. 378, 151-160

- 454. Moestrup, S. K., Holtet, T. L., Etzerodt, M., Thogersen, H. C., Nykjaer, A., Andreasen, P. A., Rasmussen, H. H., Sottrup-Jensen, L., and Gliemann, J. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 13691-13696
- 455. Brew, K., Dinakarpandian, D., and Nagase, H. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1477, 267-283
- 456. Baker, A. H., Edwards, D. R., and Murphy, G. (2002) J. Cell Sci. 115, 3719-3727
- 457. Nagase, H., and Brew, K. (2003) Biochem. Soc. Symp., 201-212
- 458. Van den Steen, P. E., Opdenakker, G., Wormald, M. R., Dwek, R. A., and Rudd, P. M. (2001) *Biochim. Biophys. Acta* 1528, 61-73
- 459. McQuibban, G. A., Butler, G. S., Gong, J. H., Bendall, L., Power, C., Clark-Lewis, I., and Overall, C. M. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 43503-43508
- Hamano, Y., Zeisberg, M., Sugimoto, H., Lively, J. C., Maeshima, Y., Yang, C., Hynes, R.
 O., Werb, Z., Sudhakar, A., and Kalluri, R. (2003) *Cancer Cell* 3, 589-601
- 461. Schonbeck, U., Mach, F., and Libby, P. (1998) J. Immunol. 161, 3340-3346
- 462. Van den Steen, P. E., Proost, P., Wuyts, A., Van Damme, J., and Opdenakker, G. (2000) Blood 96, 2673-2681
- 463. Egeblad, M., and Werb, Z. (2002) Nat. Rev. Cancer 2, 161-174
- 464. Heissig, B., Hattori, K., Dias, S., Friedrich, M., Ferris, B., Hackett, N. R., Crystal, R. G., Besmer, P., Lyden, D., Moore, M. A., Werb, Z., and Rafii, S. (2002) *Cell* 109, 625-637
- 465. Opdenakker, G., Van den Steen, P. E., Dubois, B., Nelissen, I., Van Coillie, E., Masure, S., Proost, P., and Van Damme, J. (2001) *J. Leukoc. Biol.* 69, 851-859
- 466. Leppert, D., Waubant, E., Galardy, R., Bunnett, N. W., and Hauser, S. L. (1995) J. Immunol. 154, 4379-4389
- 467. Delclaux, C., Delacourt, C., D'Ortho, M. P., Boyer, V., Lafuma, C., and Harf, A. (1996) Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 14, 288-295
- 468. Okada, S., Kita, H., George, T. J., Gleich, G. J., and Leiferman, K. M. (1997) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 17, 519-528
- 469. Betsuyaku, T., Fukuda, Y., Parks, W. C., Shipley, J. M., and Senior, R. M. (2000) *Am. J. Pathol.* 157, 525-535
- 470. Legrand, C., Gilles, C., Zahm, J. M., Polette, M., Buisson, A. C., Kaplan, H., Birembaut, P., and Tournier, J. M. (1999) J. Cell Biol. 146, 517-529
- 471. Abecassis, I., Olofsson, B., Schmid, M., Zalcman, G., and Karniguian, A. (2003) *Exp. Cell Res.* 291, 363-376
- 472. Spessotto, P., Rossi, F. M., Degan, M., Di Francia, R., Perris, R., Colombatti, A., and Gattei, V. (2002) *J. Cell Biol.* 158, 1133-1144
- 473. Heissig, B., Nishida, C., Tashiro, Y., Sato, Y., Ishihara, M., Ohki, M., Gritli, I., Rosenkvist, J., and Hattori, K. (2010) *Histol. Histopathol.* 25, 765-770
- 474. Vu, T. H., Shipley, J. M., Bergers, G., Berger, J. E., Helms, J. A., Hanahan, D., Shapiro, S. D., Senior, R. M., and Werb, Z. (1998) *Cell* 93, 411-422
- 475. Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T. H., Itoh, T., Tamaki, K., Tanzawa, K., Thorpe, P., Itohara, S., Werb, Z., and Hanahan, D. (2000) *Nat. Cell Biol.* 2, 737-744
- 476. Lee, S., Jilani, S. M., Nikolova, G. V., Carpizo, D., and Iruela-Arispe, M. L. (2005) J. Cell Biol. 169, 681-691
- 477. Heissig, B., Rafii, S., Akiyama, H., Ohki, Y., Sato, Y., Rafael, T., Zhu, Z., Hicklin, D. J., Okumura, K., Ogawa, H., Werb, Z., and Hattori, K. (2005) *J. Exp. Med.* 202, 739-750
- 478. Johnson, C., Sung, H. J., Lessner, S. M., Fini, M. E., and Galis, Z. S. (2004) *Circ. Res.* 94, 262-268
- 479. Dubois, B., Arnold, B., and Opdenakker, G. (2000) J. Clin. Investig. 106, 627-628
