

Université du Québec
INRS - Institut Armand-Frappier
531 bd des Prairies, Qc, H7V 1B7, Laval

Régulation transcriptionnelle du gène *galectine-7* dans le cancer du sein

Par
Carole G. Campion

Thèse présentée pour l'obtention
du grade de *Philosophiae doctor* (Ph.D.) en Virologie et Immunologie

Années 2007-2013

Jury d'évaluation

Président du jury : Dr Isabelle Plante
Examineur externe : Dr Caroline Saucier
Examineur externe : Dr Edward Bradley
Directeur de recherche : Dr Yves St-Pierre

RÉSUMÉ GÉNÉRAL

Le cancer du sein est une maladie se caractérisant par une variabilité dans sa morphologie, dans son évolution et dans sa réponse au traitement. Une grande avancée a été faite au niveau des traitements personnalisés du cancer du sein depuis la mise en place d'une classification moléculaire des carcinomes mammaires basés sur le profil d'expression des gènes. Parmi tous les sous-types moléculaires, le cancer du sein de sous-type basal reste le plus grand défi à cause de sa nature clinique agressive, son très mauvais pronostic et le fait qu'il touche majoritairement de jeunes patientes. Ces tumeurs n'expriment pas les cibles moléculaires qui confèrent une réactivité aux thérapies plus personnalisées. L'identification de cibles moléculaires relevantes pour ces carcinomes mammaires est donc essentielle.

Galectine-7 a initialement été décrite comme un marqueur de la différenciation des kératinocytes. Des études subséquentes ont confirmé que galectine-7 était présente dans la majorité des cellules épithéliales normales et plus spécifiquement au niveau des épithéliums stratifiés de nombreux tissus. Dans plusieurs types de cancer, galectine-7 présente une expression significativement altérée. Des niveaux élevés de galectine-7 ont été détectés dans les cancers du sein de sous-type basaux. De plus, nous avons démontré dans notre laboratoire par des expériences *in vivo* chez la souris que galectine-7 favorisait la métastase des cellules cancéreuses mammaires et conférait une résistance à l'apoptose. Cependant, les mécanismes moléculaires qui régulent l'expression de *galectine-7* ne sont pas établis.

L'objectif de mon projet de thèse était de déterminer les mécanismes transcriptionnels responsables de l'expression anormalement élevée de galectine-7 dans le cancer du sein. Nous avons démontré pour la première fois que des mutants de p53 pouvaient induire l'expression de galectine-7 dans plusieurs lignées cellulaires du cancer du sein. D'après nos résultats, l'expression de mutants p53 associée à une activation constitutive du facteur NF- κ B serait responsable de l'expression élevée de galectine-7 dans certaines lignées cellulaires de carcinomes mammaires. De plus, nous avons également démontré que le facteur de transcription C/EBP β , spécifiquement l'isoforme C/EBP β -2, pouvait induire l'expression de galectine-7. Nous avons observé que C/EBP β -2 compétitionnait avec l'isoforme p50 de NF- κ B sur un même site du promoteur proximal de *galectine-7* dans des cellules de cancer du sein de sous-type luminal. Lorsque C/EBP β -2 est surexprimé, cet isoforme déplacerait le facteur NF- κ B p50 transcriptionnellement inactif présent sur le promoteur pour induire l'expression de galectine-7.

Ces résultats nous permettent d'une part de mieux comprendre pourquoi galectine-7 présente une expression altérée dans plusieurs cancers du sein. En effet, non seulement elle pourrait être régulée par les mutants p53 qui sont fréquemment observés dans le cancer du sein mais son expression pourrait aussi être induite par C/EBP β dans les tumeurs mammaires qui ne présenteraient pas d'altérations du gène *TP53*. D'autre part, ces données permettraient à plus long terme d'envisager des cibles thérapeutiques pour l'inhibition de galectine-7 dans le cancer du sein.



Étudiante



Directeur de recherche

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier,

Mon directeur de recherche le Dr Yves St-Pierre, pour m'avoir acceptée dans son laboratoire et pour le sujet de recherche très intéressant qu'il m'a confié. Ces années de doctorat m'ont permis d'approfondir mes connaissances dans le domaine du cancer. Je le remercie aussi de m'avoir guidé à travers les différentes expériences de ce projet et surtout de m'avoir appris à le mener de façon efficace, sans partir dans différentes directions. Il est certain que tous ces conseils me serviront grandement dans ma carrière future. Je le remercie aussi pour le choix de son équipe de recherche, car au cours de ces années de doctorat, j'ai pu côtoyer des personnes qui m'ont beaucoup aidée autant au niveau du travail qu'au niveau personnel.

Toutes les personnes qui ont travaillé dans le laboratoire : Julie, Geneviève, Katherine, Frédéric, Mélanie, Andrée-Anne, Marilyne, Nathalie. Je vous remercie pour votre aide, pour le temps que vous avez pris en participant à mes réflexions et interrogations à propos de mes résultats. Je vous remercie aussi pour le support moral dans les moments de creux que l'on connaît tous. Sans vous, les journées au laboratoire n'auraient pas été aussi agréables.

Diane Tremblay, pour son expertise en culture cellulaire, pour la manipulation des souris et pour ses nombreux conseils. Sa présence au laboratoire a été énormément appréciée au cours de ces années.

Jessy, pour son expertise et ses conseils en microscopie confocale.

Un grand merci à ma famille, pour son soutien constant, même si la distance nous sépare, les liens restent aussi forts. Un grand merci surtout à mes parents sans qui tout ceci n'aurait pu se réaliser. Merci de m'avoir toujours soutenue dans mes études, d'avoir toujours été présent dans les bons comme dans les mauvais moments. Si je suis arrivée au bout de ces nombreuses années d'études, c'est parce que vous m'avez donné la détermination et la confiance nécessaire pour y parvenir.

*Un grand merci à Francky, sans qui tout ceci n'aurait que peu d'importance. Ta présence à mes côtés me permet d'avancer toujours plus loin. Je te remercie de m'avoir supporté au cours de ces longues années d'études et celles qui vont suivre ...
Je remercie aussi *mes deux petits amours* qui ont vu le jour au cours de ces années de doctorat et qui ensoleillent chacune de mes journées.*

TABLE DES MATIÈRES

Résumé général	ii
Remerciements	iii
Table des matières	iv
Liste des figures	vii
Liste des tableaux	ix
Liste des annexes	ix
Liste des abréviations	x
Contribution des auteurs	xiii
Chapitre 1 : Revue de la littérature	1
1. La glande mammaire	2
1.1. Structure	2
1.2. Existence d'une hiérarchie au sein de la glande mammaire	2
1.2.1. Les niches de cellules souches mammaires (MaSC).....	4
1.2.2. Les cellules luminales mammaires.....	5
1.2.3. Les cellules myoépithéliales mammaires.....	6
2. Le cancer du sein	9
2.1. Portrait moléculaire du cancer du sein	9
2.1.1. Les récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone (ER, PR).....	9
2.1.2. Le facteur de transcription GATA-3.....	10
2.1.3. Le récepteur HER-2.....	12
2.1.4. Les facteurs de transcription p53 et BRCA1/2.....	12
2.2. Classification moléculaire des tumeurs mammaires	13
2.2.1. Carcinomes mammaires de sous-type luminal A.....	14
2.2.2. Carcinomes mammaires de sous-type luminal B.....	14
2.2.3. Carcinomes mammaires de sous-type HER-2+.....	15
2.2.4. Carcinomes mammaires de sous-type basal.....	16
2.2.5. Carcinomes mammaires de sous-type <i>claudin-low</i>	17
3. Les galectines	20
3.1. Propriétés des galectines	20
3.2. Classification	21

3.3. Ligands des galectines	22
3.4. Fonctions des galectines et leur implication dans le cancer	23
3.5. Implication clinique des galectines	26
4. Galectine-7	27
4.1. Sa découverte	27
4.2. Sa spécificité d'expression	27
4.3. Ses partenaires d'interaction	28
4.4. Ses fonctions	29
4.5. Son implication dans le cancer	31
4.5.1. Effet anti-tumoral.....	31
4.5.2. Effet pro-tumoral.....	31
4.6. Régulation transcriptionnelle de <i>galectine-7</i>	34
4.6.1. Comparaison avec d'autres galectines.....	34
4.6.2. Mécanismes moléculaires de régulation de <i>galectine-7</i>	35
5. Facteurs de transcription potentiellement impliqués dans la régulation du promoteur de <i>galectine-7</i>	39
5.1. Le facteur de transcription p53	39
5.1.1. Les membres de la famille p53 : p53, p63 et p73.....	39
5.1.2. Mécanismes moléculaires d'action de p53.....	42
5.1.3. Les mutants de p53.....	43
5.2. Le facteur de transcription NF-κB	47
5.2.1. Mécanismes moléculaires d'action de NF- κ B.....	47
5.2.2. NF- κ B dans le cancer du sein.....	50
5.2.3. L'interaction entre NF- κ B et p53 dans l'activation des gènes cibles de NF- κ B.....	51
5.3. Le facteur de transcription C/EBPβ	53
5.3.1. Ses caractéristiques.....	53
5.3.2. C/EBP β dans le cancer du sein.....	55
5.3.3. L'interaction entre NF- κ B et C/EBP β dans l'activation des gènes.....	56
Mise en contexte du projet de thèse	58

Chapitre 2	59
Résumé.....	60
Conclusions.....	76
Chapitre 3	77
Résumé.....	78
Conclusions.....	101
Discussion générale	102
1. Identification de mécanismes moléculaires régulant l'expression de galectine-7 dans le cancer du sein.....	103
2. Implication de ces résultats dans l'expression anormalement élevée de galectine-7 dans le cancer du sein.....	108
3. Implication de ces résultats dans l'expression spécifique de galectine-7 dans les cellules myoépithéliales.....	109
4. Implication de ces résultats sur la fonction de galectine-7 dans le cancer.....	111
5. Impact clinique de ces résultats dans le cancer.....	112
Conclusion générale	114
Annexes	117
Références	143

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE

Figure 1. Structure de la glande mammaire.....	3
Figure 2. Hiérarchie cellulaire dans l'épithélium mammaire et facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des lignées.....	5
Figure 3. Marqueur des cellules luminales et myoépithéliales mammaires.....	8
Figure 4. La perte d'expression du facteur de transcription GATA-3 prédispose à l'initiation et à la dissémination tumorale.....	11
Figure 5. Modèle de la hiérarchie épithéliale mammaire humaine et les caractéristiques cliniques des différents sous-types de carcinomes mammaires.....	19
Figure 6. Représentation schématique des différents membres de la famille des galectines.....	22
Figure 7. Expression tissulaire de galectine-7 dans l'épithélium normale.....	28
Figure 8. Statut de méthylation du promoteur humain de galectine-7.....	36
Figure 9. Représentation des différents sites consensus potentiels de fixation de facteurs de transcription sur le promoteur de <i>galectine-7</i> humain et murin.....	37
Figure 10. Représentation des différents domaines de la protéine p53.....	40
Figure 11. Mécanismes d'activation de p53 et de la régulation de ses gènes cibles..	41
Figure 12. Voie d'activation de NF- κ B.....	49
Figure 13. Modèle d'une interaction entre NF- κ B et p53 de type sauvage ou muté.....	53
Figure 14. Modèle d'attachement de C/EBP et NF- κ B sur leurs sites adjacents sur le promoteur de l' <i>IL-8</i>	57

CHAPITRE 2

Figure 1. Wild-type p53 induces galectin-7 expression in breast cancer cell.....	63
Figure 2. Doxorubicin induces galectin-7 expression in MCF-7 ^{p53wt}	64
Figure 3. Mutant p53 induces <i>galectin-7</i> expression in breast cancer cell lines.....	64
Figure 4. Doxorubicin induces <i>galectin-7</i> expression in MDA-MB-231 ^{p53R175H}	65
Figure 5. Correlation between galectin-7 expression and NF- κ B activity.....	65
Figure 6. Binding of NF- κ B and p53 on the endogenous <i>galectin-7</i> promoter.....	66
Figure 7. Galectin-7 expression is dependent of NF- κ B signaling pathway.....	66
Figure 8. p53 induces galectin-7 expression via NF- κ B.....	67
Figure 9. <i>Galectin-7</i> expression induced by wild-type p53 required NF- κ B.....	67
Figure 10. <i>Galectin-7</i> expression induced by p53 ^{R175H} mutant is inhibited by CAPE.....	68

Figure S1. Intracellular localization of galectin-7 in MCF-7 cells treated with doxorubicin.....	71
Figure S2. c-rel induces <i>galectin-7</i> expression.....	72
Figure S3. The effect of parthenolide and CAPE on NF- κ B activity.....	73
Figure S4. Galectin-7 and p53 protein levels in breast cancer cell lines and HaCaT cells.....	74
Figure S5.	75

CHAPITRE 3

Figure 1. C/EBP β -2 induces <i>galectin-7</i> mRNA levels in various breast cancer cell lines.....	93
Figure 2. Protein expression of galectin-7 in breast cancer cell lines.....	94
Figure 3. C/EBP β consensus binding site in <i>galectin-7</i> promoter.....	95
Figure 4. Correlation between expression of galectin-7 and C/EBP β in epithelial tissues.....	96
Figure 5. High C/EBP β expression predicts poor outcome in human breast cancer.	97
Figure S1. Overexpression of C/EBP β -2 enhanced migration of MCF-7 cells line..	98
Figure S2. Overexpression of galectin-7 enhanced migration of MCF-7 cells line...	99
Figure S3. Binding of C/EBP β and NF- κ B on <i>galectin-7</i> promoter.....	100
Figure 15. Modèle d'activation transcriptionnelle du promoteur <i>galectine-7</i> par C/EBP β -2 durant la progression tumorale.....	101

CONCLUSION GÉNÉRALE

Figure 16. Modèle de régulation du promoteur <i>galectine-7</i> par p53, NF- κ B et C/EBP β dans les cellules épithéliales mammaires normales et dans le cancer du sein.....	116
--	-----

LISTE DES TABLEAUX

REVUE DE LA LITTERATURE

Tableau 1. Exemples des fonctions de certaines galectines.....	25
---	----

LISTE DES ANNEXES

Annexe A. Potentials directions for drug development against galectine-7 in cancer.....	118
Annexe B. A distinctive role for galectin-7 in cancer.....	129

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ARNm	Acide ribonucléique messenger
ADN	Acide déoxyribonucléique
ADNc	Acide déoxyribonucléique complémentaire
5-aza-dC	5-aza-2' deoxycytidine
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma-2</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CAPE	<i>Caffeic acid phenetyl ester</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer binding protein</i>
ChIP	Immunoprécipitation de la chromatine
CLDN	Claudine
CK	Cytokératine
CRD	Domaine de reconnaissance des carbohydrates
CTRL	Contrôle
DAPI	4',6'-diamino-2-phénylindole
DBD	<i>DNA binding domain</i>
DMBA	7,12-Diméthylbenz(a)anthracène
Dox	Doxorubicine
dsODN	<i>Double stranded oligodeoxynucleotide</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EGCG	<i>Epigallocatechin-3-gallate</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>
EMT	Transition épithélio-mésenchymateuse
ER	Récepteur à l'œstrogène
ESCC	Esophageal squamous cell carcinoma
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
Gal	Galectine

GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GOF	Gain de fonction oncogénique
HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor-2</i>
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma
IARC	Agence Internationale pour la Recherche sur le Cancer
IL	Interleukine
IP	Immunoprécipitation
kDa	Kilodalton
LAP1, LAP2	<i>Liver-enriched transcriptional activator protein 1 and 2</i>
LIP	<i>Liver-enriched transcriptional inhibitory protein</i>
LGAL	Galectine
MaSC	Cellule souche mammaire
MDM2	<i>Mouse double minute 2 homolog</i>
MEC	Matrice extracellulaire
MMP	Métalloprotéinase de la matrice
MMTV	<i>Mouse mammary tumor virus</i>
mM	millimolaire
ml	millilitre
mt	mutant
ND	Non déterminé
<i>NF-κB</i>	<i>Nuclear factor kappa-B</i>
pb	paire de bases
PBA	Acide phenylboronique
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PR	Récepteur à la progestérone
PRLR	Récepteur à la prolactine
RE	Élément de réponse
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SCC	Carcinome à cellules squameuses
SCID	Severe combined immunodeficiency
SEM	<i>Standard error of the mean</i>

siRNA	<i>Small interfering ribonucleic acid</i>
Sp1	Protéine spécifique 1
TDLU	<i>Terminal Ductal Lobular Unit</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TIMPs	<i>Tissue inhibitors of metalloproteinases</i>
TMA	<i>Tissue microarrays</i>
TN	<i>Triple négatif</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
TSS	<i>transcriptional start site</i>
μ M	micromolaire
μ g	microgramme
μ l	microlitre
UVB	Ultraviolet B

CONTRIBUTION DES AUTEURS

J'ai effectué tous mes travaux de thèse sous la direction du Dr Yves St-Pierre, réalisé la majorité des expériences et rédigé avec l'aide du Dr Yves St-Pierre les manuscrits décrits dans les chapitres 2 et 3 et dans les annexes. J'ai aussi participé à l'écriture de certaines parties des annexes A et B (partage équitable entre les différents auteurs).

Dans le chapitre 2, j'ai effectué la majorité des expériences. Marilyne Labrie a effectué les expériences de siRNA p53 présentées dans la figure 2B et 4C. Geneviève Lavoie a réalisé les expériences présentées dans la figure 8C et D.

Dans le chapitre 3, j'ai effectué la majorité des expériences. Andrée-Anne Grosset (dans le laboratoire du Dr Louis Gaboury) a réalisé les micromatrices tissulaires de la glande mammaire normale et des carcinomes mammaires présentées dans la figure 6.

CHAPITRE 1
REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. La glande mammaire

1.1. Structure

La glande mammaire est un organe complexe. Elle est constamment remodelée dû à l'influence des hormones au cours de la puberté, la grossesse, la lactation et l'involution, et son développement n'est complété qu'à l'âge adulte. Soutenu par un stroma fibro-adipeux, un réseau de canaux lactifères, de lobules, d'alvéoles et d'unités lobuloalvéolaires terminales (TDLU, *terminal ductal lobular unit*) est responsable de la fonction principale de cet organe (**Figure 1A**). Le compartiment épithélial qui forme ce réseau de canaux galactophores est en évolution constante au cours des différents cycles hormonaux.

L'épithélium mammaire est enveloppé d'une membrane basale et inséré dans le stroma fibro-adipeux. Deux principaux types cellulaires composent cet épithélium : les cellules basales myoépithéliales et les cellules luminales [1, 2]. Les cellules luminales composent la couche interne des canaux et des lobules. Elles ont donc un contact limité avec la membrane basale et le tissu connectif environnant. Pendant la lactation, les cellules luminales ont pour fonction principale de sécréter le lait. Autour du compartiment luminal, les cellules basales myoépithéliales forment la couche externe des canaux et des lobules. Elles sont en permanence exposées aux signaux issus de la matrice extracellulaire (MEC) sous-jacente et du stroma mammaire [3]. Ces cellules ont la capacité de se contracter guidant la circulation du lait à travers le réseau de canaux et de lobules de la glande mammaire (**Figure 1B**). Plusieurs études suggèrent que dans ce compartiment basal, il résiderait une autre population de cellules composée de cellules souches et progénitrices qui serait à l'origine de la différenciation et du renouvellement de l'épithélium mammaire [4, 5].

C'est en tentant de déterminer l'origine des tumeurs mammaires qu'il a été découvert que l'épithélium mammaire est en fait constitué d'une hiérarchie de cellules, allant des cellules souches aux cellules épithéliales différenciées luminales et myoépithéliales.

1.2. Existence d'une hiérarchie au sein de l'épithélium mammaire

L'épithélium qui compose la glande mammaire est constitué de différents sous-types cellulaires qui, au cours du développement, vont subir différents stades de différenciation. La caractérisation de ces différents sous-types épithéliaux est une étape importante dans la compréhension de l'origine et de l'hétérogénéité des tumeurs mammaires. Les cellules souches mammaires vont donner naissance à des progéniteurs multipotents. À partir de ceux-ci, plusieurs types cellulaires peuvent se développer selon l'expression de certains facteurs et stimuli produits par la glande mammaire aux différents stades du développement de celle-ci

(Figure 2) [2, 5]. La définition et l'isolement des différents sous-types cellulaires de la glande mammaire a permis de mieux définir la structure et la fonction de la glande mammaire. En particulier, l'identification de niches de cellules souches dans le compartiment épithélial mammaire est une étape clé dans la compréhension du fonctionnement complexe de la glande mammaire, mais aussi de l'initiation de la tumorigenèse.