- 480. Jeziorska, M., Nagase, H., Salamonsen, L. A., and Woolley, D. E. (1996) J. Reprod. Fertil. 107, 43-51
- 481. Librach, C. L., Werb, Z., Fitzgerald, M. L., Chiu, K., Corwin, N. M., Esteves, R. A., Grobelny, D., Galardy, R., Damsky, C. H., and Fisher, S. J. (1991) *J. Cell Biol.* 113, 437-449
- 482. Vadillo-Ortega, F., Gonzalez-Avila, G., Furth, E. E., Lei, H., Muschel, R. J., Stetler-Stevenson, W. G., and Strauss, J. F., 3rd. (1995) *Am. J. Pathol.* 146, 148-156
- 483. Dubois, B., Masure, S., Hurtenbach, U., Paemen, L., Heremans, H., van den Oord, J., Sciot, R., Meinhardt, T., Hammerling, G., Opdenakker, G., and Arnold, B. (1999) *J. Clin. Investig.* 104, 1507-1515
- 484. Tchetverikov, I., Lard, L. R., DeGroot, J., Verzijl, N., TeKoppele, J. M., Breedveld, F. C., Huizinga, T. W., and Hanemaaijer, R. (2003) *Ann. Rheum. Dis.* 62, 1094-1099
- 485. Yoshida, W., Uzuki, M., Nishida, J., Shimamura, T., and Sawai, T. (2009) *Clin. Exp. Rheumatol.* 27, 587-593
- 486. Gruber, B. L., Sorbi, D., French, D. L., Marchese, M. J., Nuovo, G. J., Kew, R. R., and Arbeit, L. A. (1996) *Clin. Immunol. Immunopathol.* 78, 161-171
- 487. Kim, W. U., Min, S. Y., Cho, M. L., Hong, K. H., Shin, Y. J., Park, S. H., and Cho, C. S. (2005) Arthritis Res. Ther. 7, R71-79
- 488. Aoudjit, F., Masure, S., Opdenakker, G., Potworowski, E. F., and St-Pierre, Y. (1999) Int J Cancer 82, 743-747
- 489. Chantrain, C. F., Shimada, H., Jodele, S., Groshen, S., Ye, W., Shalinsky, D. R., Werb, Z., Coussens, L. M., and DeClerck, Y. A. (2004) *Cancer Res* 64, 1675-1686
- 490. Coussens, L. M., Tinkle, C. L., Hanahan, D., and Werb, Z. (2000) Cell 103, 481-490
- 491. Gorden, D. L., Fingleton, B., Crawford, H. C., Jansen, D. E., Lepage, M., and Matrisian, L.
 M. (2007) Int J Cancer 121, 495-500
- 492. Kondraganti, S., Mohanam, S., Chintala, S. K., Kin, Y., Jasti, S. L., Nirmala, C., Lakka, S. S., Adachi, Y., Kyritsis, A. P., Ali-Osman, F., Sawaya, R., Fuller, G. N., and Rao, J. S. (2000) *Cancer Res* 60, 6851-6855
- Itoh, T., Tanioka, M., Matsuda, H., Nishimoto, H., Yoshioka, T., Suzuki, R., and Uehira, M. (1999) Clin. Exp. Metastasis 17, 177-181
- 494. Giraudo, E., Inoue, M., and Hanahan, D. (2004) J. Clin. Investig. 114, 623-633
- Kossakowska, A. E., Hinek, A., Edwards, D. R., Lim, M. S., Zhang, C. L., Breitman, D. R., Prusinkiewicz, C., Stabbler, A. L., Urbanski, L. S., and Urbanski, S. J. (1998) Am. J. Pathol. 152, 565-576
- Lalancette, M., Aoudjit, F., Potworowski, E. F., and St-Pierre, Y. (2000) Blood 95, 314-319
- 497. Biasi, F., Guina, T., Maina, M., Nano, M., Falcone, A., Aroasio, E., Saracco, G. M., Papotti, M., Leonarduzzi, G., and Poli, G. (2012) *PLoS ONE* 7, e41839
- 498. Chantrain, C. F., Shimada, H., Jodele, S., Groshen, S., Ye, W., Shalinsky, D. R., Werb, Z., Coussens, L. M., and DeClerck, Y. A. (2004) *Cancer Res.* 64, 1675-1686
- 499. Patterson, B. C., and Sang, Q. A. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 28823-28825
- 500. Dong, Z., Kumar, R., Yang, X., and Fidler, I. J. (1997) *Cell* 88, 801-810
- 501. O'Reilly, M. S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R. A., Moses, M., Lane, W. S., Cao, Y., Sage, E. H., and Folkman, J. (1994) *Cell* 79, 315-328
- 502. Lijnen, H. R., Ugwu, F., Bini, A., and Collen, D. (1998) Biochemistry 37, 4699-4702
- 503. O'Reilly, M. S., Wiederschain, D., Stetler-Stevenson, W. G., Folkman, J., and Moses, M. A. (1999) J. Biol. Chem. 274, 29568-29571
- 504. Maeshima, Y., Colorado, P. C., and Kalluri, R. (2000) J. Biol. Chem. 275, 23745-23750

- 505. Maeshima, Y., Sudhakar, A., Lively, J. C., Ueki, K., Kharbanda, S., Kahn, C. R., Sonenberg, N., Hynes, R. O., and Kalluri, R. (2002) *Science* 295, 140-143
- 506. Kim, J., Yu, W., Kovalski, K., and Ossowski, L. (1998) Cell 94, 353-362
- 507. De, S., Chen, J., Narizhneva, N. V., Heston, W., Brainard, J., Sage, E. H., and Byzova, T. V. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 39044-39050
- 508. Rolli, M., Fransvea, E., Pilch, J., Saven, A., and Felding-Habermann, B. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 9482-9487
- 509. Sultan, S., Gosling, M., Nagase, H., and Powell, J. T. (2004) FEBS Lett. 564, 161-165
- 510. Lynch, C. C., and Matrisian, L. M. (2002) Differentiation 70, 561-573
- 511. Friedl, P., and Wolf, K. (2003) Nat. Rev. Cancer 3, 362-374
- 512. Yu, Q., and Stamenkovic, I. (2000) Genes Dev. 14, 163-176
- 513. Sheu, B. C., Hsu, S. M., Ho, H. N., Lien, H. C., Huang, S. C., and Lin, R. H. (2001) *Cancer Res.* 61, 237-242
- 514. Fiore, E., Fusco, C., Romero, P., and Stamenkovic, I. (2002) Oncogene 21, 5213-5223
- 515. Dong, Z., Nemeth, J. A., Cher, M. L., Palmer, K. C., Bright, R. C., and Fridman, R. (2001) Int. J. Cancer 93, 507-515
- van 't Veer, L. J., Dai, H., van de Vijver, M. J., He, Y. D., Hart, A. A., Mao, M., Peterse, H.
 L., van der Kooy, K., Marton, M. J., Witteveen, A. T., Schreiber, G. J., Kerkhoven, R. M.,
 Roberts, C., Linsley, P. S., Bernards, R., and Friend, S. H. (2002) *Nature* 415, 530-536
- 517. Bernhard, E. J., Gruber, S. B., and Muschel, R. J. (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4293-4297
- 518. Hua, J., and Muschel, R. J. (1996) Cancer Res. 56, 5279-5284
- 519. Kondraganti, S., Mohanam, S., Chintala, S. K., Kin, Y., Jasti, S. L., Nirmala, C., Lakka, S. S., Adachi, Y., Kyritsis, A. P., Ali-Osman, F., Sawaya, R., Fuller, G. N., and Rao, J. S. (2000) *Cancer Res.* 60, 6851-6855
- 520. Mori, N., Sato, H., Hayashibara, T., Senba, M., Hayashi, T., Yamada, Y., Kamihira, S., Ikeda, S., Yamasaki, Y., Morikawa, S., Tomonaga, M., Geleziunas, R., and Yamamoto, N. (2002) *Blood* 99, 1341-1349
- 521. Kossakowska, A. E., Huchcroft, S. A., Urbanski, S. J., and Edwards, D. R. (1996) *Br. J. Cancer* 73, 1401-1408
- 522. Kossakowska, A. E., Urbanski, S. J., Huchcroft, S. A., and Edwards, D. R. (1992) Oncol. Res. 4, 233-240
- 523. 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, 1708-1715
- 524. Barille, S., Akhoundi, C., Collette, M., Mellerin, M. P., Rapp, M. J., Harousseau, J. L., Bataille, R., and Amiot, M. (1997) *Blood* 90, 1649-1655
- 525. Aoudjit, F., Masure, S., Opdenakker, G., Potworowski, E. F., and St-Pierre, Y. (1999) Int. J. Cancer 82, 743-747
- 526. Sanceau, J., Truchet, S., and Bauvois, B. (2003) J. Biol. Chem. 278, 36537-36546
- 527. Deryugina, E. I., and Quigley, J. P. (2006) Cancer Metastasis Rev. 25, 9-34
- 528. Pozzi, A., Moberg, P. E., Miles, L. A., Wagner, S., Soloway, P., and Gardner, H. A. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97, 2202-2207
- 529. Chen, X., Su, Y., Fingleton, B., Acuff, H., Matrisian, L. M., Zent, R., and Pozzi, A. (2005) Clin. Exp. Metastasis 22, 185-193
- 530. Shchors, K., Nozawa, H., Xu, J., Rostker, F., Swigart-Brown, L., Evan, G., and Hanahan, D. (2012) *Oncogene*
- 531. Roy, J. S., Van Themsche, C., Demers, M., Opdenakker, G., Arnold, B., and St-Pierre, Y. (2007) *Leukemia* 21, 2506-2511