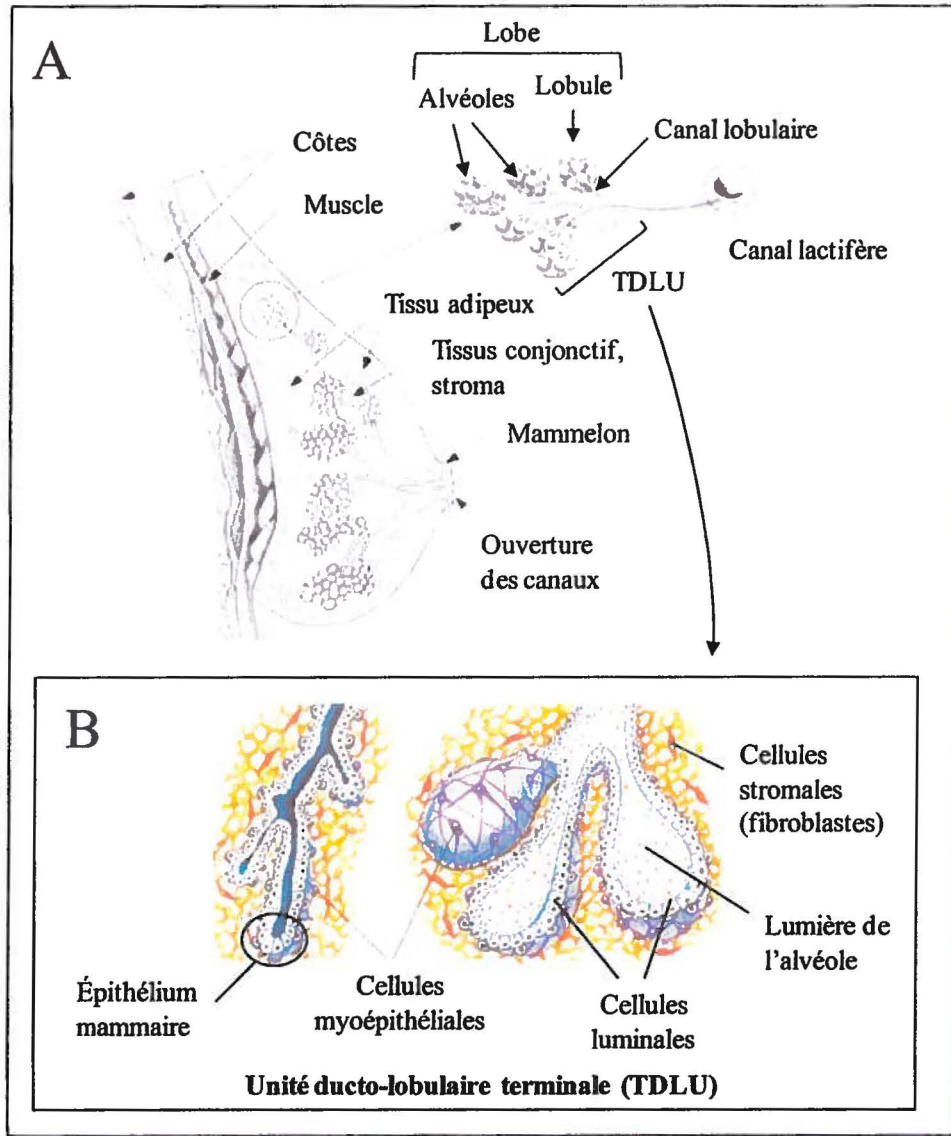


Figure 1. Structure de la glande mammaire. (A) Représentation des différents compartiments et des structures canalaire et lobulaire qui forment la glande mammaire adulte. (B) Organisation des TDLU et des principaux sous-types cellulaires qui les forment (adaptée de [6]).

1.2.1. Les niches de cellules souches mammaires (MaSC)

La glande mammaire est un organe unique qui subit des événements successifs de remodelage et de différenciation. Les changements hormonaux induisent la prolifération de l'épithélium mammaire ainsi que le développement de ramifications des canaux galactophores pendant la grossesse. Basée sur ces observations, l'existence de cellules souches épithéliales mammaires capables de s'autorenouveler, de proliférer et de donner naissance à un épithélium mature a été proposée, mais l'identité et les caractéristiques moléculaires de ces cellules restent encore indéfinies. Certains marqueurs de surface des MaSC humaines ont pu être caractérisés comme CD49f^{hi}, EpCAM^{lo} (molécule d'adhésion cellulaire épithéliale), CD24⁻ et CD133⁻ (prominine 1) [2, 7]. Basée sur ces études de marquage, il a été découvert que les MaSC existaient à la fois dans le compartiment luminal et myoépithélial [8, 9]. En isolant des fractions de MaSC grâce aux marqueurs CD24 et CD49f chez la souris, il a été observé que certaines de ces cellules exprimaient le marqueur basal CK14 (cytokératine 14) alors que d'autres exprimaient le marqueur luminal CK18 (cytokératine 18). De même, des modèles de souris transgéniques basés sur l'activité des MaSC par l'expression de la luciférase ont révélé des cellules exprimant la luciférase à la fois dans le compartiment basal et myoépithélial [10].

Plusieurs études suggèrent que les MaSC pourraient être à l'origine des tumeurs mammaires. Ces cellules ont la capacité de s'autorenouveler et de proliférer, mais la moindre erreur/mutation dans le génome de ces cellules ferait de leur propriété unique un avantage exceptionnel pour la transformation maligne. Par exemple, les MaSC humaines et murines expriment de nombreux marqueurs impliqués dans l'adhésion cellulaire. Ces molécules jouent un rôle essentiel dans la glande mammaire au niveau de la maintenance de la population de cellules souches, mais aussi dans le contrôle des lignées basales et luminales. Une dérégulation de l'expression d'une ou plusieurs de ces molécules d'adhésion au cours de la progression tumorale pourrait être un événement favorable à l'initiation et/ou la progression tumorale [2, 11].

D'une part, cette niche de cellules souches mammaires est nécessaire à la maintenance de l'homéostasie de la glande mammaire. D'autre part, elle est essentielle au développement de cet organe puisqu'elle est à l'origine de l'épithélium mature, soit de la lignée luminale et myoépithéliale.

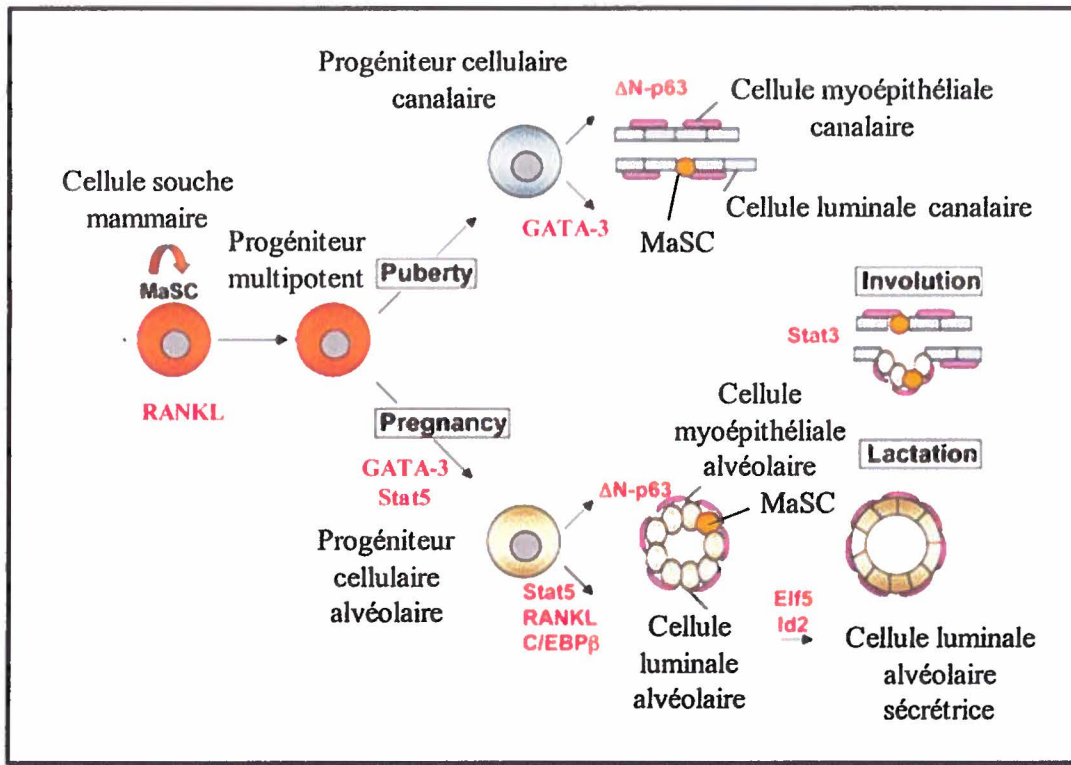


Figure 2. Hiérarchie cellulaire dans l'épithélium mammaire et facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des lignées. L'épithélium mammaire est constitué de différents sous-types cellulaires allant des cellules souches/progénéiteurs cellulaires mammaires jusqu'aux cellules différenciées myoépithéliales et luminales. Le maintien et la différenciation de ces différents sous-types cellulaires sont sous le contrôle strict d'un réseau de facteurs de transcription (adaptée de [5]).

1.2.2. Les cellules luminales mammaires

Sur les deux types de cellules épithéliales qui composent la glande mammaire, les cellules luminales ont fait l'objet de nombreuses études du fait qu'il est généralement admis que la majorité des carcinomes mammaires ont pour origine ces cellules. Organisées en couche simple, ce sont les cellules luminales qui tapissent les canaux et structures lobuloalvéolaires de la glande mammaire. On peut aussi les diviser en cellules luminales canalaire, alvéolaires et sécrétrices lors de la lactation (Figure 1B). Grâce au développement des techniques d'analyses, de plus en plus de marqueurs moléculaires qui caractérisent ces cellules ont été identifiés. Par exemple, Jones et ses collaborateurs ont analysé par micropuces à ADN l'expression des gènes sur des échantillons de cellules luminales et myoépithéliales provenant de mammoplasties [12]. Cette étude a permis d'identifier une liste de gènes préférentiellement exprimés dans les deux sous-types cellulaires (Figure 3).

Parmi ceux exprimés spécifiquement dans les cellules luminales, on retrouve le gène *CLDN4* qui code pour la claudine 4, une protéine impliquée dans les jonctions serrées, le gène codant pour la molécule d'adhésion CD24 et le gène *LGALS3* codant pour la galectine-3. Cette dernière protéine est un des membres de la grande famille des galectines qui font l'objet de nos recherches au laboratoire. La glycoprotéine mucine 1 (codée par le gène *MUC-1*) est aussi spécifiquement exprimée à la surface de ces cellules. Elle a pour fonction principale de protéger l'épithélium mammaire des infections grâce à leurs domaines extracellulaires fortement glycosylés. Les cellules épithéliales mammaires expriment aussi des marqueurs caractéristiques de l'épithélium stratifié, comme les cytokératines (CK), 7, 8, 15, 16, 18 et 19 qui sont retrouvées dans les cellules luminales [13]. D'autres marqueurs caractérisent ces cellules luminales dont plusieurs facteurs de transcription comme GATA-3, Stat5, Elf5, C/EBP β et Id2, dont l'expression est essentielle pour spécifier la différenciation de cette lignée lors des différents cycles hormonaux (**Figure 2**) [5].

Ce qui distingue les cellules luminales des autres cellules de l'épithélium mammaire est leur capacité à exprimer les récepteurs aux hormones œstrogènes (ER), à la progestérone (PR) et à la prolactine (PRLR) [14]. Suite à une stimulation hormonale ou de facteur de croissance au cours de la lactation, ces cellules sont responsables de la sécrétion de protéines de lait, comme la caséine et la lactalbumine- α . C'est pourquoi les cellules luminales bordent la lumière des canaux.

1.2.3. Les cellules myoépithéliales

Comparativement aux cellules luminales, les cellules myoépithéliales ont été beaucoup moins étudiées. Elles forment une couche cellulaire le long des canaux et des lobules mammaires entre la couche de cellules luminales et la membrane basale (**Figure 1B**). D'ailleurs, les cellules myoépithéliales sont aussi appelées cellules basales puisque ce terme réfère à la population de cellules adjacentes à la membrane basale [3, 15]. Il existe deux sous-types : les cellules myoépithéliales canalaire et alvéolaires. Les cellules myoépithéliales sont surtout connues pour leur fonction contractile, présentant les mêmes caractéristiques que les cellules musculaires lisses. Grâce à un réseau important d'actine et de myosine dans le cytoplasme de ces cellules, elles peuvent se contracter en réponse à l'ocytocine et permettre l'éjection du lait à travers les canaux lors de la lactation.

Comme pour les cellules luminales, les cellules myoépithéliales sont caractérisées par certains marqueurs (**Figure 3**) [12]. Parmi les gènes fortement exprimés dans ce type cellulaire, on retrouve le gène *galectine-7* (*LGALS7*). D'autres marqueurs sont identifiés

comme les cytokératines CK5/6, CK14 et CK17, la protéine d'attachement au calcium S100A2, la maspine codée par le gène suppresseur de tumeur *SERPINB5*, l'ostéonectine (SPARC, *secreted protein acidic and rich in cysteine*) impliquée dans plusieurs processus comme les interactions avec la MEC, l'angiogenèse, et la migration cellulaire [12, 13, 16]. Le facteur de transcription Δ Np63 a aussi été identifié comme un marqueur nucléaire des cellules myoépithéliales mammaires car il permet à la fois la différenciation et la maintenance de ces cellules (**Figure 2**) [17]. La fonction de ces différents marqueurs suggère d'ailleurs que les cellules myoépithéliales n'ont pas pour seule fonction de se contracter lors de la lactation. En fait, leur rôle a été au départ très sous-estimé.

Récemment, les chercheurs ont porté une attention particulière aux cellules myoépithéliales, car en plus de leur localisation stratégique entre les cellules luminales et la membrane basale, elles auraient plusieurs rôles clés dans la régulation et la morphogénèse de la glande mammaire [3]. Les cellules myoépithéliales fonctionneraient comme les gardiens de l'intégrité du tissu mammaire en jouant un rôle pivot dans le développement et la maintenance de la polarité du tissu mammaire [16, 18, 19]. Étant donné qu'elles expriment spécifiquement des protéines impliquées dans les jonctions cellulaires comme la Desmogléine (Dsg3), la Desmocolline (Dsc3) et la P-cadherine, les cellules myoépithéliales seraient responsables de la maintenance de l'intégrité de l'épithélium mammaire et du système complexe des interactions cellules-cellules et cellules-matrice [3]. La localisation des cellules myoépithéliales entre le compartiment luminal et le stroma suggère qu'elles sont activement impliquées dans la transmission des signaux entre le stroma et les cellules luminales.

Les cellules myoépithéliales sont aussi appelées « suppresseurs naturels de tumeur », car elles ont un effet inhibiteur sur la croissance cellulaire, l'invasion et l'angiogenèse des cellules tumorales [3]. En effet, les cellules myoépithéliales forment une barrière naturelle entre la couche de cellules luminales et le stroma, ce qui prévient l'invasion de cellules tumorales. Elles expriment de façon constitutive de hauts niveaux d'inhibiteurs de protéases incluant les inhibiteurs des métalloprotéinases de la matrice (TIMPs, *tissue inhibitors of metalloproteinases*) pour diminuer l'invasion tumorale, mais aussi des inhibiteurs de l'angiogenèse comme la protéase nexine-II et l'antitrypsine. L'habileté des cellules myoépithéliales à inhiber la progression des cellules tumorales viendrait surtout du fait qu'elles expriment des gènes suppresseurs de tumeur comme *maspine (SerpinB5)*, *TP63 (tumor protein 63)*, *TP73 (tumor protein 73)* et *WT-1 (Wilms Tumour 1)* [20, 21].

L'épithélium mammaire est donc constitué d'une hiérarchie de cellules et c'est la caractérisation de ces différents types cellulaires qui a permis par la suite de mieux comprendre l'origine et la complexité des tumeurs de la glande mammaire.

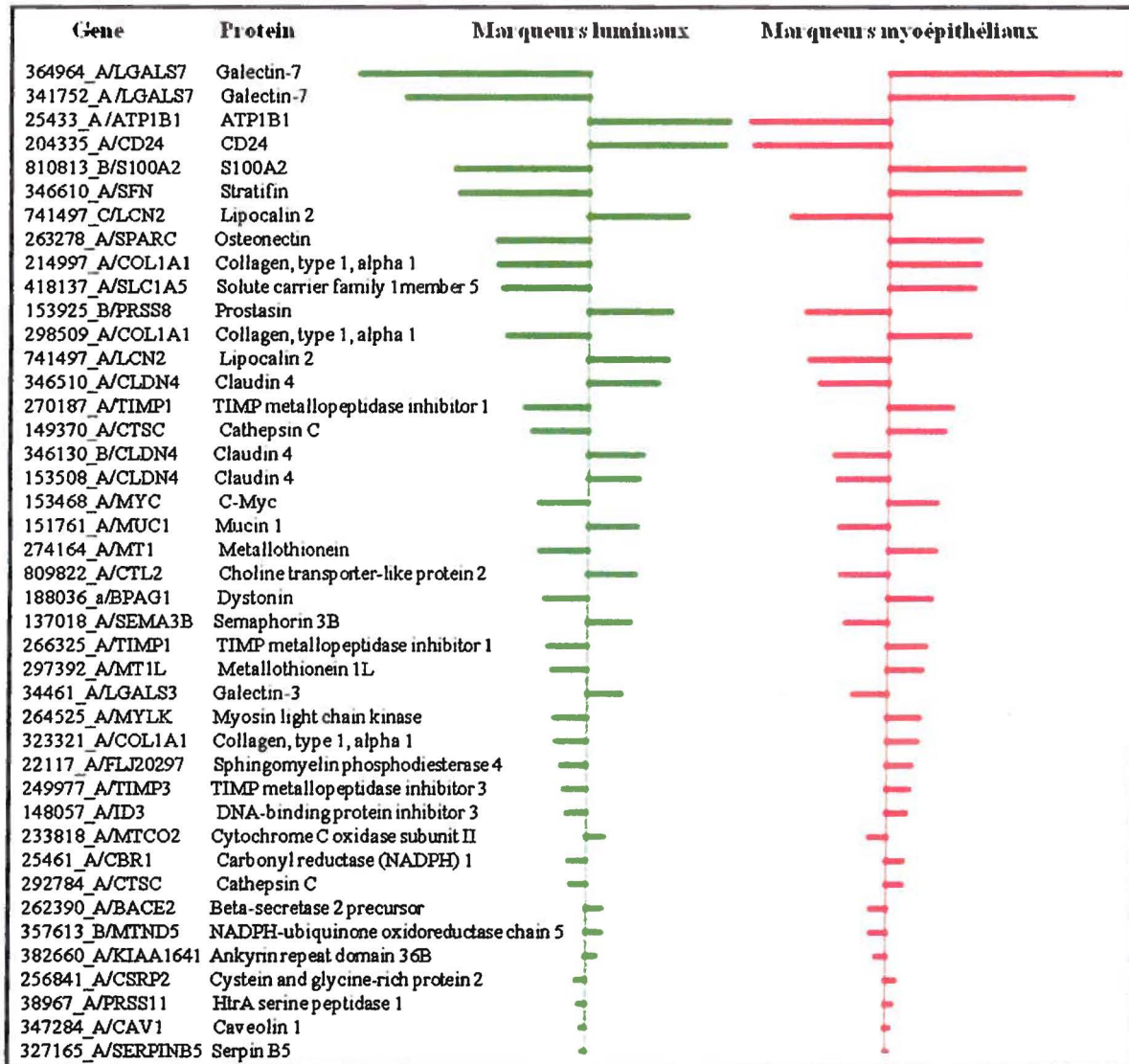


Figure 3. Marqueurs des cellules luminales et myoépithéliales mammaires. Liste des 33 gènes les plus représentés dans les lignées luminales et myoépithéliales mammaires. Leur profil d'expression est représenté par les différentes barres horizontales. Plus les barres se prolongent vers la droite, plus le gène est surexprimé. À l'inverse, plus les barres horizontales se prolongent vers la gauche, plus ce gène est régulé à la baisse (adaptée de [12]).

2. Le cancer du sein

2.1. Portrait moléculaire du cancer du sein

L'initiation et la progression tumorale mammaire sont des processus complexes mettant en jeu une succession de changements génétiques et épigénétiques dans une cellule, combinés à une expansion et à une sélection clonale. Suivant l'origine cellulaire de ces événements, les tumeurs mammaires humaines peuvent présenter des phénotypes hétérogènes compliquant le diagnostic et le traitement de celles-ci. Basés sur ce paradigme, plusieurs chercheurs ont tenté d'identifier des signatures spécifiques de gènes dont l'altération de l'expression pourrait être responsable de l'initiation de la tumorigenèse. L'identification de ces nouveaux marqueurs est nécessaire pour mieux caractériser les sous-types de carcinomes mammaires et ainsi améliorer et diversifier les traitements.

C'est à partir de l'étude de Perou et de ses collaborateurs en 2000 que le concept de signatures moléculaires des tumeurs mammaires a vu le jour [22]. Cette équipe a comparé l'expression de gènes à l'aide de micropuces à ADN à partir d'échantillons prélevés sur différents types de carcinomes mammaires de grade plus ou moins élevé. À partir des données obtenues, d'autres groupes ont confirmé ou continué à caractériser le profil moléculaire des tumeurs mammaires, notamment par l'utilisation de micropuces tissulaires [23-27]. Ces différentes études ont permis d'identifier des patrons d'expression protéique distincts dont la diversité reflète la nature hétérogène complexe des tumeurs mammaires. Parmi les différents marqueurs moléculaires identifiés, certains prédominent, car leur implication dans les carcinomes mammaires a été bien décrite et ils font partie des outils de classification des tumeurs. Seuls les principaux seront détaillés dans les sections suivantes.