- 532. MacDougall, J. R., Bani, M. R., Lin, Y., Rak, J., and Kerbel, R. S. (1995) *Cancer Res.* 55, 4174-4181
- 533. Hofmann, U. B., Houben, R., Brocker, E. B., and Becker, J. C. (2005) *Biochimie* 87, 307-314
- 534. Vaisanen, A. H., Kallioinen, M., and Turpeenniemi-Hujanen, T. (2008) Hum. Pathol. 39, 377-385
- 535. Chen, Y., Huang, L., and Yu, J. (2012) J. Dermatol. 39, 339-343
- 536. Marconi, C., Bianchini, F., Mannini, A., Mugnai, G., Ruggieri, S., and Calorini, L. (2008) *Clin. Exp. Metastasis* 25, 225-231
- 537. Deryugina, E. I., Zijlstra, A., Partridge, J. J., Kupriyanova, T. A., Madsen, M. A., Papagiannakopoulos, T., and Quigley, J. P. (2005) *Cancer Res.* 65, 10959-10969
- 538. Lopez-Otin, C., and Matrisian, L. M. (2007) Nat. Rev. Cancer 7, 800-808
- 539. Coussens, L. M., Fingleton, B., and Matrisian, L. M. (2002) *Science* 295, 2387-2392
- 540. Overall, C. M., and Kleifeld, O. (2006) Br. J. Cancer 94, 941-946
- 541. Thorrez, L., Van Deun, K., Tranchevent, L. C., Van Lommel, L., Engelen, K., Marchal, K., Moreau, Y., Van Mechelen, I., and Schuit, F. (2008) *PLoS ONE* 3, e1854
- 542. Opdenakker, G., Masure, S., Grillet, B., and Van Damme, J. (1991) *Lymphokine Cytokine Res.* 10, 317-324
- 543. Renckens, R., Roelofs, J. J., Florquin, S., de Vos, A. F., Lijnen, H. R., van't Veer, C., and van der Poll, T. (2006) J. Immunol. 176, 3735-3741
- 544. Murch, O., Collin, M., Sepodes, B., Foster, S. J., Mota-Filipe, H., and Thiemermann, C. (2006) *Br. J. Pharmacol.* 148, 769-777
- 545. Kuvibidila, S. R., Gardner, R., Velez, M., and Yu, L. (2010) Cytokine 52, 230-237
- 546. Zhou, H., Bernhard, E. J., Fox, F. E., and Billings, P. C. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1177, 174-178
- 547. Xie, B., Dong, Z., and Fidler, I. J. (1994) J. Immunol. 152, 3637-3644
- 548. Arechavaleta-Velasco, F., Ogando, D., Parry, S., and Vadillo-Ortega, F. (2002) *Biol. Reprod.* 67, 1952-1958
- 549. Carlsen, H., Moskaug, J. O., Fromm, S. H., and Blomhoff, R. (2002) J. Immunol. 168, 1441-1446
- 550. Ruiter, D., Bogenrieder, T., Elder, D., and Herlyn, M. (2002) Lancet Oncol. 3, 35-43
- 551. Ahn, G. O., and Brown, J. M. (2008) Cancer Cell 13, 193-205
- 552. Lin, E. Y., Li, J. F., Gnatovskiy, L., Deng, Y., Zhu, L., Grzesik, D. A., Qian, H., Xue, X. N., and Pollard, J. W. (2006) *Cancer Res.* 66, 11238-11246
- 553. Shekhar, M. P., Werdell, J., Santner, S. J., Pauley, R. J., and Tait, L. (2001) *Cancer Res.* 61, 1320-1326
- 554. Stuelten, C. H., DaCosta Byfield, S., Arany, P. R., Karpova, T. S., Stetler-Stevenson, W. G., and Roberts, A. B. (2005) *J. Cell Sci.* 118, 2143-2153
- 555. Voigt, H., Houben, R., Schrama, D., Hofmann, U. B., Vetter-Kauczok, C. S., and Becker, J. C. (2007) *Tumour Biol.* 28, 229-237
- 556. Mohan, R., Rinehart, W. B., Bargagna-Mohan, P., and Fini, M. E. (1998) J. Biol. Chem. 273, 25903-25914
- 557. Welch, D. R., Schissel, D. J., Howrey, R. P., and Aeed, P. A. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 5859-5863
- 558. Miller, A. J., and Mihm, M. C., Jr. (2006) N. Engl. J. Med. 355, 51-65
- 559. Ivanov, V. N., Bhoumik, A., and Ronai, Z. (2003) Oncogene 22, 3152-3161
- 560. Hersey, P. (2006) Curr. Opin. Oncol. 18, 189-196

- 561. Sapoznik, S., Hammer, O., Ortenberg, R., Besser, M. J., Ben-Moshe, T., Schachter, J., and Markel, G. (2012) *Clin. Dev. Immunol.* 2012, 818214
- 562. Delacour, D., Koch, A., and Jacob, R. (2009) Traffic 10, 1405-1413
- 563. Rabinovich, G. A., and Toscano, M. A. (2009) Nat. Rev. Immunol. 9, 338-352
- 564. Saussez, S., Cucu, D. R., Decaestecker, C., Chevalier, D., Kaltner, H., Andre, S., Wacreniez, A., Toubeau, G., Camby, I., Gabius, H. J., and Kiss, R. (2006) Ann. Surg. Oncol.
- 565. Nakahara, S., Oka, N., and Raz, A. (2005) Apoptosis 10, 267-275
- 566. Fidler, I. J. (1975) Cancer Res. 35, 218-224
- 567. Robbins, P. F., El-Gamil, M., Li, Y. F., Zeng, G., Dudley, M., and Rosenberg, S. A. (2002) J. Immunol. 169, 6036-6047
- 568. Aoudjit, F., Potworowski, E. F., and St-Pierre, Y. (1998) Blood 91, 623-629
- 569. Biron-Pain, K., and St-Pierre, Y. (2011) Cell. Mol. Life Sci.
- 570. Talantov, D., Mazumder, A., Yu, J. X., Briggs, T., Jiang, Y., Backus, J., Atkins, D., and Wang, Y. (2005) *Clin. Cancer Res.* 11, 7234-7242
- 571. Smith, A. P., Hoek, K., and Becker, D. (2005) Cancer Biol. Ther. 4, 1018-1029
- 572. Okamoto, I., Pirker, C., Bilban, M., Berger, W., Losert, D., Marosi, C., Haas, O. A., Wolff, K., and Pehamberger, H. (2005) *Neoplasia* 7, 303-311
- 573. Lim, J. H., Park, J. W., Min, D. S., Chang, J. S., Lee, Y. H., Park, Y. B., Choi, K. S., and Kwon, T. K. (2007) *Apoptosis* 12, 411-421
- 574. Ahmed, M. M. (2004) Curr. Cancer Drug Targets 4, 43-52
- 575. St-Pierre, Y., Campion, C. G., and Grosset, A. A. (2012) *Front. Biosci.* 17, 438-450
- 576. George, J., Srivastava, A. K., Singh, R., and Shukla, Y. (2011) Proteomics 11, 4411-4421
- 577. Ke, H., Parron, V. I., Reece, J., Zhang, J. Y., Akiyama, S. K., and French, J. E. (2010) *Cell Res.* 20, 458-469
- 578. Kraljevic Pavelic, S., Sedic, M., Bosnjak, H., Spaventi, S., and Pavelic, K. (2011) *Mol. Cancer* 10, 22
- 579. Stratton, M. R., Campbell, P. J., and Futreal, P. A. (2009) Nature 458, 719-724
- 580. Flaherty, K. T., Hodi, F. S., and Fisher, D. E. (2012) Nat. Rev. Cancer 12, 349-361
- 581. Anton, R. (1988) Prog. Clin. Biol. Res. 280, 423-439
- 582. Nifli, A. P., Kampa, M., Alexaki, V. I., Notas, G., and Castanas, E. (2005) J. Dairy Res. 72 Spec No, 44-50
- 583. Gulati, N., Laudet, B., Zohrabian, V. M., Murali, R., and Jhanwar-Uniyal, M. (2006) Anticancer Res. 26, 1177-1181
- 584. Lee, W. J., Chen, Y. R., and Tseng, T. H. (2011) Oncol. Rep. 25, 583-591
- 585. Zhang, X., Xu, Q., and Saiki, I. (2000) Clin. Exp. Metastasis 18, 415-421
- 586. Caltagirone, S., Rossi, C., Poggi, A., Ranelletti, F. O., Natali, P. G., Brunetti, M., Aiello, F.
 B., and Piantelli, M. (2000) Int. J. Cancer 87, 595-600
- 587. Piantelli, M., Maggiano, N., Ricci, R., Larocca, L. M., Capelli, A., Scambia, G., Isola, G., Natali, P. G., and Ranelletti, F. O. (1995) *J. Investig. Dermatol.* 105, 248-253
- 588. Decker, P., and Muller, S. (2002) Curr. Pharm. Biotechnol. 3, 275-283
- 589. Koh, D. W., Dawson, T. M., and Dawson, V. L. (2005) Pharmacol. Res. 52, 5-14
- 590. Martin, S. S., and Leder, P. (2001) Mol. Cell. Biol. 21, 6529-6536
- 591. Parra, E., Ortega, A., and Saenz, L. (2009) Oncol. Rep. 22, 1513-1518
- 592. de Belle, I., Huang, R. P., Fan, Y., Liu, C., Mercola, D., and Adamson, E. D. (1999) Oncogene 18, 3633-3642
- 593. Huang, R. P., Fan, Y., deBelle, I., Ni, Z., Matheny, W., and Adamson, E. D. (1998) Cell Death Differ. 5, 96-106