2.1.1. Les récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone (ER, PR)

La découverte du rôle critique des hormones ovariennes dans la survie du cancer du sein s'est faite à la fin du 19^{ème} siècle lorsque Beaton a guéri des patientes atteintes d'un cancer du sein avancé en procédant à une ovariectomie [28]. Au niveau de l'épithélium mammaire, les hormones ovariennes vont se fixer aux ER et PR pour stimuler la prolifération cellulaire durant la puberté et la grossesse. Au cours de ces différents stades, les structures canalaire ou lobuloalvéolaires se développent massivement. C'est pourquoi en absence de ER et de PR, de sévères anomalies au niveau du développement des canaux sont détectées et la formation des alvéoles durant la grossesse est complètement absente [29, 30].

Seulement 15 à 30% des cellules épithéliales sont ER⁺ et PR⁺ dans la glande mammaire normale. Ce sont principalement les progéniteurs multipotents et les cellules

luminales. Toutes les cellules qui expriment PR contiennent généralement ER [31]. De façon surprenante, ce ne sont pas majoritairement les cellules ER⁺/PR⁺ qui se divisent suite à une stimulation hormonale. L'action répressive constante du facteur de croissance TGFβ, sécrété de manière autocrine par les cellules ER⁺/PR⁺, inhibe leur prolifération. Par contre, les cellules épithéliales ER⁺/PR⁺ stimulent la prolifération des cellules ER⁻/PR⁻ avoisinantes par la sécrétion paracrine de facteurs comme l'amphiréguline, IGF-II (*insulin-like growth factor*) et RANKL (*receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*) [32]. Il est suggéré qu'au cours de la progression tumorale, cette sécrétion paracrine serait modifiée en une sécrétion autocrine, induisant la prolifération anormale des cellules épithéliales ER⁺/PR⁺, possiblement à travers la régulation à la baisse du facteur TGFβ [33, 34].

Des études récentes ont attribué un nouveau rôle de la progestérone dans le contrôle du nombre et de la fonction des cellules souches et des progéniteurs mammaires. Joshi et ses collaborateurs en 2010 ont observé chez la souris que le nombre de cellules souches mammaires atteignait un pic durant le cycle hormonal où la progestérone atteignait les niveaux les plus forts [35]. La progestérone activait les récepteurs PR des cellules luminales ER⁺/PR⁺, stimulant ainsi la production de RANKL. Ce dernier activait RANK exprimé par les cellules souches, stimulant la prolifération et la repopulation de ces cellules. Dans le cas d'une altération génétique qui favoriserait la sécrétion continue du ligand RANKL par la progestérone, la prolifération incontrôlée des cellules souches pourrait alors mener au développement d'une tumeur mammaire hétérogène [33].

2.1.2. Le facteur de transcription GATA-3

Le facteur de transcription GATA-3 (*GATA-binding protein-3*) a non seulement été identifié comme un déterminant critique de la différenciation des cellules épithéliales luminales de la glande mammaire, mais aussi comme un facteur très impliqué dans la progression tumorale [36].

Seules les cellules luminales expriment le facteur de transcription GATA-3, contrairement aux cellules basales myoépithéliales qui sont GATA-3 négatives. Ce facteur de transcription permet la différenciation et le maintien des cellules luminales à partir des cellules progénitrices GATA-3 négatives (**Figure 2**). La délétion de GATA-3 dans l'épithélium mammaire adulte révèle de sérieuses anomalies, comme la perte de marqueurs de différenciation luminale, une diminution de l'adhésion des cellules et une augmentation de la prolifération cellulaire [37]. Ces caractéristiques étant souvent associées aux cellules tumorales, la perte d'expression de GATA-3 prédisposerait à l'initiation de la tumorigénèse

[38]. En utilisant des modèles murins MMTV-Neu, l'équipe de Zena Werb a démontré que la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) associée à la conversion maligne induisait la perte des marqueurs de différenciation comme GATA-3 dans les cellules luminales mammaires. Le passage de ces cellules GATA-3 positives vers un statut négatif, de type cellules souches, serait responsable de la dissémination des cellules tumorales et de la métastase (**Figure 4**) [38]. Le statut d'expression de GATA-3 dans les tumeurs prédirait le pronostic de celles-ci, ce qui place ce facteur de transcription comme un marqueur moléculaire clé dans le diagnostic du cancer du sein. En effet, une faible expression de GATA-3 est fortement associée à des tumeurs mammaires de haut grade (III), faiblement différenciées et présentant une invasion des nodules lymphoïdes. À l'inverse, une forte expression de GATA-3 est associée à des tumeurs de bas grade (I), bien différenciées et ayant un meilleur pronostic [39, 40].

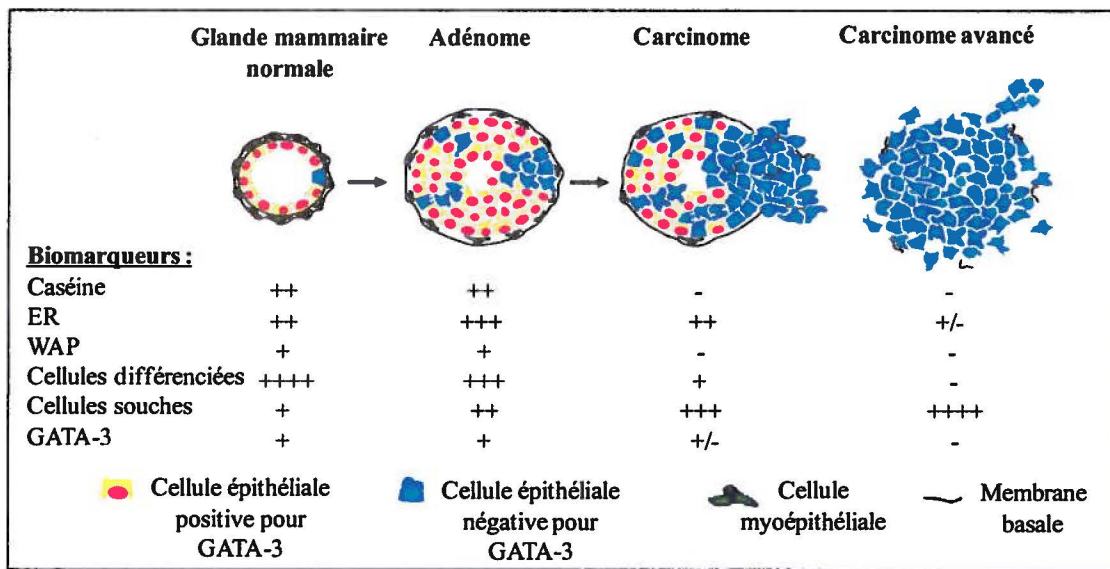


Figure 4. La perte d'expression du facteur de transcription GATA-3 prédispose à l'initiation et à la dissémination tumorale. La transition d'un stade d'adénome GATA-3-positif vers un stade de carcinome précoce GATA-3-négatif pourrait être responsable de l'initiation de la conversion maligne et de la dissémination tumorale. (ER : récepteur à l'œstrogène, WAP : *Whey acidic protein*) (adaptée de [38]).

2.1.3. Le récepteur HER-2

L'expression du gène *ErbB-2* (*Avian erythroblastosis oncogene B-2*) codant pour le récepteur HER2 (*Human epidermal growth factor receptor-2*) est aussi très impliquée dans les tumeurs mammaires. En effet, 10 à 30% des tumeurs surexpriment ce gène suite à l'amplification de son locus [41-43]. Le récepteur HER-2 fait partie de la famille HER incluant les récepteurs tyrosine kinase HER-1/EGFR (*Epidermal growth factor*), HER-3 et HER-4 qui régulent le contrôle de la croissance cellulaire. La structure des récepteurs de la famille HER consiste en une région extracellulaire fixant le ligand et un domaine cytoplasmique responsable de la fonction tyrosine kinase. Lorsqu'un ligand se fixe sur ces récepteurs HER, comme EGF, cela induit l'hétérodimérisation de ceux-ci. Il s'ensuit alors une phosphorylation des résidus tyrosine dans le domaine cytoplasmique de ces récepteurs qui induit une cascade d'activation de voies de signalisation intracellulaire [44].

Contrairement aux autres membres de cette famille, HER-2 est unique dans le fait que son activation ne dépend pas de la fixation d'un ligand. En effet, non seulement aucun ligand n'a été identifié pour le récepteur HER-2, mais il présente aussi une conformation ouverte lui permettant de se dimériser avec d'autres récepteurs HER en absence de ligand [45]. Cela a pour conséquence une activation constitutive des voies de signalisation sous-jacentes. Par conséquent, une altération génétique induisant une amplification anormale de HER-2, comme observée dans certaines tumeurs, peut induire l'activation incontrôlée de gènes associés à la prolifération cellulaire, la migration, l'invasion, l'angiogenèse et la survie cellulaire [41]. Cette caractéristique unique de HER-2 fait en sorte que les carcinomes mammaires associés à la surexpression anormale du gène *ErbB-2* sont plus agressifs (de haut grade) et ont un mauvais pronostic [45-47].

2.1.4. Les facteurs de transcription p53 et BRCA1/2

D'autres marqueurs clés sont les suppresseurs de tumeur p53 et BRCA1/2 (*Breast cancer 1 and 2*) dont le rôle est de maintenir l'intégrité génomique et de prévenir la prolifération incontrôlée des cellules. Les protéines BRCA1/2 sont impliquées dans plusieurs processus comme la réparation des dommages à l'ADN, l'ubiquitination, la régulation transcriptionnelle et le remodelage de la chromatine [48]. Le facteur de transcription p53 est un gardien majeur de l'intégrité du génome. Lors d'un stress cellulaire, comme un dommage à l'ADN, p53 est activé menant à la transcription d'un grand nombre de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose [49, 50].

Des mutations dans les gènes *BRCA1/2* et *TP53* sont les altérations les plus communément détectées dans les cancers du sein héréditaires et la perte de la fonction oncosuppressive de l'un de ces facteurs de transcription est un élément déterminant dans l'initiation de la tumorigenèse [51, 52]. Compte tenu de leurs propriétés similaires, *BRCA1* et *p53* peuvent interagir fonctionnellement pour réguler leur expression et la transcription de leurs gènes cibles [53-55]. L'altération génétique de l'un ou l'autre de ces facteurs de transcription a donc une conséquence dramatique pour l'activation des gènes pro-apoptotiques [56]. Lorsque les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN sont altérés, l'intégrité du génome est alors touchée et il en résulte des dommages importants au niveau de la chromatine, comme des réarrangements interchromosomiques [57]. La succession de ces altérations génétiques mène alors à la croissance rapide d'une tumeur mammaire, l'invasion locale et la formation précoce de métastases.

La mutation des gènes *BRCA1/2* et *p53* est associée à des carcinomes mammaires de haut grade ayant un mauvais pronostic [52, 58-60]. Des indications suggèrent que du fait des nombreuses activités oncogéniques des mutants *p53*, les mutations du gène *TP53* pourraient être utilisées comme un marqueur de prédiction ou de pronostic du cancer du sein [61]. De même, le dépistage des mutations du gène *BRCA1/2* est utilisé pour évaluer les risques de cancer du sein et de l'ovaire chez certaines patientes [51].

L'identification de ces signatures moléculaires dans les tumeurs mammaires a permis de classer de façon moléculaire les différents carcinomes mammaires [22, 62]. Ce classement permet de donner un meilleur pronostic de survie aux patients et de choisir des approches thérapeutiques plus ciblées.

2.2. Classification moléculaire des tumeurs mammaires

Les travaux de Perou et ses collaborateurs ont permis d'établir quatre sous-types majeurs de cancer du sein : luminal A, luminal B, *HER-2⁺* et basal [22, 63] (**Figure 5**). Cependant, comme les études sur l'expression des gènes évoluent, de nouvelles classifications sont susceptibles d'être identifiées. En 2007, un nouveau sous-type moléculaire a été identifié et nommé *claudin-low* [64].

2.2.1. Carcinomes mammaires de sous-type luminal A

Ce sont les carcinomes mammaires les plus fréquents dans la population, représentant 50 à 60% des cas [26, 65]. Leur nom provient du fait que ces carcinomes ont un profil génétique semblable aux cellules lumorales mammaires puisqu'ils expriment les cytokératines CK8 et CK18. Dans la grande majorité des cas, les carcinomes de ce sous-type expriment ER et/ou PR ainsi que le facteur de transcription GATA-3. Elles n'expriment généralement pas le récepteur HER-2 (**Figure 5B**). Seulement 12 à 15 % des carcinomes de sous-type luminal A présentent des mutations dans le gène suppresseur de tumeur *TP53* [22, 26, 65].

Ces carcinomes sont généralement de petites tailles, présentant un phénotype bien à moyennement différencié. Il s'agit le plus souvent de carcinomes mammaires lobulaires *in situ*, c'est-à-dire que les cellules tumorales n'envahissent pas les tissus adjacents. Ces carcinomes sont donc classés comme de bas grade, présentant un meilleur pronostic avec un taux de survie élevé et un faible risque de récurrence comparativement aux autres sous-types de carcinomes.

Étant donné que ces carcinomes mammaires expriment les récepteurs ER et/ou PR, un traitement par hormonothérapie peut être utilisé chez les patientes présentant ce sous-type de carcinomes. Des agents anti-oestrogéniques, dont le tamoxifène à l'origine développé comme agent contraceptif, sont aujourd'hui couramment utilisés chez les patientes non ménopausées comme première ligne de traitement pour ce type de cancer du sein [66, 67]. Ce traitement mène à la régression d'environ 30% des cancers du sein. Chez les patientes ménopausées, le traitement de ce sous-type est principalement basé sur l'utilisation d'inhibiteurs de l'aromatase. Cette classe de médicaments inhibe l'activité de l'aromatase, une enzyme essentielle à la conversion des hormones stéroïdiennes en œstrogènes [65, 68].

2.2.2. Carcinomes mammaires de sous-type luminal B

Ils représentent 10 à 20% des cas de carcinomes mammaires. Comme pour le sous-type luminal A, les cellules tumorales ont un profil génétique semblable aux cellules lumorales mammaires puisqu'ils expriment les cytokératines CK8 et CK18 [65]. Plusieurs différences ont été identifiées entre les deux sous-types A et B concernant l'expression des gènes, la méthylation de l'ADN et au niveau de certaines mutations somatiques [69]. Les carcinomes de sous-type luminal B n'expriment que faiblement PR comparé au luminal A. Des altérations du gène *TP53* sont aussi plus fréquemment observées dans ce sous-type. Une expression élevée de plusieurs gènes liés à prolifération cellulaire, comme *MKI67*, *CCNB1*, *MYBL2* et dans certains cas le récepteur HER-2, a été identifiée dans ce sous-type [70, 71].

Parmi les carcinomes ER⁺, le sous-type luminal B a été identifié comme étant le plus agressif et ayant un mauvais pronostic [69]. Ces carcinomes sont souvent de grade élevé, présentant une croissance rapide avec invasion des nodules lymphoïdes et un risque de récurrence élevé avec métastases au niveau des os [72].

Lorsque les carcinomes de sous-type luminal B expriment les récepteurs ER et/ou HER-2 (ER⁺/HER-2⁺ dans environ 20% des cas ; ER⁺/HER-2⁻ dans 72% des cas; ER⁻/HER-2⁺ dans 1% des cas; **Figure 5B** [62]), un traitement par hormonothérapie et/ou utilisant un anticorps qui cible HER-2 (le Traztuzumab) peut être envisagée [69]. Cependant, bien que ce sous-type de carcinomes exprime dans la majorité des cas ER, peu de gènes régulés par les œstrogènes semblent être exprimés. Ces carcinomes utiliseraient une voie alternative aux œstrogènes pour proliférer [69]. C'est pourquoi les patientes atteintes de ce type de carcinomes ne répondraient pas aussi efficacement aux traitements hormonaux et à la chimiothérapie. De plus, des cellules tumorales résiduelles hautement prolifératives seraient responsables de la récurrence du cancer. Étant donné la faible réponse des patientes à l'hormonothérapie pour ce sous-type luminal-B, de nouvelles cibles thérapeutiques sont en cours d'étude. Les voies de signalisation du facteur de croissance à l'insuline (IGF), du facteur de croissance des fibroblastes (FGF) et de la phosphoinositide-3 kinase (PI3K) en font parties [72].

2.2.3. Carcinomes mammaires de sous-type HER-2⁺

Ce sous-type représente 15 à 20 % des cas. Il s'agit de carcinomes faiblement différenciés dont les cellules tumorales surexpriment le récepteur HER-2 à leur surface à cause d'une amplification anormale du gène *ErbB-2* [73]. L'activité tyrosine kinase de ce récepteur étant constitutivement activée, les signaux de croissance, de prolifération et d'invasion sont maintenus dans ces cellules tumorales. Les gènes liés à la prolifération cellulaire sont donc fortement exprimés dans ces carcinomes [22, 26, 65]. Dans ce sous-type, les cellules tumorales n'expriment généralement pas ER et PR (**Figure 5B**). La co-expression du marqueur HER-2 et de ER survient principalement dans le sous-type luminal B [69]. Ces carcinomes présentent des mutations du gène *TP53* dans environ 75% des cas [26].

Les carcinomes mammaires HER-2⁺ correspondent le plus souvent à des tumeurs de haut grade présentant une croissance rapide avec invasion des nodules lymphoïdes et un taux de récurrence élevé avec un risque de métastase [43]. Les cancers du sein qui surexpriment la protéine HER-2 ont donc plus souvent une évolution défavorable.

Au niveau des thérapies pour ce type de carcinomes, un anticorps a été généré, le Trastuzumab (Herceptin®), ciblant spécifiquement le domaine extracellulaire du récepteur HER-2 à la surface des cellules tumorales [74]. Plus récemment, un nouvel agent, le Lapatinib, a été mis sur le marché. Il s'agit d'un inhibiteur des tyrosines kinase qui cible les voies de signalisation des récepteurs HER et EGFR [75]. La combinaison de ces deux traitements est utilisée pour le traitement des patientes ayant un cancer du sein avancé ou métastatique dont les cellules tumorales surexpriment HER-2 [45, 76].

2.2.4. Carcinomes mammaires de sous-type basal

Ces carcinomes représentent 10 à 20% des cas de cancer du sein. Ils expriment des gènes caractéristiques des cellules myoépithéliales/basales et des cellules souches mammaires (**Figure 5A**). Par exemple, les marqueurs des cellules myoépithéliales : les cytokératines CK14, CK17, le facteur p63, la P-cadhérine et la laminine sont retrouvés dans ce sous-type de carcinome. De même, les cytokératines CK5/6 identifiées dans les cellules souches et progénitrices sont aussi exprimées [22, 26, 77]. Ces carcinomes n'expriment pas ER, PR, le récepteur HER-2, GATA-3 ainsi que tous les gènes caractéristiques des cellules épithéliales luminales mammaires (**Figure 5B**) [77]. La majorité de ces carcinomes présentent aussi des mutations fréquentes du gène *TP53* (85%) et *BRCA1* [22, 26, 65]. L'analyse du profil d'expression des gènes dans ces carcinomes a permis d'identifier de nombreux gènes qui contribuent au phénotype agressif de ce sous-type. Le portrait moléculaire de ces carcinomes suggère qu'elles auraient pour origine les cellules souches ou progénitrices (**Figure 5A**) [77].

Ces carcinomes sont de grade élevé ayant un très mauvais pronostic dû à une croissance rapide. En effet, ils peuvent se développer très rapidement entre deux mammographies annuelles [78]. De plus, ce sous-type de carcinomes affecte plus fréquemment des jeunes patientes (< 50 ans) [77]. Ils présentent aussi un risque élevé de métastases au cerveau et aux poumons, des sites connus pour être associés à un très mauvais pronostic [79, 80].

Étant donné que ces carcinomes n'expriment pas les récepteurs ER, PR et HER-2, la majorité des patientes ne peuvent pas être traitées efficacement avec les thérapies hormonales ou avec le Trastuzumab/Lapatinib. Une meilleure caractérisation de ce sous-type est donc nécessaire pour identifier de nouveaux marqueurs moléculaires qui pourront être la cible de nouvelles thérapies. Parmi les cibles potentielles actuelles : *EGFR* (qui est exprimé dans plus de 60% de ces carcinomes) et *PARP-1* (*poly-ADP ribosepolymerase-1*) [77]. Les inhibiteurs de PARP-1 sont en cours d'étude pour le traitement des carcinomes mammaires de sous-type

basal présentant des mutations des gènes *BRC1* et *TP53*. En effet, l'inhibition de PARP-1, un facteur clé dans la réparation d'une cassure de l'ADN, entraîne une accumulation de ces cassures ce qui favorise l'apoptose des cellules tumorales [81].

Les carcinomes mammaires de sous-type basal sont aussi communément définis comme « triples négatifs (ER⁻/PR⁻/HER-2⁻) ». Cependant, seulement 40 à 80 % des carcinomes mammaires triples négatifs expriment des marqueurs basaux et plus de 45% des carcinomes de sous-type basal ne sont pas triples négatifs [82-86]. Ces deux carcinomes doivent donc être définis comme des sous-types de carcinomes mammaires distincts, mais qui peuvent se chevaucher. C'est le sous-type basal « vrai » qui est significativement plus chimiosensible que les autres. Il y a donc un besoin clair de marqueurs immunohistochimiques permettant d'affirmer le caractère basal des carcinomes. Récemment, l'ensemble des carcinomes de sous-type basal et le plus souvent triple négatifs ont été associé à un nouveau sous-type de carcinomes mammaires : le sous-type *Claudin-low* [62].