- 594. Xu, L. H., Owens, L. V., Sturge, G. C., Yang, X., Liu, E. T., Craven, R. J., and Cance, W. G. (1996) *Cell Growth Differ*. 7, 413-418
- 595. Fidler, I. J. (1973) Nat. New Biol. 242, 148-149
- 596. Edinger, M., Cao, Y. A., Hornig, Y. S., Jenkins, D. E., Verneris, M. R., Bachmann, M. H., Negrin, R. S., and Contag, C. H. (2002) *Eur. J. Cancer* 38, 2128-2136
- 597. Jenkins, D. E., Oei, Y., Hornig, Y. S., Yu, S. F., Dusich, J., Purchio, T., and Contag, P. R. (2003) *Clin. Exp. Metastasis* 20, 733-744
- 598. Wu, N., Opalenik, S., Liu, J., Jansen, E. D., Giro, M. G., and Davidson, J. M. (2002) *Matrix Biol.* 21, 149-161
- 599. Plourde, M. B., Morchid, A., Iranezereza, L., and Berthoux, L. (2013) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*
- 600. Spector, I., Shochet, N. R., Blasberger, D., and Kashman, Y. (1989) *Cell Motil. Cytoskelet.* 13, 127-144
- 601. Chow, L. W., and Loo, W. T. (2003) Breast Cancer Res. Treat. 80, 239-244
- Gao, K., Zhou, H., Zhang, L., Lee, J. W., Zhou, Q., Hu, S., Wolinsky, L. E., Farrell, J., Eibl, G., and Wong, D. T. (2009) *PLoS ONE* 4, e5875
- 603. Gaggioli, C., Deckert, M., Robert, G., Abbe, P., Batoz, M., Ehrengruber, M. U., Ortonne, J. P., Ballotti, R., and Tartare-Deckert, S. (2005) *Oncogene* 24, 1423-1433