2.2.5. Carcinomes mammaires de sous-type *Claudin-Low*

Ces carcinomes mammaires sont caractérisés par une faible expression des protéines d'adhésion cellulaire comme EpCAM, mucine-1, E-cadhérine et les protéines claudine 3, 4 et 7, impliquées dans les jonctions serrées [64, 87, 88]. Comparé aux autres sous-types, ces carcinomes montrent une expression inconsistante des marqueurs basaux comme les kératines 5, 14 et 17, une faible expression des gènes de prolifération comme Ki67 ainsi que des marqueurs luminaux comme les kératines 18 et 19, HER-2, ER, PR et GATA-3 (**Figure 5B**) [88]. Environ 61 à 71% des carcinomes mammaires de sous-type *Claudin-low* sont triple négatifs (ER⁻, PR⁻, HER-2⁻) et inversement 25 à 39% des carcinomes triples négatifs présentent des caractéristiques du sous-type *Claudin-low* [88]. Parmi les gènes significativement régulés à la hausse dans ce sous-type, on retrouve ceux impliqués dans la réponse immunitaire (CD79b, CD14, vav1), dans la communication cellulaire (chemokine), dans la matrice extracellulaire (vimentine, FGF-7), dans la différenciation cellulaire (IL-6, kruppel-like factor 2), dans la migration cellulaire (intégrine $\alpha 5$) et dans l'angiogénèse (VEGF) [88, 89]. Ce sous-type *Claudin-low* est aussi significativement enrichi en facteurs associés aux cellules souches et mésenchymateuses comme ceux impliqués dans l'EMT et les facteurs de transcription qui répriment la E-cadhérine : SNAI1 et 2, SNAI2, TWIST1 et 2, ZEB1 et 2 [88]. C'est pourquoi ce sous-type serait le type de carcinome dérivé des cellules souches mammaires alors que les autres carcinomes de sous-type basal dériveraient de progéniteurs bipotents ou luminaux (**Figure 5A**) [87].

Les carcinomes de sous-type *Claudin-low* sont généralement de grade élevé, peu différenciés et présentant souvent une infiltration massive des cellules du système immunitaire [64, 90].

Étant donné que le sous-type *Claudin-low* présente une forte expression de marqueurs de l'EMT et de facteurs associés aux cellules souches, ces carcinomes peuvent présenter une résistance thérapeutique et un potentiel métastatique plus élevé [88]. En effet, l'expression des propriétés migratoires et invasives par les cellules tumorales épithéliales est associée à une perte des caractéristiques épithéliales (perte de la cohésion intercellulaire) et à l'acquisition de caractéristiques mésenchymateuses (mobilité, remodelage de la MEC, invasion) [91, 92]. Les cellules tumorales épithéliales qui expriment des hauts niveaux de marqueurs de l'EMT sont donc plus susceptibles à envahir de nouveaux tissus et à former des métastases [93]. Un enrichissement de cellules tumorales mammaires persistantes présentant les caractéristiques de ce sous-type a été observé après un traitement chimiothérapeutique conventionnel [94]. Le sous-type *Claudin-low* a aussi été associé à une récurrence du cancer du sein dans le cas de carcinomes mammaires invasifs de grade élevé [95]. Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour mieux caractériser ces carcinomes et ainsi mieux cibler les thérapies.

Le cancer du sein est donc une maladie hétérogène en terme d'histologie, de réponse thérapeutique, de patron de dissémination des cellules tumorales à des sites distants et du pronostic de survie du patient. L'analyse globale de l'expression des gènes à l'aide des nouvelles technologies a permis de mieux comprendre cette hétérogénéité et de mettre en place une importante classification des tumeurs mammaires selon le profil moléculaire. Prévoir l'évolution tumorale, la métastase et la réponse aux traitements thérapeutiques pour chaque patient est un enjeu majeur en cancérologie. En particulier pour le sous-type basal dont la recherche d'une cible thérapeutique reste un des plus grands défis, à cause de leur nature clinique agressive, leur très mauvais pronostic de survie et leur pathogenèse moléculaire peu caractérisée. C'est pourquoi l'identification et la caractérisation de nouveaux marqueurs moléculaires sont nécessaires pour faciliter le diagnostic du cancer du sein et mieux cibler les thérapies.

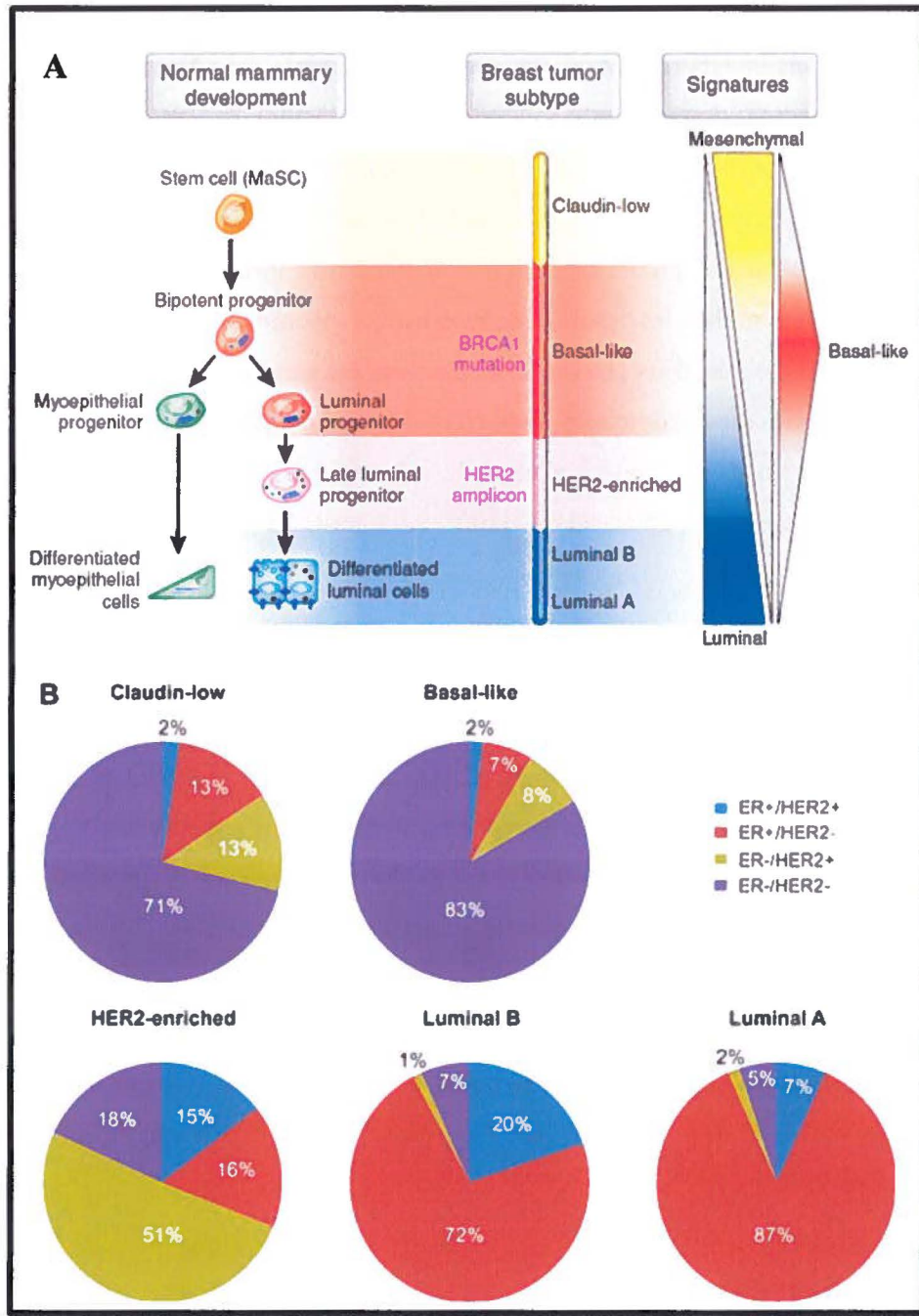


Figure 5. Modèle de la hiérarchie épithéliale mammaire humaine et les caractéristiques cliniques des différents sous-types de carcinomes mammaires. A. Représentation des différentes sous-populations cellulaires présentes au sein de l'épithélium mammaire normal et de leur origine au cours du développement. Une association entre les différents sous-types de carcinomes mammaires et ces sous-populations cellulaires de l'épithélium mammaire est aussi indiquée. Le profil moléculaire de ces différents sous-types de carcinome est représenté par un gradient d'expression. B. Distribution de l'expression de ER et HER-2 au sein de chaque sous-type de carcinomes mammaire (tirée de [62, 87]).

3. Les galectines

Un des changements phénotypiques communs observés dans la progression tumorale est une transformation dramatique de la glycosylation cellulaire [96, 97]. En fait, une altération de la glycosylation peut être considérée comme une caractéristique des cellules cancéreuses. La glycosylation est un processus cellulaire qui permet l'ajout de structures oligosaccharidiques sur des protéines et lipides menant à la formation de glycoprotéines et glycolipides [98]. Les molécules capables de reconnaître spécifiquement ces glucides sont des lectines. Chez les vertébrés, deux classes de lectines ont été identifiées. Les lectines de type C, comme les sélectines et les pentraxines, requièrent du calcium pour l'interaction. Les lectines de type-S, ou galectines, sont indépendantes du calcium, mais requièrent un thiol [99]. Le terme de galectine a été introduit en 1994 [100]. À ce jour, 15 galectines ont été identifiées chez les mammifères [101].

3.1. Propriétés des galectines

Domaine de reconnaissance des glucides

La structure du CRD des galectines (CRD, *carbohydrate recognition domain*) a été bien établie par des études de cristallographie, de diffraction aux rayons X [102] et de mutagenèse dirigée [103]. Cette structure constitue le critère majeur d'appartenance à cette famille. Le CRD de la majorité des galectines est constitué d'environ 130 acides aminés [104]. La comparaison des différentes séquences du CRD des galectines montre que quinze acides aminés sont très conservés entre les différents membres des galectines. Parmi ces quinze acides aminés, huit sont essentiels pour la reconnaissance des glucides [105]. Les acides aminés impliqués dans la liaison du CRD avec un ligand se trouvent globalement sur la même face d'un ligand.

Sécrétion atypique

Contrairement aux autres lectines, les galectines possèdent des caractéristiques propres aux protéines cytoplasmiques. En effet, leurs ARNm ne codent pas de peptide signal et ne possèdent pas de séquences évoquant un domaine transmembranaire. Pourtant, ces données sont en contradiction avec la fréquente observation d'une présence péricellulaire des galectines [106, 107]. En fait, les galectines sont absentes du Golgi par où transitent normalement les protéines sécrétées. De plus, leur passage en dehors de la cellule n'est pas altéré par des inhibiteurs classiques du transport dans le réticulum endoplasmique, comme la brefeldine A ou la nonensine [104, 108]. Par conséquent, elles seraient sécrétées en dehors de

la cellule par un processus particulier impliquant la formation de vésicules et d'évagination de la membrane [109]. L'existence de ce mode distinct de sécrétion est logique si l'on considère qu'il serait problématique de faire voisiner les galectines et leurs ligands glycoprotéiques dans le même compartiment cellulaire.

3.2. Classification

Selon le nombre et l'organisation de leurs domaines CRD, les galectines sont regroupées en trois sous-types : type simple, type double ou chimère (**Figure 6**).

Type simple

Les galectines de type simple, aussi appelées dimère homogène ou prototype, sont constituées d'un seul CRD. Elles ont une forme globulaire compacte due à deux feuillets β superposés contenant chacun cinq à six chaînes d'acides aminés antiparallèles [110]. Les galectines de type simple sont constituées d'environ 130 acides aminés ce qui représente une masse moléculaire d'environ 14 kDalton (kDa). Elles peuvent se retrouver sous forme de monomère avec un seul CRD, mais aussi sous forme de dimères avec deux CRD [111, 112]. Dans ce cas-ci, les deux sites de liaison aux deux extrémités du dimère rendent les galectines aptes à former des pontages entre les structures glucidiques. Les feuillets β de la région d'interface du dimère établissent entre eux des liaisons hydrogènes créant des feuillets β continus de 10 à 12 brins antiparallèles, et donc une structure très stable. Dans ce groupe on retrouve la majorité des galectines soit : galectine-1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 et 15 (**Figure 6**) [104, 113].

Type double ou en tandem répété

Dans ce sous-type, les galectines possèdent deux CRD séparés par une chaîne polypeptidique d'environ 70 acides aminés. La structure primaire des deux CRD diffère partiellement permettant de fixer des β -galactosides différents [114]. Ces galectines ont donc une bivalence naturelle. Les deux CRD sont formés d'environ 150 acides aminés chacun ce qui entraîne une masse moléculaire d'environ 32 à 36 kDa. Ces galectines ont une forme plus allongée ce qui leur permet de se lier à des lactosamines internes, comme des polylectosamines. Dans ce groupe on retrouve les galectines : 4, 6, 8, 9 et 12 (**Figure 6**) [104, 113].

Type chimère

Une seule galectine de ce type est décrite : galectine-3. Elle est constituée d'environ 260 acides aminés (masse moléculaire d'environ 35 kDa) et de deux domaines très différents d'où sa dénomination de « chimère » [104, 110]. Elle possède un domaine C-terminal avec un CRD et un domaine N-terminal qui contient huit séquences répétées de neuf acides aminés, avec un fort pourcentage de proline, glycine et de tyrosine. Ce domaine N-terminal est sensible aux MMP-2 et 9 (*matrice metalloproteinase-2 and 9*) [115]. Lorsque galectine-3 s'attache à un ligand, sa conformation change et peut alors s'oligomériser et former des pentamères (**Figure 6**) [104, 113].

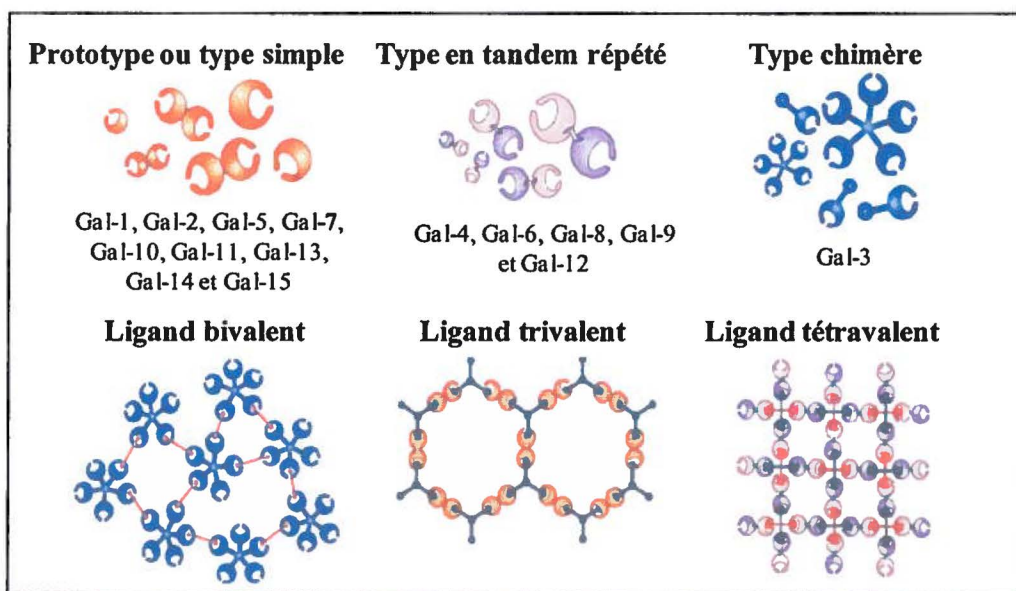


Figure 6. Représentation schématique des différents membres de la famille des galectines. A. Subdivision des galectines en 3 groupes : type simple, type en tandem répété et le type chimère. **B.** Représentation des différents types d'oligomères (ou « treillis ») que peuvent former les galectines suite à la fixation de structures glucidiques (ligand bivalent, trivalent, tétravalent) (tirée de [113]).

3.3. Ligands des galectines

Les galectines ont une affinité différente pour les glycoconjugués. La structure minimale reconnue par les galectines est le disaccharide N-acetyllactosamine (LacNAc) retrouvé sur les N-glycans ou O-glycans [104, 116, 117]. Plus ces glucides présentent des unités multiples (poly-LacNAc) sur les glycoprotéines, plus l'affinité pour les galectines augmente [118]. Des différences substantielles existent dans la préférence de liaison des glucides pour chaque membre des galectines. C'est cette légère différence qui peut expliquer la diversification fonctionnelle des galectines. Ces variations dans la reconnaissance du

glucide sont surtout associées aux différentes extensions de branches glucidiques, la multitude des résidus LacNAc et/ou de la modification des saccharides terminaux [113].

Les structures glucidiques se retrouvent sur une variété de protéines à la surface de la cellule comme les récepteurs aux cytokines, les intégrines et cadhérines [119, 120]. Les galectines peuvent fixer de multiples partenaires glycosylés formant alors des complexes multivalents, nommées treillis à la surface de la cellule (**Figure 6B**) [113, 121]. En plus des structures glucidiques à la surface cellulaire, les galectines peuvent aussi reconnaître des ligands saccharidiques présents sur les microorganismes [122]. Plusieurs études démontrent la contribution des galectines à la reconnaissance des pathogènes et à leur participation dans l'immunité innée [113]. Les galectines peuvent aussi fixer d'autres structures/protéines à l'intérieur de la cellule [123-126]. Il n'a cependant pas été encore clairement défini quel était le site de liaison impliqué dans ces interactions intracellulaires des galectines [126, 127].

3.4. Fonctions des galectines et leur implication dans le cancer

Les galectines sont impliquées dans diverses fonctions biologiques à la fois extra et intracellulaires, ainsi qu'à des processus pathologiques comme certaines maladies et cancers [104, 113, 116, 121, 122, 128, 129]. Depuis les dix dernières années, il y a eu une augmentation exponentielle du nombre de publications sur les galectines et plus de 3900 articles traitent de leur structure et fonction. Le **Tableau 1** présente des exemples de certaines fonctions des galectines en particulier pour les galectines-1 et 3 qui restent les plus étudiées.

Une même galectine peut interagir avec divers ligand dans le milieu extracellulaire et permettre des interactions multiples entre des cellules ou entre des cellules et des composants de la MEC. Dépendamment de leur concentration, de leur localisation et du type cellulaire, une même galectine peut à la fois inhiber ou favoriser l'adhésion [99, 106]. En effet, les galectines peuvent, d'un côté, présenter des propriétés adhésives lorsqu'elles agissent comme des ligands dans la reconnaissance de récepteurs à la surface cellulaire. D'un autre côté, lorsque les galectines sont solubles dans le milieu, elles peuvent bloquer l'accès aux récepteurs et présenter ainsi des propriétés antiadhésives. Les galectines peuvent reconnaître par l'intermédiaire de leur CRD les intégrines à la surface des cellules [130-133], les CD présents sur les lymphocytes T [134] et des composants de la MEC dont la laminine, la fibronectine et le collagène de type IV [131, 135-138]. Les propriétés d'adhésion des galectines impliquent aussi qu'elles peuvent favoriser ou inhiber la migration cellulaire [139-142].

Une des fonctions les plus étudiées chez les galectines est la régulation de l'apoptose. Certaines galectines semblent être pro-apoptotiques tandis que d'autres semblent être anti-apoptotiques [113, 143]. Elles peuvent même avoir les deux fonctions dépendamment de leur localisation dans la cellule ou du type cellulaire [99, 144]. Galectine-3 est un des membres de cette famille dont les fonctions apoptotiques ont été les mieux caractérisées jusqu'à présent. Dans le cytosol, Galectine-3 protègerait de l'apoptose tandis que dans le noyau, elle serait pro-apoptotique [145]. Elle peut exercer ses fonctions anti-apoptotiques en se fixant à des régulateurs clés de l'apoptose comme la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (*B-cell lymphoma-2*) [146]. Galectine-3 et Bcl-2 présentent un motif commun NWGR dans leur domaine C-terminal [147]. Ce motif est retrouvé dans le domaine BH1 de Bcl-2 et il serait essentiel à sa fonction anti-apoptotique. Pour galectine-3, ce motif est très conservé dans toutes les espèces et il serait nécessaire à l'activité de son CRD. La mutation d'un acide aminé au niveau de ce motif est suffisante pour abolir la fonction anti-apoptotique de galectine-3 [147].

Étant donné la diversité fonctionnelle des galectines, il n'est pas surprenant que ces protéines aient été impliquées dans chacune des étapes de la progression tumorale comme l'initiation, la transformation, l'invasion, l'angiogenèse et la métastase [148]. Certaines galectines peuvent induire un phénotype transformé [149-151], comme galectine-1 et 3 en interagissant avec l'oncogène Ras [123, 124]. Elles peuvent aussi intervenir sur la croissance des cellules tumorales [99, 107, 152]. Étant donné que les galectines peuvent être exprimées par les cellules du système immunitaire et inflammatoire et réguler leurs fonctions [113, 128], il est suggéré qu'elles pourraient aider les cellules tumorales à s'échapper du système immunitaire [153, 154]. Il est bien documenté que la perte d'adhésion entre les cellules corrèle avec l'invasion tumorale et la métastase. La sécrétion de galectines par les cellules tumorales et l'attachement de ces lectines sur des glycoprotéines à la surface de ces cellules pourraient donc faciliter leur détachement de la MEC. À l'inverse, la sécrétion de galectines pourrait aussi permettre la formation de pont entre les cellules tumorales et les cellules endothéliales facilitant alors l'invasion dans la circulation et la métastase [148, 155, 156].

Ces données démontrent que les galectines sont une importante classe de molécules pour de multiples processus pathologiques et donc une cible potentielle pour des thérapies anticancéreuses [107, 127, 157, 158].

NOM	FONCTIONS
Gal-1	<ul style="list-style-type: none"> • Contribue à l'épissage de l'ARNm [158-160]. • Inhibe l'adhésion des lymphocytes T à la MEC [133]. • Induit la migration des cellules dendritiques [137]. • Inhibe la migration transendothéliale des lymphocytes T et des éosinophiles [138]. • Influence la prolifération des cellules souches neuronales [161, 162]. • Inhibe la sécrétion de cytokines [133]. • Contribue à l'activation des macrophages [163] et des lymphocytes B [164]. • Permet l'adhésion de cellules tumorales à la MEC [134, 135]. • Inhibe l'activation des lymphocytes T, induit leur arrêt de croissance et l'apoptose [142, 165, 166]. • Participe à l'initiation de la transformation cellulaire [123].
Gal-2	<ul style="list-style-type: none"> • Induit la sécrétion de lymphotoxine-α par les macrophages [167]. • Induit l'apoptose des lymphocytes T [168].
Gal-3	<ul style="list-style-type: none"> • Accélère la réépithélialisation des blessures [169, 170]. • Contribue à l'épissage de l'ARNm [158, 171]. • Favorise l'adhésion et l'agrégation cellulaire [119]. • Contribue au recrutement de monocytes, neutrophiles et éosinophiles au site inflammatoire [140]. • Induit la prolifération des lymphocytes T activés [172]. • Induit l'activation de cellules inflammatoires [173]. • Induit sécrétion de cytokines et de chemokine [174, 175]. • Favorise la phagocytose par les macrophages [176]. • Induit l'apoptose (Gal-3 extracellulaire; [147, 177, 178]) ou inhibe l'apoptose (Gal-3 intracellulaire; [141, 179]) de lymphocytes T. • Participe à l'initiation de la transformation cellulaire [124, 147-149]. • Favorise [136] ou inhibe [129] l'adhésion de carcinomes mammaires humains à la MEC. • Induit la migration des cellules endothéliales et participe à la néo-angiogénèse tumorale [180, 181]. • Favorise la prolifération de cellules tumorales [135, 144, 148, 149].
Gal-4	<ul style="list-style-type: none"> • Stimule sécrétion d'IL-6 par les lymphocytes T CD4 [182].
Gal-7	<ul style="list-style-type: none"> • Accélère la réépithélialisation des blessures [169, 170] en induisant la migration des kératinocytes [183]. • Induit l'apoptose des kératinocytes [184] et de lignées cellulaires tumorales [185]. • Protège de l'apoptose dans le cas de lignées de carcinomes mammaires [186] et de lymphome [187]. • Favorise le rejet aigu des allogreffes [188, 189] en en modulant la réponse immunitaire [189-191]. • Inhibe la croissance cellulaire de lignées cellulaires du cancer du colon [192] et de neuroblastome [193]. • Inhibe la néo-angiogénèse [192]. • Favorise la progression tumorale [186, 187, 194-200]. • Favorise les métastases du lymphome [200] et du cancer du sein [186].
Gal-8	<ul style="list-style-type: none"> • Induit l'adhésion des neutrophiles à la MEC [131]. • Diminue la migration de cellules tumorales [201, 202]. • Diminue l'endocytose du récepteur à l'insuline [203].
Gal-9	<ul style="list-style-type: none"> • Induit la maturation des cellules dendritiques [204]. • Induit l'apoptose des lymphocytes Th1 [205, 206]. • Intervient dans le transport du glucose [207].
Gal-10	<ul style="list-style-type: none"> • Intervient dans la fonction des lymphocytes T régulateurs [208].
Gal-12	<ul style="list-style-type: none"> • Induit l'apoptose des adipocytes [209]. • Intervient dans la différenciation des adipocytes [210]. • Intervient dans le cycle cellulaire [211].

Tableau 1. Exemples des fonctions de certaines galectines.

3.5. Implication clinique des galectines.

Les galectines pourraient être exploitées comme des agents thérapeutiques pour le traitement de certaines maladies et cancers [107, 212]. La majorité des études traitant de l'inhibition des galectines se sont concentrées sur les mécanismes de répression de la liaison de celles-ci avec leur ligand au niveau du CRD [213, 214]. Plusieurs équipes ont développé des dérivés de ces glucides afin d'inhiber l'activité des galectines [215-217]. D'autres ont fait appel à l'utilisation de ligands naturels des galectines. Par exemple, le polysaccharide GCS-100 permet d'inhiber la protéine galectine-3, induisant l'apoptose de cellules cancéreuses dans le cas d'un myélome multiple [218, 219]. Cependant, plus d'investigations et d'essais cliniques sont nécessaires pour déterminer si ces dérivés peuvent être utilisés efficacement comme inhibiteurs des galectines dans le traitement des maladies et cancers. Des agents chimiothérapeutiques ou anti-métastatiques conventionnels peuvent aussi moduler certaines galectines comme galectine-1 [220, 221].

En plus d'être une cible thérapeutique, les galectines pourraient aussi servir de biomarqueurs de cancers spécifiques [146, 212, 222, 223]. Par exemple, galectine-3 pourrait être utilisée comme marqueur de la progression maligne du cancer de la prostate puisque son expression diminue dans les carcinomes primaires et métastatiques comparée aux cellules normales [212, 224, 225]. Dans le lymphome, galectine-3 est aussi fortement exprimée dans les sous-types agressifs comme les lymphomes diffus à grandes cellules B (DLBCL), comparé aux lymphocytes normaux [226].

Les galectines pourraient aussi être utilisées indirectement pour contrôler l'efficacité de certains traitements. Par exemple, étant donné que galectine-3 peut être clivée par MMP-2 et 9 [115], elle pourrait être utilisée comme marqueur pour contrôler l'activité de ces MMP lors d'un traitement avec des inhibiteurs spécifiques de ces protéinases [212].

La difficulté d'utiliser des inhibiteurs des galectines est que cette famille de protéines compte plusieurs membres qui peuvent avoir des fonctions redondantes. Parmi les membres de cette famille, galectine-7 semble avoir un patron d'expression unique dans les tissus normaux et le cancer, non retrouvé chez les autres galectines [227].

4. Galectine-7

4.1. Sa découverte

C'est Peter Madsen et ses collaborateurs, en 1995, qui ont identifié pour la première fois galectine-7 [228]. Son équipe cherchait une protéine dont les niveaux d'expression étaient différemment régulés entre les kératinocytes et les cellules cancéreuses de la peau, et qui jouait un rôle dans la maintenance du phénotype normal. En comparant les niveaux protéiques de kératinocytes normaux et transformés par SV40 (K14) sur un gel d'électrophorèse en deux dimensions, Madsen a identifié une protéine correspondant à IEF17 qui était fortement régulée à la baisse dans les cellules K14. Le clonage de IEF17 a permis de déterminer que la protéine contenait 136 acides aminés et avait une masse moléculaire de 15 kDa. Des analyses de séquence ont ensuite révélé des similarités avec la famille des galectines, notamment au niveau de la séquence conservée du CRD. La protéine IEF 17 a donc été nommée galectine-7.

4.2. Sa spécificité d'expression

Une analyse de l'expression protéique sur une série de tissus humains a révélé que galectine-7 est uniquement exprimée dans les épithéliums stratifiés [228, 229]. Au niveau de l'épiderme, galectine-7 est abondamment exprimée dans la couche basale, dans la couche supra-basale et très concentrée dans les sites de contact cellules-cellules. Son expression semble rester constante à travers la couche basale proliférative et supra-basale différenciée [230]. Cette distribution distingue galectine-7 des marqueurs épithéliaux K5 et K14 (kératine 5 et 4) dont l'expression est spécifique aux couches basales ou supra-basales [231]. L'expression de galectine-7 est unique dans l'épiderme et aucun autre marqueur ne présente cette distribution dans toutes les couches. Parmi la famille des galectines, c'est aussi la seule qui possède une expression aussi spécifique. Son expression coïncide avec le premier signe visible de stratification de l'épiderme lors du développement épithélial [232]. C'est pourquoi galectine-7 est considérée comme un marqueur des épithéliums stratifiés, indépendamment de l'épithélium d'origine, du niveau de kératinisation et du degré de différenciation de celui-ci [195, 229, 230, 232]. On retrouve une expression uniforme de galectine-7 dans les épithéliums de l'épiderme, de l'utérus, de la gaine externe de la racine des follicules pileux, de l'œsophage, de la trachée, de la langue, de la cornée et des corpuscules de Hassal du thymus (**Figure 7**) [230, 233].

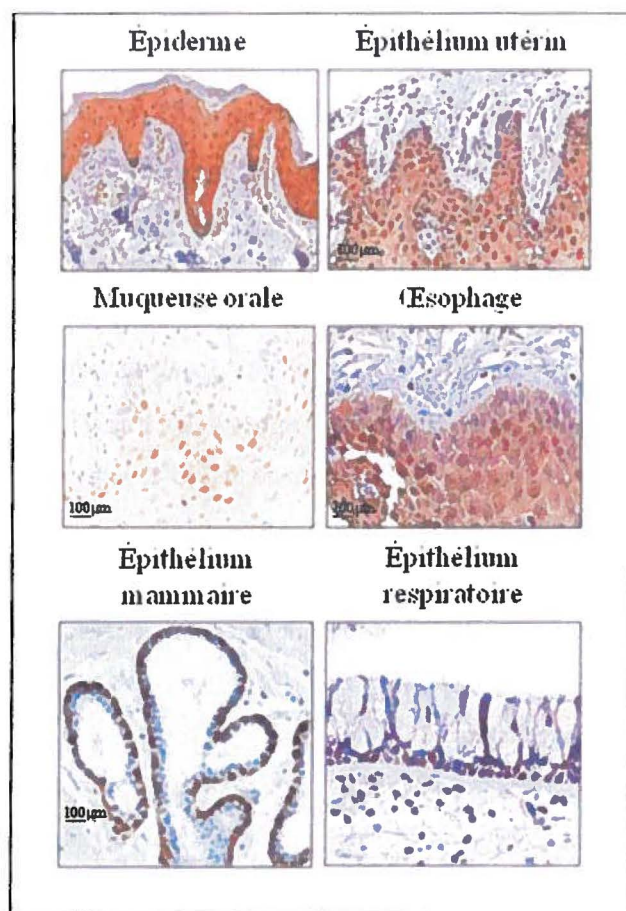


Figure 7. Expression tissulaire de galectine-7 dans l'épithélium normal. Marquage immunohistochimique de galectine-7 (brun) dans les épithéliums de certains tissus (Images tirées de la base de données Protein Atlas <http://www.proteinatlas.org>; ainsi que de données du laboratoire [186]).

4.3. Ses partenaires d'interaction

Au niveau extracellulaire, galectine-7 peut s'attacher aux ligands comme le lactose ou les structures LacNac (*N-Acetyl-D-Lactosamine*). Contrairement aux galectine-1 et 3, sa liaison avec des oligosaccharides contenant du LacNac est plus faible puisque son affinité pour ce ligand est six à onze fois plus faible. Rondanino et ses collaborateurs ont démontré que galectine-7 pouvait se lier aux intégrines $\beta 1$ à la surface des cellules MDCK (*Madin-Darby canine Kidney*) [234]. Cette liaison peut être complètement inhibée en présence de lactose, suggérant qu'elle serait dépendante du CRD. Les auteurs suggèrent que galectine-7 serait ciblée spécifiquement au niveau des cils à la surface des cellules rénales et jouerait un rôle clé dans la stabilisation des glycoconjugués responsables de l'intégrité de la fonction des cils et de la réparation de blessures de l'épithélium [234].

Galectine-7 peut aussi interagir avec des protéines intracellulaires. Inagaki et ses collaborateurs ont observé que la galectine-7 pouvait s'associer avec Smad3 phosphorylé suite

à une stimulation avec de l'HGF (*hepatocyte growth factor*) [191]. Ils ont découvert qu'en réponse à l'HGF, la translocation du noyau au cytoplasme de Smad-3 phosphorylé était accélérée par galectine-7. Une analyse par spectrométrie de masse a identifié galectine-7 comme une des protéines immunoprécipitées par un anticorps anti-phospho-Smad2/3 suite à un traitement des fibroblastes de reins COS-7 avec l'HGF. Récemment, une interaction physique entre galectine-7 et la protéine anti-apoptotique Bcl-2 a été observée [125]. À partir de mitochondries purifiées de la lignée cellulaire de carcinomes du colon HCT-116, galectine-7 a été immunoprécipitée avec Bcl-2. Cette liaison semble être indépendante du CRD, car l'ajout de lactose n'interfère pas dans la liaison de ces deux protéines. Les auteurs de cette étude suggèrent que galectine-7 pourrait inhiber Bcl-2 en interagissant avec elle à la mitochondrie et que cette interaction serait abolie suite à un stress génotoxique, menant à l'activation de l'apoptose. Le site de liaison impliqué dans cette interaction reste inconnu.

4.4. Ses fonctions

Des études ont révélé que galectine-7 était retrouvée à la fois au niveau intracellulaire, dans cytoplasme et le noyau, mais aussi sécrétée dans le milieu extracellulaire [195], ce qui suggère qu'elle est impliquée dans de multiples processus biologiques (**Tableau 1**).

En utilisant comme modèle la cornée, Cao et ses collaborateurs ont démontré un rôle de galectine-7 dans la réépithélialisation des blessures [169, 170]. La régulation à la hausse de l'expression de *galectine-7* dans l'épithélium de la cornée blessée permettait d'accélérer la réépithélialisation. Des souris génétiquement déficientes en galectine-7 (*Gal-7^{-/-}*) ont permis de révéler que cette protéine contrôlait la prolifération des kératinocytes [183]. Galectine-7 s'accumulait dans le front de migration des kératinocytes au niveau des lamellipodes, une extension de la membrane plasmique, où elle jouait un rôle dans la migration des kératinocytes.

La majorité des études ont d'abord identifié galectine-7 comme étant pro-apoptotique. La première étude à ce sujet a été faite dans des cellules du cancer du colon DLD-1 surexprimant le gène codant pour le facteur de transcription pro-apoptotique p53 [235]. Sur 7002 gènes analysés, *galectine-7* était un des quatorze gènes dont l'expression était induite précocement suite à l'apoptose induite par le facteur de transcription p53. C'est pourquoi elle a été identifiée comme une protéine induite par p53 et nommée dans cette étude PIG1 (*p53-induced gene-1*). Une autre étude a démontré que les niveaux de galectine-7 étaient fortement augmentés dans des kératinocytes en apoptose suite à une irradiation aux ultraviolets d'un échantillon de peau humaine [184]. Dans cette étude, en parallèle à l'augmentation de

galectine-7, les auteurs ont observé une stabilisation de la protéine p53. De plus, galectine-7 n'était pas induite suite à l'irradiation de lignées cellulaires génétiquement déficientes en p53 ou exprimant des formes mutées de p53 [184]. Ces données suggèrent que la surexpression de galectine-7 observée dans les kératinocytes humains en apoptose serait dépendante de la présence de p53 et que ce facteur de transcription pourrait contrôler la transcription de galectine-7. Kuwabara et ses collaborateurs ont aussi montré que l'expression ectopique de galectine-7 dans des lignées cellulaires HeLa et DLD-1 rendaient ces cellules plus sensibles à l'apoptose sous différentes conditions dont l'irradiation aux UVB, des traitements à l'actinomycine D, à l'étoposide, au camptothécine ou à une combinaison de TNF α et de cycloheximide [185]. Comme galectine-7 était retrouvée dans le noyau et le cytoplasme de ces transfectants, les auteurs ont suggéré que l'effet pro-apoptotique de galectine-7 n'était pas dépendante de sa fixation sur des glycoconjugués à la surface des cellules [185]. En fait, ils ont proposé que galectine-7 assumait ses fonctions pro-apoptotiques à l'intérieur de la cellule en interagissant avec des protéines pro-apoptotiques.

Des travaux récents ont cependant démontré que galectine-7 pouvait aussi présenter des fonctions anti-apoptotiques. Dans notre laboratoire, Demers et ses collaborateurs ont observé qu'une lignée cellulaire de carcinomes mammaires de souris traitée avec un agent pro-apoptotique EGCG (*Epigallocatechin-3-gallate*) présentait une résistance à l'apoptose lorsque galectine-7 était surexprimée comparativement aux cellules témoins [186]. Dans un modèle de lymphomes murins, il a été suggéré que l'association de galectine-7 à la progression tumorale était en partie due à des fonctions anti-apoptotiques de cette protéine [187]. Gendronneau et ses collaborateurs avaient aussi révélé que les souris génétiquement déficientes en galectine-7 présentaient une réponse à l'apoptose plus aiguë et prolongée lorsque l'épiderme de ces souris était irradié aux UVB [183]. Il est donc possible que les fonctions pro- et anti-apoptotique de galectine-7 dépendent non seulement du type cellulaire, mais aussi du type de stimulation.

Comme les autres galectines, galectine-7 aurait aussi une implication dans la réponse immunitaire. Plusieurs études l'ont démontré particulièrement dans des modèles de rejet de greffes où Galectine-7 jouerait un rôle dans l'accélération du rejet en modulant la réponse immunitaire [188-190].

4.5. Son implication dans le cancer

Plusieurs études ont révélé que galectine-7 pouvait être à la fois pro-tumorale et anti-tumorale dans différents types de cancers.

4.5.1. Effet anti-tumoral

Comme mentionnée plus haut, la fonction pro-apoptotique de galectine-7 favoriserait l'élimination des cellules tumorales. Indépendamment de sa fonction pro-apoptotique, galectine-7 peut aussi inhiber la croissance tumorale. Une croissance tumorale plus lente est observée lorsque galectine-7 est surexprimée dans des lignées cellulaires du cancer du côlon DLD-1 transplantées dans des souris immunodéficientes [192]. Une faible activité caspase-3 dans ces tumeurs révèle que cette inhibition de la prolifération n'est pas liée à une augmentation de l'apoptose. L'expression ectopique de galectine-7 dans les DLD-1 inhibe aussi la néo-angiogenèse *in vivo* [192]. Kopitz a aussi observé que galectine-7 réduisait la croissance cellulaire de neuroblastomes, indépendamment de sa fonction pro-apoptotique [193]. En fait, la chaîne glucidique du ganglioside GM1 à la surface des cellules de neuroblastomes est un ligand de galectine-7. L'expression de GM1 est un facteur clé pour le passage de l'état prolifératif vers l'état de différenciation de ces cellules. En fixant ce ganglioside, galectine-7 inhibait la croissance de ces cellules.

Bien que certaines études associent galectine-7 à un facteur anti-tumoral, une grande majorité d'études l'identifie aussi comme un facteur pro-tumoral.

4.5.2. Effet pro-tumoral

Dans le cancer de la thyroïde

Une étude de l'expression de galectine-7 dans une série de lésions de la thyroïde a révélé qu'elle était régulée à la baisse dans des adénomes microfolliculaires comparativement aux carcinomes papillaires de la thyroïde où galectine-7 était régulée à la hausse [194]. Cette étude a suggéré un double rôle de galectine-7 dans les différents stades du développement de ce cancer. En fait, les auteurs ont révélé qu'étant donné le rôle pro-apoptotique de galectine-7, la régulation à la baisse de cette lectine dans les adénomes permettait aux cellules tumorales de s'échapper de l'apoptose à ce stade. Puis, au cours de la progression du stade d'adénomes vers le stade de carcinomes, la surexpression de galectine-7 avait un rôle pro-tumoral et était liée à la progression vers un phénotype malin. En fait, les variations dans l'expression de galectine-7 suggèrent qu'elle pourrait être un bon marqueur dans le diagnostic des différentes lésions de la thyroïde.

Carcinomes à cellules squameuses (SCC)

Galectine-7 est surexprimée dans les SCC de la cavité buccale comparativement à l'épithélium buccal normal [236]. Des niveaux élevés de galectine-7 sont associés à un taux de récurrence précoce et à un mauvais pronostic chez les patients atteints de SCC hypopharyngé de stade IV [195]. Une expression qui n'est pas observée avec galectine-3 et galectine-1. Dans des tissus de patients atteints de carcinomes à cellules squameuses de la tête et du cou (HNSCC), un marquage immunohistochimique de galectine-7 a révélé une forte expression de cette protéine [196]. Cette même équipe a démontré que l'initiation de la tumorigenèse dans ce type de cancer était associée à une localisation nucléaire de galectine-7. Dans les stades plus avancés de carcinomes, galectine-7 était à l'inverse cytoplasmique. Cette localisation était complètement inversée dans le cas de galectine-1 qui se retrouvait fortement augmentée dans les noyaux des carcinomes. Zhu et ses collaborateurs ont aussi identifié galectine-7 comme un marqueur potentiel des SCC de l'œsophage (ESCC) [197]. L'expression de galectine-7 était fortement augmentée dans les tissus des ESCC comparé aux tissus sains.