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications :

BIRON-PAIN K., GROSSET A., POIRIER F., GABOURY L., ST-PIERRE Y. Expression and functions of galectin-7 in human and murine melanomas. (Accepted in *PLoS ONE: PONE-S-12-40254R*).

BIRON-PAIN K., ST-PIERRE Y. Monitoring mmp-9 gene expression in stromal cells using a novel transgenic mouse model. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(5):783-91, 2012.

BOUCHARD F., BÉLANGER SD., **BIRON-PAIN K.**, ST-PIERRE Y. EGR-1 activation by EGF inhibits MMP-9 expression and lymphoma growth. *Blood*, 116(5): 759-66, 2010.

DEMERS M., ROSE AA., GROSSET AA., **BIRON-PAIN K.**, GABOURY L., SIEGEL PM., ST-PIERRE Y. Overexpression of galectin-7, a myoepithelial cell marker, enhances spontaneous metastasis of breast cancer cells. *American Journal of Pathology*, 176(6): 3023-31, 2010.

ST-PIERRE Y., **BIRON-PAIN K.**, CAMPION C., LAVOIE G., BOUCHARD F., COUILLARD J. Potential directions for drug development against galectin-7 in cancer. *Expert Opinion in Drug Discovery*, 4(6):1-10, 2009.

DEMERS M., **BIRON-PAIN K.**, HEBERT J., 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. *Cancer Research*, 15;67(6):2824-9, 2007.

Communications :

BIRON-PAIN K., GENDRONNEAU G., POIRIER F., ST-PIERRE Y. La galectine-7 dans un modèle de mélanome murin. *Congrès Signalisation Québec*. Estrimont Suites et Spas, Orford, QC, Canada, 2010.

BIRON-PAIN K., ST-PIERRE Y. La galectine-7 dans un modèle de mélanome murin. *Congrès Armand-Frappier.* Château Bromont, Bromont, QC, Canada, 2009.

BIRON-PAIN K., ST-PIERRE Y. Genetic engineering of mouse models for imaging MMP-9-mediated bi-directional interactions between tumour cells and its microenvironment. *AACR: Cancer and inflammation*, Oahu, Hawaii, États-Unis, 2008.

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

DEMERS M., **BIRON-PAIN K.**, GROSSET AA., HINSINGER J., GABOURY L., ST-PIERRE Y. Galectin-7 in breast cancer. *Special AACR Conference on Advances in Breast Cancer research*. San Diego, Californie, États-Unis, Octobre 2007.