Dans le lymphome

En comparant les transcriptomes d'une lignée cellulaire de lymphomes non-agressifs/non-métastatiques (164T2) et celui d'un variant hautement agressif/métastatique (164T2S11) obtenu par de multiples passages *in vivo*, Moisan et ses collaborateurs ont identifié plusieurs gènes dont l'expression était modulée [199]. Parmi ces gènes, ils ont remarqué que le gène codant pour *galectine-7* était fortement régulé à la hausse dans les variants hautement métastatiques. Des niveaux protéiques élevés de galectine-7 ont aussi été confirmés dans d'autres variants hautement métastatiques. Des études *in vivo* ont par la suite révélé que la surexpression de galectine-7 dans les lymphomes non-agressifs était suffisante pour leur conférer un phénotype agressif avec la capacité de se disséminer dans les ganglions périphériques, la rate, le foie et le rein [187]. Cette surexpression de galectine-7 dans les lymphomes pouvait aussi à elle seule induire la présence de lymphomes périphériques dans des souris déficientes en ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*), normalement résistantes à la formation de métastases. Cette capacité accrue à former des métastases corrélait avec l'expression de MMP-9, une protéase extracellulaire associée à l'invasion tissulaire et à un mauvais pronostic dans le lymphome non Hodgkinien [237, 238]. À l'inverse, l'inhibition complète de galectine-7 par des antisens dans les variants agressifs de lymphomes comme 164T2S11 retardait significativement la dissémination et la croissance des

tumeurs lymphoïdes et augmentait la survie des souris comparativement aux témoins [200]. De même, l'inhibition de galectine-7 dans les cellules de lymphomes agressifs corrélait avec une diminution de l'expression du gène *MMP-9* et de l'infiltration des cellules tumorales aux organes périphériques [200]. Ces résultats chez la souris corroborent avec les niveaux d'expression élevés de *galectine-7* dans les différents types de cancers hématologiques d'origine humaine comparativement aux cellules B normales qui n'expriment pas de niveaux détectables de *galectine-7*.

Cancer de l'ovaire

Une étude récente indique que la *galectine-7* pourrait aussi avoir un rôle pro-tumoral dans le cancer de l'ovaire. Les auteurs de cette étude ont observé une régulation à la hausse de l'expression de *galectine-7* dans plusieurs échantillons de carcinomes ovariens [239]. Ils ont également déterminé que des niveaux élevés de *galectine-7* étaient associés à des tumeurs plus volumineuses, à un taux de mortalité élevé, et à un mauvais pronostic de survie. Une inhibition de *galectine-7* par des siRNA dans une lignée cellulaire de cancer de l'ovaire diminuait de façon significative la prolifération de ces cellules. Ces données soulèvent l'hypothèse que *galectine-7* pourrait favoriser la croissance de ces cellules cancéreuses. Le mécanisme moléculaire impliqué demeure toutefois inconnu.

Cancer du sein

Galectine-7 est uniquement exprimée dans les cellules myoépithéliales de la glande mammaire [186]. Cette spécificité d'expression au niveau protéique avait été suggérée par l'analyse de transcriptomes entre des cellules normales myoépithéliales et luminales. Ces données avaient identifié *galectine-7* comme étant le gène le plus exprimé parmi quarante-deux gènes qui distinguent ces deux types cellulaires (**Figure 3**) [12, 240, 241].

Plusieurs études ont rapporté la présence de niveaux anormalement élevés de *galectine-7* dans les carcinomes mammaires. Une première étude publiée en 1997 a démontré que *galectine-7* était surexprimée dans les tissus de carcinomes mammaires de rats induits chimiquement par le DMBA [242]. Dans notre laboratoire, Demers et ses collaborateurs ont examiné l'expression de *galectine-7* sur des micromatrices tissulaires fabriquées à partir de biopsies de patients atteints de différents carcinomes mammaires [186]. Les résultats ont révélé que l'expression de *galectine-7* était sévèrement altérée dans les tissus représentant les carcinomes mammaires. Dans tous les cas, les niveaux élevés de *galectine-7* ont été observés chez les patients atteints de carcinomes mammaires de hauts grades, notamment ceux avec un

phénotype basal (i.e. négatifs pour ER, PR et HER-2). Aucun des carcinomes mammaires de bas grade ou de sous-type luminal n'est positif pour le marquage de galectine-7. Les auteurs ont aussi observé que la surexpression de galectine-7 dans des lignées cellulaires murines de carcinomes mammaires augmentait le potentiel métastatique de ces cellules, lorsqu'elles sont injectées dans la glande mammaire de souris syngéniques BALB/c [186].

Ces données appuient ceux de Perou chez l'humain [22]. À partir de l'analyse des transcriptomes d'échantillons prélevés sur différents types de carcinomes mammaires de grade plus ou moins élevés, les auteurs ont observé que des niveaux élevés d'ARNm de *galectine-7* étaient retrouvés spécifiquement dans les carcinomes de sous-type basal connus pour leur haut potentiel métastatique [77]. Actuellement, aucun traitement ne cible spécifiquement ce type de carcinomes. L'utilisation de galectine-7 comme biomarqueur dans le dépistage des carcinomes mammaires, de même que l'utilisation d'inhibiteurs qui cibleraient spécifiquement cette lectine, pourrait donc être envisagée. Dans ce cas, l'identification des mécanismes moléculaires qui régulent l'expression de *galectine-7* est essentielle afin de mieux développer des stratégies d'inhibition.

4.6. Régulation transcriptionnelle de *galectine-7*

De façon générale, peu d'articles traitent des mécanismes de régulation des galectines. Les mécanismes moléculaires qui régulent *galectine-7* sont relativement peu connus. Seulement les promoteurs des *galectine-1* et *3* ont été bien étudiés.

4.6.1. Comparaison avec d'autres galectines

Les régions nécessaires pour l'activité transcriptionnelle basale des galectines se situent en général proche de l'ATG, à -339/+141 pb pour *galectin-3* [244] et -63/+45 pour *galectin-1* [244, 245]. Parmi les facteurs de transcription, NF- κ B a été identifié comme un régulateur clé de ces deux galectines [246, 247]. Plusieurs sites consensus pour ce facteur de transcription sont présents sur le promoteur de *galectine-1* [247]. Des traitements au TNF α ou la surexpression de p65 sont capables d'induire l'expression de *galectine-1*. Il existe même une boucle de régulation négative entre galectine-1 et NF- κ B [248]. Galectine-1 empêche la dégradation d'I κ B α induite par TNF α , inhibant l'activation de NF- κ B. De même, la protéine nucling associée à l'apoptose qui interfère avec l'activation de NF- κ B, en bloquant la translocation nucléaire de p65, inhibe l'expression de *galectine-3* [249]. *Galectine-3* est aussi un gène cible du facteur de transcription p53 [250]. En effet, le deuxième intron de ce gène

possède un site consensus pour p53. Ce site module à la baisse l'activité du promoteur *galectine-3* lorsque p53 de type sauvage est surexprimé [250]. En plus, il a été observé une corrélation positive entre les mutants p53 et la protéine anti-apoptotique galectine-3 dans le cancer de la thyroïde et inversement avec p53 de type sauvage [251]. Galectine-3 serait stimulée par le gain de fonction des mutants p53 ce qui permettrait la modulation du processus anti-apoptotique dans le cancer de la thyroïde.

Plusieurs dinucléotides CpG sont distribués le long des promoteurs et séquences codantes des gènes codant pour les galectines [244]. Certains CpG sont même fortement présents au niveau de la région proximale du promoteur comme dans le cas des gènes codant pour galectine-1, 3 et 8. La méthylation peut donc jouer un rôle clé dans la modulation de l'expression de certaines galectines. Par exemple, l'agent déméthylant 5-aza-CdR (*5-aza-2'-deoxycytidin*) est capable de réactiver la transcription de *galectine-1* dans plusieurs modèles cellulaires [252-254].

4.6.2. Mécanismes moléculaires de régulation de *galectine-7*

Les mécanismes de régulation transcriptionnelle de *galectine-7* sont relativement peu connus. L'étude de Polyak a démontré que *galectine-7* était un des quatorze gènes dont l'expression était induite rapidement suite à la surexpression du gène *TP53* dans des cellules du cancer du côlon [235]. Aucune étude n'a cependant clairement confirmé l'implication directe du facteur de transcription p53 dans la régulation transcriptionnelle de *galectine-7*.

D'autres données ont suggéré qu'il y avait un élément de réponse à l'acide rétinoïque sur le promoteur de *galectine-7*. En effet, des cultures de kératinocytes qui ont été mises en présence d'acide rétinoïque pendant 24h et 48h montraient une diminution importante (5-10 fois) de l'ARNm de *galectine-7* après 24h [229].

Demers et ses collaborateurs ont aussi observé une induction de l'expression en ARNm de *galectine-7* dans des lignées cellulaires de lymphome traitées avec l'inhibiteur de la méthyltransférase de l'ADN, la 5-aza-CdR [199]. D'ailleurs, dans la base de données NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), des données sur le statut de méthylation de l'ADN dans plusieurs lignées cellulaires sont disponibles. C'est le cas du promoteur humain de *galectine-7* (de -1500 à +1 pb) dans les kératinocytes primaires, les cellules myoépithéliales, luminales et souches de la glande mammaire. Le promoteur de *galectine-7* semble être méthylé dans la région située à environ -150 pb de l'ATG dans les cellules luminales qui n'expriment normalement pas galectine-7 (**Figure 8**). Un statut de méthylation semblable a été observé dans les cellules souches mammaires, bien que l'expression de

galectine-7 dans ce type de cellules n'ait jamais été déterminée. À l'inverse, dans les kératinocytes et les cellules myoépithéliales qui expriment de hauts niveaux constitutifs de galectine-7, la méthylation du promoteur ne semble débuter qu'à partir de -500 pb de l'ATG environ. Il serait donc possible que la méthylation puisse jouer un rôle dans la régulation transcriptionnelle de *galectine-7* et que les éléments *cis*-régulateurs situés dans la région de +1 à -500 pb soient essentiels à l'expression de cette galectine.

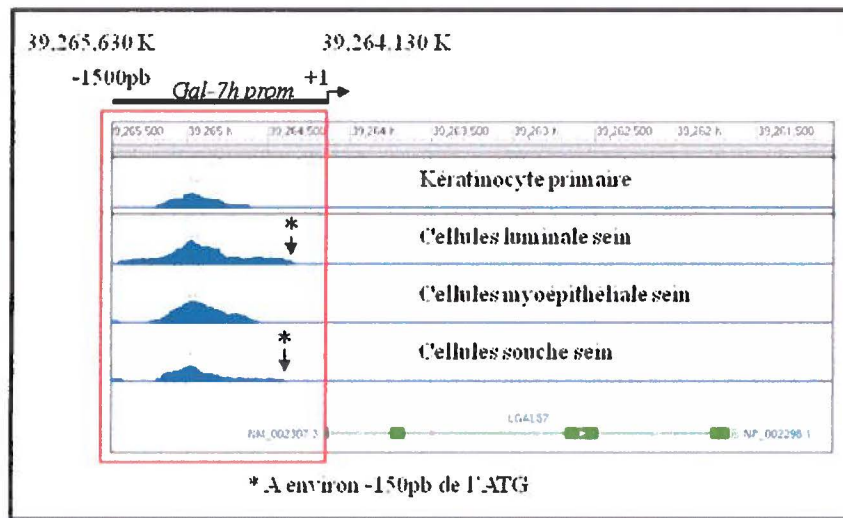


Figure 8. Statut de méthylation du promoteur humain de *galectine-7*. Des données épigénétiques tirées de NCBI démontrent le statut de méthylation de la région de +1 à -1500 pb du promoteur humain de *galectine-7* dans des lignées cellulaires exprimant de hauts niveaux de *galectine-7* (kératinocytes primaires et cellules myoépithéliales mammaires) et dans des lignées cellulaires négatives pour *galectine-7* (cellules luminaires mammaires; cellules souches mammaires/expression de *galectine-7* non testées) (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/epigenomics/view/genome/3963/?term=LGALS7>)

En fait, c'est indirectement à travers d'autres études indépendantes de *galectine-7* que quelques données sont recueillies au sujet de sa régulation. Par exemple, une analyse par des micromatrices à ADN a identifié des gènes induits par Ras dans des fibroblastes embryonnaires murins (MEF/Ras^{+/+}) [257]. Parmi ces gènes induits par Ras, un groupe de 25 gènes ont été identifiés comme clairement dépendant de p65 et/ou de c-Rel. *Galectine-7* a été identifiée parmi ces 25 gènes puisque son expression était induite de 5,43 fois lorsque p65/c-Rel étaient surexprimés dans ces cellules positives pour Ras [257].

D'autre part, par une analyse avec un logiciel de prédiction de la fixation de facteur de transcription (*TFsearch*; <http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>), il est possible d'identifier des sites consensus pour la fixation de facteurs de transcription potentiels. Cette analyse a suggéré que les facteurs de transcription tels que NF-κB, C/EBP, MZF1, Sp1, AP-1

et p53 avaient une probabilité élevée de se fixer sur les promoteurs humain et murin de *galectine-7* (-1500/+1 pb). De plus, ces sites consensus semblent être fortement conservés entre les promoteurs humain et murin de *galectine-7* (Figure 9).

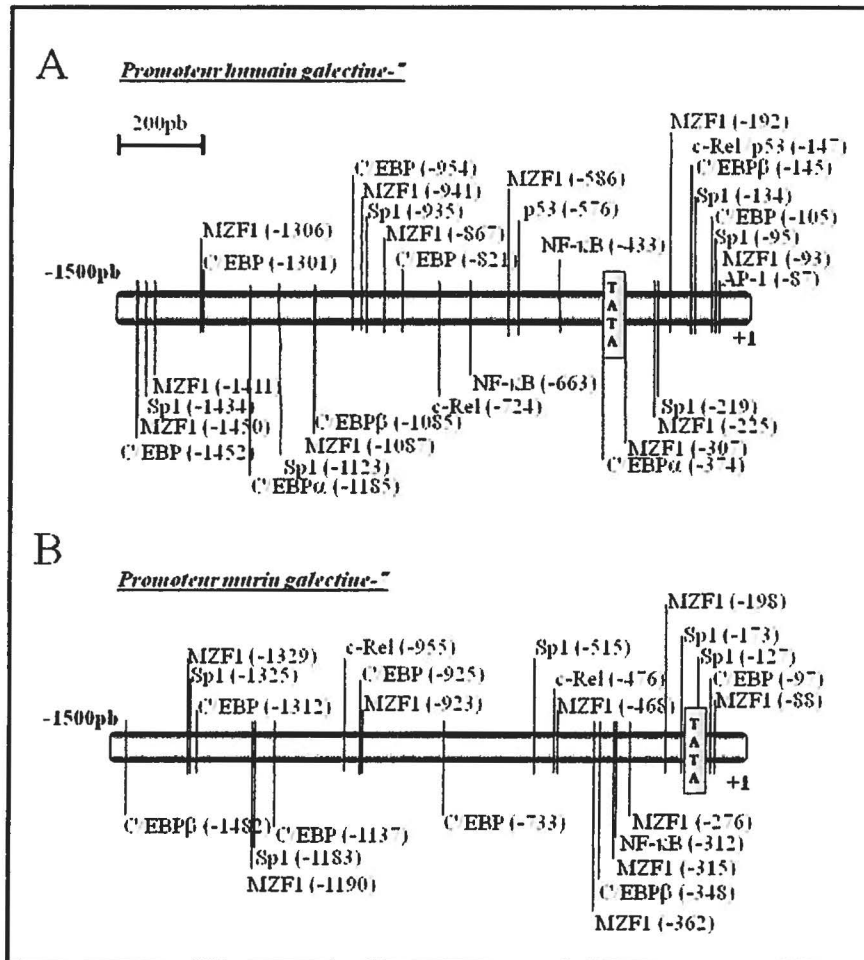


Figure 9. Représentation des différents sites consensus de fixation de facteurs de transcription potentiels sur le promoteur de *galectine-7* humain (A) et murin (B) (tirée de *TFsearch* : <http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>).

D'après ces données de la littérature, des hypothèses concernant certains mécanismes moléculaires de régulation de *galectine-7* peuvent être proposées. Parmi les facteurs de transcription les plus susceptibles d'être impliqués dans la régulation transcriptionnelle du promoteur de *galectine-7*, on peut citer :

i). **Le facteur de transcription p53 et ses formes mutées.** *Galectine-7* est un gène induit par p53 et a été fortement associée à l'apoptose dans différents modèles cellulaires [201, 202, 236]. Plusieurs sites de liaison pour p53 se retrouvent sur le promoteur humain de *galectine-7*. Parmi les autres membres des galectines, le promoteur de *galectine-3* est régulé

par des mutants de p53 [250]. De plus, le gain de fonction des mutants de p53 est très fortement associé à la promotion de la tumorigenèse mammaire, un cancer où galectine-7 présente des niveaux anormalement élevés [203, 256]. Dans ce type de cancer, galectine-7 favorisait la progression maligne du cancer du sein en protégeant les cellules cancéreuses de l'apoptose [203]. Or, plusieurs études révèlent que les mutants p53 sont associés à la résistance à l'apoptose [257].

ii). **Le facteur de transcription NF- κ B.** D'une part, plusieurs sites consensus pour le facteur de transcription NF- κ B se retrouvent sur les promoteurs humain et murin de *galectine-7*. D'autre part, Hanson et ses coll. avaient identifié *galectine-7* comme un des gènes dont l'expression était dépendante de p65 et/ou c-Rel [255]. Une activation aberrante de NF- κ B a été détectée dans la lignée cellulaire de kératinocytes HaCaT où *galectine-7* est fortement exprimée [258]. De façon plus intéressante, une activation nucléaire constitutive de NF- κ B est préférentiellement impliquée dans la prolifération de lignées cellulaires de carcinomes mammaires de sous-type basal, le sous-type où une expression anormale de *galectine-7* est observée [203, 259]. Parmi les autres membres de la famille des galectines, certaines sont régulées par NF- κ B, dont *galectine-1* et 3 [248, 249].

iii). **Le facteur de transcription C/EBP β .** Plusieurs sites pour ce facteur sont très conservés entre le promoteur murin et humain de *galectine-7*. Il a été démontré une inhibition de l'expression en ARNm de *galectine-7* lorsque des kératinocytes étaient traités à l'acide rétinoïque [230]. Or, plusieurs études ont observé que l'acide rétinoïque pouvait inhiber l'expression de gènes cible de C/EBP β en interférant directement avec la voie d'activation de ce facteur [261, 262]. En fait, l'attachement de C/EBP β sur son site consensus sur l'ADN des promoteurs cibles diminuerait en présence d'acide rétinoïque [263]. La régulation à la baisse de l'expression de *galectine-7* dans les kératinocytes traités à l'acide rétinoïque pourrait donc être une conséquence de l'inhibition de l'attachement du facteur C/EBP β sur le promoteur de *galectine-7*. De plus, C/EBP β est très impliqué dans la régulation du développement de la glande mammaire, en particulier l'isoforme C/EBP β -2 [264, 265]. Cette isoforme est associée à la transformation maligne des cellules épithéliales mammaires [266].

5. Facteurs de transcription potentiellement impliqués dans la régulation du promoteur de *galectine-7*

5.1. Le facteur de transcription p53

Dans les années 1980, p53 a été au départ identifiée comme une protéine reliée à la transformation tumorale puisque les toutes premières études montraient que p53 était surexprimée dans les cellules tumorales humaines et murines [269, 270]. Dix ans plus tard, les chercheurs découvraient qu'en réalité les propriétés oncogéniques de la protéine p53 résultaient de nombreuses mutations au niveau de la séquence du gène. Ces mutations seront responsables du paradigme connu aujourd'hui comme étant le « gain de fonction oncogénique (GOF) de p53 » [271]. C'est à partir des années 1990 que p53 fut reconnue comme « un gardien majeur de l'intégrité du génome » [50]. Les conséquences biologiques de son activation incluent la régulation du cycle cellulaire, l'induction de l'apoptose, le développement, la différenciation, l'amplification des gènes, la recombinaison de l'ADN, la ségrégation chromosomale et la sénescence cellulaire [272, 273]. Le facteur p53 est issu d'une famille qui inclut trois membres : p53, p63 et p73. Les facteurs p63 et p73 codent pour différentes isoformes dont la structure et la fonction sont similaires, mais non identiques à p53. Ces protéines ont des fonctions redondantes au niveau de certains processus cellulaires comme l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose [274].

5.1.2. Les membres de la famille p53 : p53, p63 et p73

Les trois membres de la famille p53 partagent une forte homologie autant au niveau génomique qu'au niveau protéique. Chacun d'entre eux contient un domaine de transactivation, un domaine de liaison à l'ADN (*DNA binding domain*, DBD) et un domaine d'oligomérisation (**Figure 10**). Le niveau d'homologie majeur entre ces trois facteurs de transcription se situe au niveau du DBD. En effet, il y aurait 63% d'identité entre p53 et p73 et 60% entre p53 et p63, ce qui suggère que ces trois facteurs pourraient lier les mêmes séquences d'ADN et activer des promoteurs communs [274]. De même, la forte conservation du domaine d'oligomérisation de ces protéines suggère qu'elles pourraient former aussi bien des hétéro-oligomères que des homo-oligomères. Cependant, il a été démontré que chaque membre de cette famille tendrait à former majoritairement des homo-oligomères [275, 276]. Bien que p53 de type sauvage ne co-immunoprécipite pas avec p73, il a été observé que des mutants de p53 (R175H et R248H) pouvaient interagir avec p73 et inactiver ses fonctions de transactivation [275]. Les facteurs p63 et p73 peuvent reconnaître et s'attacher au site consensus de p53 et ainsi activer des gènes cibles de p53 comme *p21*, *bax*, *mdm2*, *GADD45*,

etc. [274]. Cependant, ces gènes cibles semblent répondre différemment selon s'il s'agit de p53, p63 ou p73 qui active le promoteur.

L'expression de p63 et p73 dépend du type cellulaire et du tissu. Contrairement à p63, l'expression et les fonctions de p73 seraient moins bien définies. La protéine p73 joue principalement un rôle dans le développement et la survie des cellules neuronales en bloquant les fonctions pro-apoptotiques de p53 [277]. Dans les cancers, une forte expression de p73 a été retrouvée dans les stades avancés de carcinomes ovariens [278] et mammaires [279]. Le facteur p63 se présente sous deux isoformes : TAp63 et Δ Np63. Le facteur Δ Np63 est un régulateur essentiel du développement de la glande mammaire [3, 280]. Dans la glande mammaire adulte, l'expression de Δ Np63 est restreinte aux cellules myoépithéliales, c'est pourquoi ce facteur a été identifié comme un marqueur nucléaire de ces cellules [17]. Cependant, l'expression de ce facteur n'a pas été détectée dans la majorité des carcinomes mammaires invasifs [281].

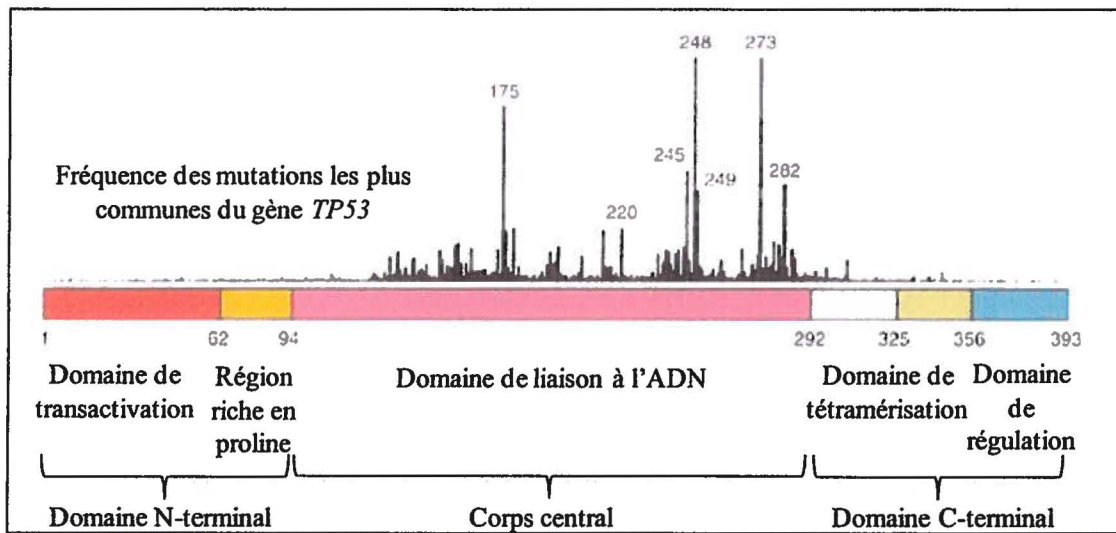


Figure 10. Représentation des différents domaines de la protéine p53. Les histogrammes représentent la fréquence relative des différentes mutations du gène *TP53* associées aux tumeurs et leur localisation sur la protéine selon la base de données IARC (*International Agency for Research on Cancer*, <http://www.p53iarc.fr>) (adaptée de [282]).

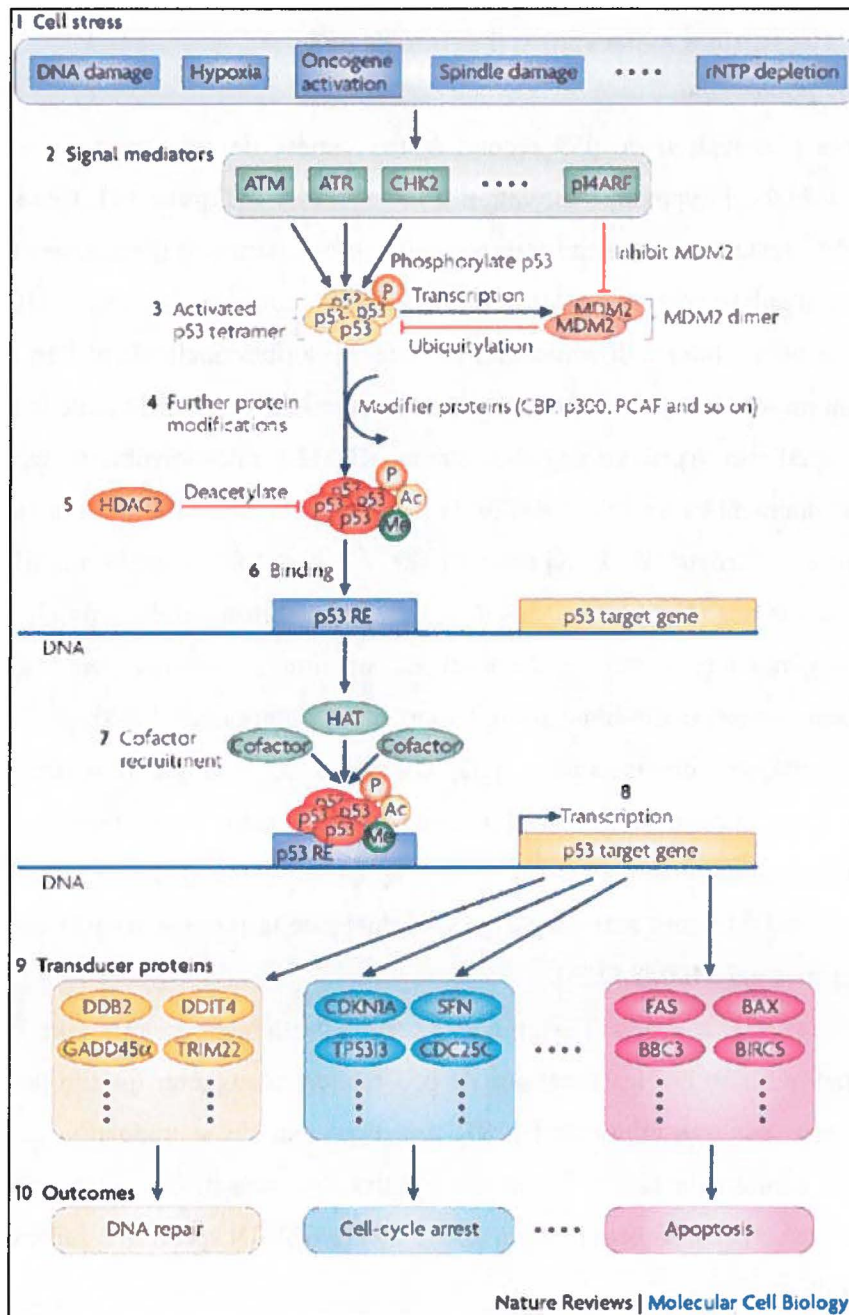


Figure 11. Mécanismes d'activation de p53 et de la régulation de ses gènes cibles. Un stress cellulaire (1) va en premier lieu activer différents médiateurs (2) qui à leur tour vont activer p53 (3) en phosphorylant certains résidus de cette protéine ou en inhibant MDM2. La libération de p53 de MDM2 et certaines modifications (4) de cette protéine par des acétyltransférases et méthyltransférases vont permettre sa stabilisation, sa translocation au noyau et sa fixation comme tétramère sur ses éléments de réponse (RE) sur les promoteurs (6). Des histones désacétylases HDAC2 peuvent inhiber la liaison de p53 à l'ADN (5). Le facteur p53 recrute différents cofacteurs sur le promoteur des gènes cibles (7) pour activer leur transcription (8). p53 peut activer de nombreux gènes codant pour des protéines (9) impliquées dans différents processus cellulaires comme la réparation de l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose (10) (tirée de [283]).

5.1.2. Mécanismes moléculaires d'action de p53

Sa voie d'activation

La voie d'activation de p53 répond à une variété de signaux de stress (ex. : des dommages à l'ADN, l'hypoxie, l'activation d'oncogènes...) (Figure 11). Ces signaux sont détectés par différentes protéines qui transmettent l'information soit directement à la protéine p53, soit à son régulateur négatif MDM2 (*Mouse double minute 2 homolog*). MDM2 est une ligase d'ubiquitine qui bloque directement l'activité transcriptionnelle de p53 en favorisant sa dégradation au protéasome [283, 284]. Dans plusieurs cellules, la demi-vie de la protéine p53 varie entre 6 et 20 min. Après un signal de stress, MDM2 s'auto-polyubiquitine, induisant sa dégradation et augmentant ainsi la stabilité de p53 qui passe de quelques minutes à quelques heures. D'autres médiateurs de la réponse au stress agissent à travers la modification de la protéine p53 et non par MDM2. Dans les deux cas, une stabilisation de la protéine p53 induit l'activation de gènes impliqués dans de multiples fonctions cellulaires, dont l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence, la différenciation, l'apoptose et l'autophagie [285].

Dans certaines circonstances, p53 contribue à la réparation des dommages génotoxiques. Dans la majorité des cas, l'activation de p53 mène à une inhibition irréversible de la croissance cellulaire et à l'activation de l'apoptose. Comme il a été démontré que la transcription de MDM2 était activée par p53, la durée de la réponse de p53 est rapidement régulée et réprimée par MDM2 [286].

Bien que p53 a été à l'origine caractérisé seulement comme un co-activateur transcriptionnel, aujourd'hui les fonctions de p53 tendent à suggérer qu'elle peut aussi agir comme un répresseur transcriptionnel [287], un régulateur de la traduction [288] et de la recombinaison homologue [289]. Le mode d'activation transcriptionnelle principal de ce facteur se fait via son attachement direct à une séquence d'ADN spécifique sur les promoteurs de ses gènes cibles.

Ses éléments de réponse sur les promoteurs cibles

Suite à son activation, p53 est stabilisée et transloque au noyau où elle s'attache comme un tétramère à son élément de réponse (RE) sur les promoteurs des gènes cibles [290, 291]. Le RE de p53 dans le génome est composé de deux copies d'un motif pour permettre la fixation du tétramère. Ce motif se présente sous la forme d'un premier demi-site : 5'-RRRCWWGYYY -3' suivi d'un espace composé d'environ 0 à 21 pb puis d'un second demi-site : 5'-RRRCWWGYYY -3' (ou R=adénine, A ou guanine, G, W=base purine, Y=base pyrimidine) [292, 293]. Plusieurs expériences ont démontré que l'affinité de la liaison de p53

sur un promoteur et la transactivation subséquente de celui-ci augmentaient suivant le nombre de demi-sites adjacents de p53 sur ce promoteur [283].

Bien que les RE de p53 tendent à se retrouver dans les régions non-codantes des gènes, ils peuvent être localisés pratiquement n'importe où sur le locus du gène cible [283]. Ils sont plus communément retrouvés dans les promoteurs à une distance variable en amont du site d'initiation de la transcription (TSS, *transcriptional start site*). Ils sont souvent localisés très proche du TSS, dans les 300 premières paires de bases, mais aussi dans les introns et quelques fois dans les exons. En général, le potentiel de transactivation des RE tend à diminuer à mesure qu'ils s'éloignent en distance du TSS [283]. Lorsque p53 reconnaît et se fixe sur son RE, elle peut recruter les facteurs de transcription généraux TAF (*TATA-binding protein-associated factors*) pour induire la transcription. p53 peut aussi recruter des histones acétyl-transférases comme CBP, p300 et PCAF sur les promoteurs des gènes cibles, ce qui augmente leur transcription [283].

Les acides aminés qui sont impliqués dans l'interface entre le site consensus sur l'ADN et le DBD de p53 sont : Lysine-120, Serine-241, Arginine-248, Arginine-273, Alanine-276, Cystéine-277 et Arginine-280 [294]. La mutation d'un seul de ces acides aminés est suffisante pour abolir la liaison de p53 à son RE [294-296]. Il a cependant été démontré dans la littérature que des mutants de p53 ayant une altération au niveau de l'un de ces acides aminés avaient tout de même été associés à l'activation transcriptionnelle de certains gènes [297, 298].

5.1.3. Les mutants de p53

Leurs caractéristiques

Les mutants p53 sont caractérisés par une demi-vie prolongée (1-24h) comparativement aux protéines p53 de type sauvage (6-20 min) [299]. La stabilité des mutants p53 est en partie due au fait que le promoteur de *MDM2* ne peut être activé par les mutants p53. *MDM2* ne peut donc pas contrôler la dégradation des mutants p53, contrairement au p53 de type sauvage [300]. Un autre facteur qui augmente la stabilité des mutants est qu'ils présentent une localisation majoritairement nucléaire dans les cellules cancéreuses [301]. Des études structurales ont permis de classer les mutants p53 en deux grandes catégories : (a) les mutants déficients dans leur contact avec l'ADN (mutations situées au cœur du DBD). Les plus communément retrouvés dans cette catégorie sont : R248Q, R248W, R273H et R273C; (b) les mutants déficients au niveau de leur structure

tertiaire. Dans cette classe on retrouve principalement: R175H, G245S, R249S et R282W [294-296].

L'existence d'une fonction biologique différente entre ces deux grandes classes de mutants n'a pas encore été clairement définie. Cependant, la présence de mutants conformationnels a été associée aux patients atteints d'un cancer du sein dont la rechute après un traitement chimiothérapeutique conventionnel arrivait plus fréquemment comparativement aux patients dont les carcinomes mammaires exprimaient un ou des mutants p53 dans le DBD [302-304]. Ces données indiquent que les mutants p53 ne perdent pas l'activité de la protéine sauvage, mais au contraire gagnent de nouvelles fonctions oncogéniques qui contribuent au développement et à la maintenance des tumeurs ainsi qu'à la résistance des traitements anticancéreux. Cependant, comment des mutants p53 qui présentent soit une altération dans leur DBD soit dans leur conformation peuvent-ils réguler la transcription des gènes ? Contrairement à certains gènes suppresseurs de tumeur, dont une mutation dans leur séquence résulte en générale en l'absence ou en l'expression de protéines tronquées, des mutations dans le gène *TP53* génèrent des hauts niveaux de protéines mutées fonctionnelles [298]. Les mutants p53 peuvent agir comme des oncogènes à l'inverse des fonctions oncosuppressives de la protéine sauvage [298]. Les mécanismes impliqués dans ces gains de fonction (GOF) des mutants p53 n'ont pas encore été clairement définis, mais font l'objet de nombreuses études.

Mécanismes des gains de fonction des mutants p53

Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont clairement démontré que les mutants p53 pouvaient se lier sur les promoteurs de divers gènes, dont *CD95*, *EGR1* et *MSP* [305-308]. L'interaction de ces mutants sur l'ADN a été observée dans des cellules non stimulées, impliquant que les mutants p53 étaient constitutivement fixés sur ces promoteurs. Plusieurs études dans différents modèles, incluant les cellules du cancer du sein, ont suggéré que les mutants p53 possédaient un site d'attachement distinct du RE de la forme normale de p53. En effet, il a été observé que plusieurs locus ne possédant pas de RE pour p53 étaient des cibles transcriptionnelles directes des mutants p53 les plus communs [309]. C'est le cas des mutants p53 R175H et R280K, dont la fixation sur plusieurs promoteurs de gènes a été démontrée [310, 311].

Jusqu'à présent, les recherches pour identifier une séquence consensus spécifique à l'attachement de mutants p53 ont échoué et plusieurs hypothèses ont donc été proposées à propos de leur GOF [297, 298]. Ludes-Meyers et ses collaborateurs ont déterminé que le

promoteur de *EGFR* pouvait être activé à la fois par p53 de type sauvage et muté [312]. Cependant, alors que l'activation du promoteur *EGFR* par p53 de type sauvage nécessite la reconnaissance et la fixation sur son site consensus spécifique, la liaison de la forme mutée de p53 était indépendante de la reconnaissance de celui-ci. En fait, les auteurs ont suggéré que les mutants p53 pouvaient activer le promoteur *EGFR* après leur recrutement sur l'ADN par d'autres facteurs de transcription. D'autres études ont aussi démontré que les mutants p53 interagissaient avec des complexes protéiques transcriptionnellement compétents. Par exemple, des mutants p53 peuvent interagir avec le facteur anti-apoptotique NF- κ B [313, 314]. Il a été observé que les promoteurs fixés par p53 R175H présentaient de nombreux sites consensus pour le facteur de transcription NF- κ B [310]. De même, le site consensus pour le facteur p63 était principalement fixé par des mutants p53 dans des cellules de carcinomes du poumon H1299 [315] et dans des kératinocytes HaCaT [316]. Ces données suggèrent que la coopération des mutants p53 avec d'autres facteurs de transcription comme NF- κ B et p63 pourrait être une voie importante dans les GOF des mutants p53.

Les mutants p53 peuvent aussi obtenir leur GOF en inhibant certains facteurs de transcription. Par exemple, il a été démontré que les mutants p53 pouvaient fixer les facteurs de transcription p63 et p73 par leur DBD, inhibant leurs fonctions anti-tumorales [317]. Il a aussi été observé que certains mutants p53 pouvaient avoir un effet dominant négatif sur p53 de type sauvage s'ils étaient tous les deux présents dans la cellule. En formant des tétramères mixés, les mutants p53 peuvent réduire les niveaux cellulaires de p53 de type sauvage [318, 319]. Cependant, d'autres études ont suggéré que l'effet dominant négatif des mutants p53 dépendait du ratio p53 normal/muté et qu'une expression égale de ces deux facteurs résultait en une situation où les mutants p53 étaient incapables de réprimer les fonctions de la protéine normale [320, 321].

L'expression des mutants p53 dans le cancer du sein

La mutation du facteur de transcription p53 est l'événement génétique le plus communément détecté dans les cancers humains. La prévalence des mutations du gène *TP53* varie entre 0 et 60% selon les types de cancers humains et peut même atteindre 80% dans certains sous-types de carcinomes, comme dans le cas du cancer du sein [22, 322]. Les deux allèles du gène *TP53* sont souvent perdus ou mutés. Il s'agit du second gène le plus fréquemment muté après le proto-oncogène *PI3KCA* (muté dans 26% des carcinomes mammaires) (COSMIC, <http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>) [52, 309].

D'après les données tirées de COSMIC et de l'Agence Internationale pour la Recherche sur le Cancer (IARC, <http://p53.iarc.fr>) 70% des altérations de *TP53* dans le cancer du sein sont des mutations non-sens [323].

Dans le but de mieux étudier les fonctions et l'implication de ces mutations dans la carcinogenèse du cancer du sein, Wasielewski et ses collaborateurs ont analysé la séquence codante complète du gène *TP53* dans quarante et une lignées cellulaires du cancer du sein [324]. Grâce à l'utilisation de ces lignées cellulaires, les mutants p53 ont pu être associés à la survie des cellules cancéreuses mammaires [259]. En effet, l'inhibition des mutants p53 endogènes dans des lignées cellulaires de carcinomes mammaires par des ARN interférant induisait une mort cellulaire massive de ces cellules, ce qui n'était pas le cas pour des cellules portant un p53 de type sauvage. Les mutants p53 réduisaient également la sensibilité à l'apoptose à la fois spontanée et induite par des dommages à l'ADN dans d'autres modèles cellulaires épithéliaux mammaires [325]. Une association positive entre les mutants p53 et l'expression des protéines anti-apoptotique Survivine et Bcl-2 dans le cancer du sein a même été rapportée [326, 327].

Il a aussi été observé que les mutants p53 pouvaient favoriser la prolifération cellulaire de carcinomes mammaires [328], l'angiogenèse [329] et la métastase dans le cancer du sein [330-332]. Dans le cancer inflammatoire du sein, une augmentation de la fréquence des mutations de *TP53* serait liée à la surexpression de NF- κ B [333, 334]. Les mutants p53 augmenteraient l'activité du facteur de transcription NF- κ B en réponse au TNF α ce qui induirait l'expression des récepteurs et cytokines inflammatoires dans des cellules du cancer du sein [313].

Les mutations de *TP53* ont plus fréquemment été observées dans les carcinomes mammaires de haut grade [335]. D'après les données tirées de l'étude de Perou et de Sorlie, le nombre d'altérations du gène *TP53* est plus faible dans les carcinomes mammaires de sous-type luminal A, bien différenciés, ER⁺ et PR⁺ [22, 26]. Par contre, les variants de p53 sont significativement plus fréquents dans les tumeurs mammaires de haut grade, volumineuses, de sous-type basal, ER⁻, PR⁻ et HER-2⁺ et présentant des nodules lymphoïdes [336]. Une analyse génomique sur environ 2000 échantillons de carcinomes mammaires a d'ailleurs démontré que des mutants p53 étaient retrouvés dans 34% des sous-types basaux, 22% dans les HER-2⁺, 13% dans les sous-types luminaux B et 5% dans les sous-types luminaux A [337]. Les mutations du gène *TP53* pourraient être utilisées comme biomarqueurs dans le cancer du sein [61]. Une importante étude réalisée chez 1794 patients atteints d'un cancer du sein a d'ailleurs permis de corréliser les carcinomes mammaires ayant un mauvais pronostic avec la présence de

certaines mutations p53 [336]. Parmi les mutations de p53 les plus fréquentes dans le cancer du sein, les altérations du codon 248 seraient associées à un pronostic de survie réduite alors que les mutations des codons 220 et 245 seraient liées à un meilleur pronostic [336]. Des différences ont même été observées au sein du même codon puisque la mutation R248W corrélait avec une mortalité significativement plus élevée comparativement à la mutation R248Q.

Les mutants p53 sont donc impliqués dans des processus cellulaires clés menant à la progression tumorale et sont associés à un phénotype tumoral agressif [328-332, 335]. Cependant, les mécanismes moléculaires d'action de ces variants ne sont pas encore bien définis et font présentement l'objet d'intenses investigations. L'interaction des mutants p53 avec d'autres facteurs transcriptionnellement actifs comme NF- κ B pourrait être un des mécanismes favorisant la survie des cellules tumorales [338].

5.2. Le facteur de transcription NF- κ B

5.2.1. Mécanismes moléculaires d'action de NF- κ B

Son activation

Le facteur de transcription NF- κ B joue un rôle critique dans l'inflammation, l'immunité, la prolifération cellulaire, la différenciation et la survie. Dans les cellules non stimulées, ce facteur est séquestré dans le cytosol par des kinases inhibitrices I κ B (IKK α , IKK β et IKK ϵ) (**Figure 12**) [339]. En interagissant avec NF- κ B, la séquence hautement conservée de répétition ankyrine des I κ B masque le signal de localisation nucléaire de ce facteur ce qui le retient au cytosol. L'activation de la voie NF- κ B dépend donc de la dégradation au protéasome des I κ B induites par leur phosphorylation. En réponse à une variété de stimuli comme l'interleukine-1 (IL-1), le TNF α , le lipopolysaccharide (LPS), les UVB ou les irradiations γ , la voie NF- κ B est activée ce qui mène à la libération des complexes NF- κ B et à une translocation nucléaire permettant la transcription de gène cibles. La majorité des voies de signalisation qui mènent à l'activation de NF- κ B converge vers le complexe des kinases IKK (*I κ B kinase*) qui sont responsables de la phosphorylation des I κ B et sont essentielles à la transduction du signal de NF- κ B. Une régulation additionnelle de l'activité NF- κ B est complétée à travers des modifications post-traductionnelles des différents membres de cette famille [339].

Bien que l'activité de NF- κ B soit inductible dans la majorité des cellules, une activité nucléaire constitutive de ce facteur peut être détectée dans certains types cellulaires comme les cellules B matures, les macrophages, les neurones, les cellules vasculaires du muscle lisse et un grand nombre de cellules tumorales [339]. Les mécanismes d'activation de la voie NF- κ B ont été très bien caractérisés comparativement aux mécanismes de régulation qui déterminent son inactivation. Le plus connu impliquerait la synthèse de nouvelles protéines I κ B activée par NF- κ B [340]. Ces protéines inhibitrices, comme I κ B α , pénétreraient dans le noyau, déplaceraient les facteurs NF- κ B fixés sur l'ADN et les relocaliseraient dans le cytoplasme [341]. D'autres mécanismes inhibiteurs ont été identifiés qui affecteraient directement les protéines NF- κ B fixées à l'ADN, comme les modifications post-traductionnelles [342].

Les membres de la famille NF- κ B

La famille des facteurs de transcription NF- κ B consiste en cinq protéines : p65 (ou RelA), RelB, c-Rel, p50 (ou NF- κ B1) et p52 (ou NF- κ B2). Chaque membre possède un domaine N-terminal d'homologie Rel (RHD) requis pour l'homo ou l'hétérodimérisation de ces protéines entre elles [343]. Par différentes combinaisons, les membres de cette famille peuvent former plus de quinze dimères. Cependant, l'existence physiologique et la relevance de ces multiples dimères n'ont pas été démontrées. L'hétérodimère p50/p65 représente clairement le dimère le plus abondamment retrouvé dans la majorité des types cellulaires [341]. RelB a seulement été retrouvée dans des complexes contenant p50 ou p52 [344, 345]. Les dimères de c-Rel/p50 sont responsables de l'activité constitutive de NF- κ B observée dans les cellules B matures [346, 347].

Les membres de la famille NF- κ B sont classés en deux groupes selon leur potentiel de transactivation. (a) Les protéines qui possèdent un ou plusieurs domaines de transactivation C-terminal (TAD) sont : p65 (RelA), RelB et c-Rel. RelB est unique, car il a aussi besoin d'une région amino-terminale de type « leucine zipper » en plus de son TAD pour être pleinement actif [348]. (b) Les protéines p50 et p52 ne contiennent pas de TAD. Elles sont synthétisées sous forme de larges précurseurs (p105/p50 et p100/52) contenant une séquence C-terminale caractéristique pour la famille des protéines inhibitrices I κ B qui inhibe leur translocation nucléaire. Ces précurseurs sont dégradés par la voie du protéasome dépendante de l'ubiquitination pour produire les facteurs de transcription p50 et p52 matures [339, 349]. Les homo ou hétérodimères de p50 et/ou p52 ont été reconnus comme des facteurs de

transcription répresseurs. N'ayant pas de TAD, ces deux protéines en se fixant sur les éléments de réponse à NF- κ B présent sur l'ADN, compétitionnent avec les autres membres de cette famille transcriptionnellement actifs, réprimant les gènes cibles [339].

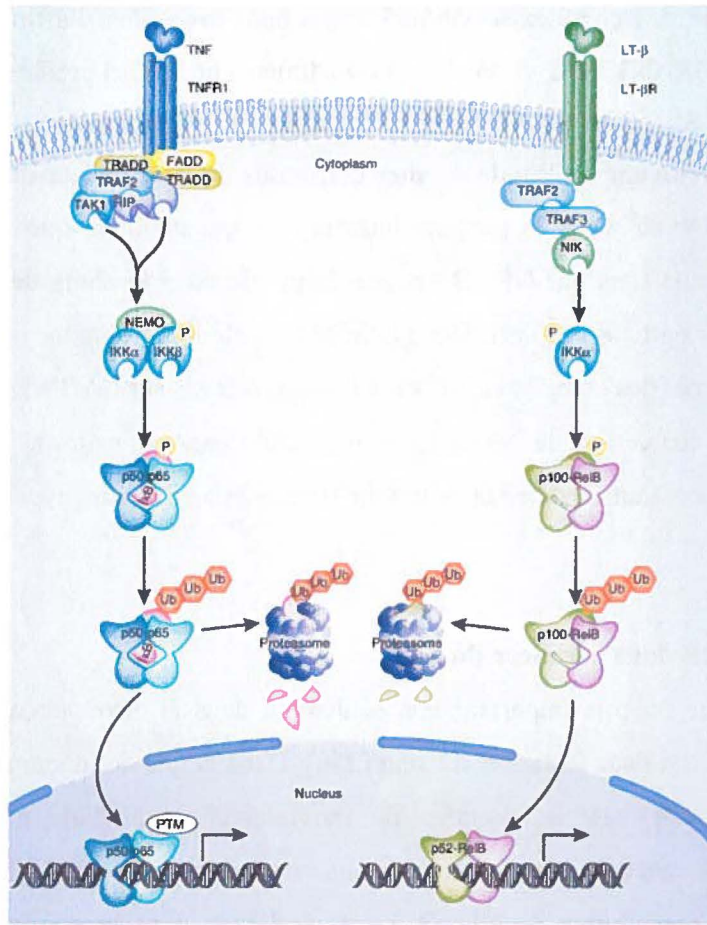


Figure 12. Voie d'activation de NF- κ B. Dans les cellules non stimulées, les dimères de NF- κ B sont séquestrés au cytosol par les protéines inhibitrices I κ B. À la suite d'un stimulus, les protéines I κ B sont phosphorylées par le complexe de kinases IKK (*I κ B kinase*) composé des kinases IKK α et IKK β et de la sous-unité régulatrice IKK γ (NEMO). Les protéines I κ B phosphorylées sont dégradées au protéasome, libérant les dimères de NF- κ B. Ceux-ci peuvent alors transloquer au noyau pour activer la transcription des gènes. La signalisation de NF- κ B est toujours divisée en deux voies. La voie canonique (à gauche) est induite par les stimuli les plus communs de NF- κ B, comme TNF α . La stimulation du récepteur au TNF (TNFR1) mène à l'attachement de TRADD qui permet le recrutement de FADD et TRAF2. Ce dernier s'associe avec RIP1 pour activer le complexe IKK. I κ B α est phosphorylé par IKK β et NEMO résultant en la translocation nucléaire des dimères de NF- κ B contenant majoritairement p65, p50 et/ou c-Rel. L'activité transcriptionnelle de NF- κ B peut être aussi régulée par des modifications post-traductionnelles (PTM). Dans la voie non canonique (à droite), NF- κ B est activé par certaines cytokines comme CD40L, BAFF et la lymphotoxine CD40L, BAFF et la lymphotoxine- β (LT- β). Suite à cette stimulation, IKK α induit la phosphorylation de p100 associé à RelB qui mène à la génération des complexes transcriptionnellement actifs p52-RelB. L'activation d'IKK α dépend de NIK qui est régulé par TRAF3, TRAF2 et des ligases ubiquitine. LT- β R, récepteur pour la lymphotoxine- β (tirée de [350]).

Ses éléments de réponse sur les promoteurs cibles

Bien que le motif κ B commun des dimères de NF- κ B sur l'ADN est : 5'-GGGGACTTCC -3', certains dimères reconnaissent de façon plus spécifique d'autres motifs [351]. Par exemple, les complexes p50/p65 s'attachent avec plus d'affinité à la séquence consensus 5'- GGGRNNYYCC -3' tandis que les dimères p65/c-Rel préfèrent la séquence 5'-HGGARNYYCC -3' (ou H = A, C ou T; R = purine; Y = pyrimidine; N = R ou Y) [352, 353]. En fait, il existe une multitude de sites consensus pour ce facteur de transcription sur l'ADN (environ 1.4×10^4 dans le génome humain), ce qui explique que la reconnaissance spécifique de certains sites par NF- κ B est une étape clé pour le choix des gènes transcrits suite à un stimulus particulier [339]. Des modifications de la chromatine sont aussi requises pour permettre l'accès des complexes NF- κ B à leurs motifs κ B sur l'ADN [354, 355].

Bien que l'activation de NF- κ B soit inductible dans la majorité des cellules, une activité nucléaire constitutive de ce facteur a été détectée dans certains types de cancers, dont le cancer du sein.

5.2.2. NF- κ B dans le cancer du sein

NF- κ B joue un rôle important non seulement dans le développement de la glande mammaire, mais aussi dans le cancer du sein [356]. Dans la glande mammaire normale, NF- κ B joue un rôle clé dans le maintien de l'architecture épithéliale normale durant le développement des canaux en favorisant la prolifération épithéliale [357]. Dans le cancer du sein, une activité constitutive de NF- κ B a été impliquée dans la survie, l'invasion et la métastase des cellules cancéreuses [358, 359]. Des tumeurs de rats induites chimiquement par le carcinogène DMBA ont montré des niveaux élevés d'activité de NF- κ B, et plus particulièrement de c-Rel [360]. En ciblant spécifiquement l'expression de c-Rel dans la glande mammaire par l'utilisation de souris transgénique MMTV-c-Rel, une autre équipe a démontré que le traitement au DMBA de ces souris résultait en une transition épithéliale-mésenchymateuse [361-364]. Ces données suggèrent que l'activation de NF- κ B jouerait un rôle crucial dans les étapes précoces dans ce modèle de carcinogenèse mammaire [365]. Les complexes de NF- κ B les plus fréquemment observés dans les cellules cancéreuses mammaires sont des hétérodimères de p65/p50. Cependant, la localisation nucléaire constitutive de p50, p52 et c-Rel dans des carcinomes mammaires ont aussi été observées [366, 367].

Dans le cancer du sein, une expression altérée de NF- κ B est associée aux sous-types les plus agressifs. Une étude a analysé l'activité basale de NF- κ B dans trente-cinq lignées cellulaires de carcinomes mammaires [261]. Ils ont observé que la majorité des cellules ayant une activité constitutive de NF- κ B élevée étaient de sous-type basal, ER⁻, PR⁻ et HER-2⁺. L'inhibition de l'activité de NF- κ B dans ces lignées de sous-type basal diminuait significativement leur prolifération. De même, la progression d'une lignée cellulaire de carcinome mammaire de rat d'un statut ER⁺ vers un statut ER⁻ est accompagné d'une activation constitutive de NF- κ B [368]. Il semble donc clair que la majorité des carcinomes mammaires ayant une activité constitutive de NF- κ B sont ER⁻.

L'activation constitutive de NF- κ B dans le cancer du sein serait aussi associée à la présence des mutants p53. En effet, l'expression de ces deux facteurs de transcription a été détectée dans les tumeurs mammaires de sous-type basal [261, 336]. Il a été suggéré que leur interaction sur certains promoteurs cibles était un des mécanismes qui permettait l'activation de gènes associés à la survie des cellules cancéreuses qui présentaient pourtant des dommages dans leur ADN [338]. De façon plus surprenante, différentes données suggèrent que c'est la présence du facteur de transcription p53 transcriptionnellement actif qui détermine l'habilité du facteur de transcription NF- κ B à avoir une fonction pro ou anti-apoptotique [338].

5.2.3. Interaction entre NF- κ B et p53 dans l'activation des gènes cibles de NF- κ B

La relation entre NF- κ B et p53 joue un rôle crucial dans la réponse aux dommages à l'ADN et peut avoir des conséquences profondes dans les mécanismes menant au cancer. Bien que p53 et NF- κ B soient des facteurs de transcription qui régulent deux processus cellulaires complètement opposés, ils peuvent être étroitement liés dans la régulation de certains promoteurs communs. Par exemple, les mutants p53 peuvent mimer l'activation de NF- κ B, ce qui induit de façon constitutive l'expression des gènes cibles anti-apoptotiques sous le contrôle de NF- κ B (**Figure 13**). Il a été observé que le mutant p53 R175H prolongeait la localisation et l'activité nucléaire de p65 induite par TNF α dans des carcinomes de la tête et du cou [313]. Scian et ses collaborateurs ont aussi révélé que la surexpression des mutants p53 R175H, R273H et D281G dans une lignée de carcinome du poumon déficiente génétiquement en p53 menait à une résistance à l'apoptose induite par des agents chimiothérapeutiques comme l'étoposide [369]. Les mutants p53 auraient donc la capacité d'activer la voie NF- κ B indépendamment d'un stimulus externe ce qui mènerait à l'expression constitutive de gènes cibles anti-apoptotiques [338, 370].

Cependant, il a aussi été démontré que p53 de type sauvage pouvait induire l'activation de NF- κ B mais dans ce contexte NF- κ B présentait des fonctions pro-apoptotiques (**Figure 13**). En effet, l'inhibition de l'activité de NF- κ B annule l'apoptose induite par p53, indiquant que NF- κ B est essentiel à la mort cellulaire induite par p53 de type sauvage [371]. Schneider et ses collaborateurs ont aussi observé que p53 contribuait significativement à l'activité nucléaire de NF- κ B induite durant l'arrêt du cycle cellulaire en phase S induite par l'hydroxyurée (HU) ou en réponse au TNF α [372]. Dans ce contexte, p53 interagissait avec NF- κ B p65 sur les promoteurs et ce complexe était nécessaire pour la transcription de gènes cibles de NF- κ B. Ils ont déterminé que l'attachement de p53 sur l'ADN précédait le recrutement de NF- κ B p65, suggérant que la protéine p53 pouvait être requise pour l'ouverture de la chromatine ou pour la persistance et la stabilité du complexe NF- κ B /p53 sur les promoteurs des gènes.

Ces études suggèrent donc que les fonctions pro- et anti-apoptotiques de NF- κ B seraient dépendantes de la présence du facteur de transcription p53 ou de ses formes mutées. Ces données doivent être prises en considération, car elles révèlent que l'inhibition de NF- κ B dans des tumeurs qui présentent un p53 de type sauvage pourrait diminuer et non augmenter la réponse thérapeutique. Elles permettent aussi de mieux comprendre par quels mécanismes certains mutants p53 qui sont incapables d'activer les gènes peuvent tout de même avoir des gains de fonction dans le cancer. L'activation constitutive de NF- κ B par les mutants p53 donne aussi une explication au fait qu'une mutation du gène *TP53* est plus néfaste et plus fréquemment retrouvée dans les tumeurs qu'une délétion de ce gène.

L'activation du facteur de transcription NF- κ B qui est normalement finement contrôlée dans la cellule peut donc être altérée par des facteurs de transcription comme les mutants p53 dans le cancer. De façon intéressante, un modèle semblable a aussi été observé avec le facteur de transcription C/EBP β [373].

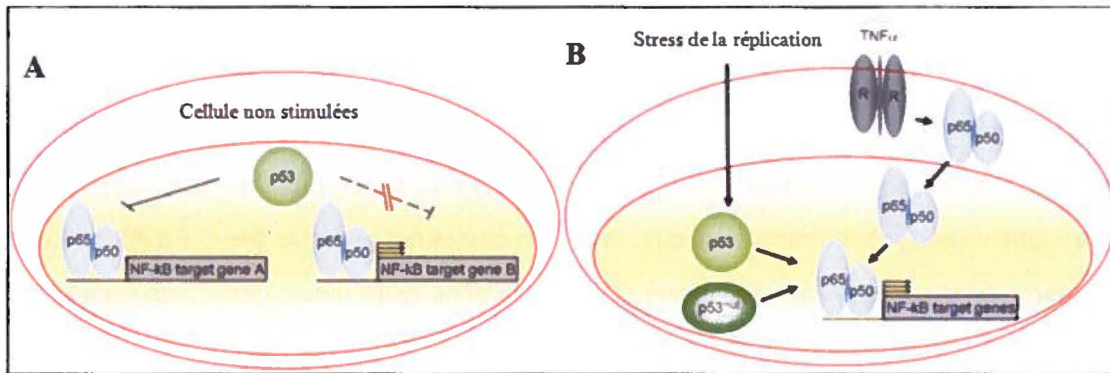


Figure 13. Modèle d'une interaction entre NF-κB et p53 de type sauvage ou muté. (A) Dans les cellules non stimulées, p53 peut réprimer la transcription des gènes cible anti-apoptotiques de NF-κB. Certains de ces gènes cibles peuvent aussi être régulés par NF-κB indépendamment de p53. **(B)** Des études suggèrent que p53 est nécessaire pour l'expression des gènes cibles de NF-κB suite à un stress de la réplication ou une stimulation au TNFα. Par contre, les mutants p53 mimeraient l'activation de NF-κB ce qui entrainerait une activation constitutive de l'expression de gènes cibles anti-apoptotiques de NF-κB, indépendamment d'un stress cellulaire (adaptée de [338]).

5.3. Le facteur de transcription C/EBPβ

5.3.1. Ses caractéristiques

Sa structure et ses isoformes

Le facteur de transcription C/EBPβ (*CCAAT/enhancer-binding protein β*) fait partie de la famille C/EBP, des protéines b-ZIP qui sont exclusivement eucaryotiques et qui se lient sous forme de dimères à des séquences spécifiques pour réguler la transcription des gènes. Cette famille C/EBP consiste en 6 membres nommés selon leur ordre de découverte : C/EBPα, C/EBPβ, C/EBPδ, C/EBPε, C/EBPγ et C/EBPζ. Ces facteurs de transcription sont très impliqués dans plusieurs processus biologiques comme la prolifération, la différenciation, la survie et/ou l'apoptose, le métabolisme, l'inflammation, la transformation et la tumorigenèse [374]. Ils présentent un domaine C-terminal de dimérisation hautement conservé en glissière à leucine (Leucine-zipper). Adjacent à ce domaine se retrouve une région basique d'attachement à l'ADN; ces deux régions forment le domaine b-ZIP. Le domaine N-terminal est moins bien conservé, mais contient les domaines d'activation qui interagissent avec des coactivateurs transcriptionnels et les composants de la machinerie de transcription basale [375, 376].

Le gène C/EBPβ code pour trois isoformes : C/EBPβ-1 (ou LAP1) de 44 kDa, C/EBPβ-2 (ou LAP2) de 42 kDa (LAP1, LAP2, *Liver-enriched transcriptional activator protein 1 and 2*) et C/EBPβ-3 (LIP) de 20 kDa (LIP, *Liver-enriched transcriptional inhibitory*

protein) [374, 377, 378]. Les isoformes C/EBP β -1 et C/EBP β -2 possèdent à la fois les domaines d'activation et le domaine bZIP alors que C/EBP β -3 ne possède que le domaine bZIP et non le domaine d'activation. C'est pourquoi C/EBP β -3 peut agir comme un inhibiteur dominant négatif sur les fonctions des autres membres de la famille C/EBP en formant des hétérodimères non fonctionnels avec eux. Plusieurs études ont rapporté que C/EBP β -2 était un meilleur activateur transcriptionnel que C/EBP β -1, mais leurs mécanismes moléculaires ne sont pas encore bien définis [379].

Son activité transcriptionnelle

C/EBP β est normalement maintenue dans un état réprimé par des domaines de régulation négatifs (CR1-CR7) qui de façon stérique inhibent ces domaines de transactivation [379, 380]. Deux autres domaines de régulation inhibiteurs (RD1 et RD2) ont été identifiés dans cette protéine. RD1 inhibe constitutivement le potentiel de transactivation de C/EBP β en induisant une conformation fermée qui préviendrait l'accès aux domaines d'activation. RD2 inhibe l'attachement de C/EBP β en induisant une conformation qui interfère avec l'habileté de la région basique d'interagir avec l'ADN [381]. La phosphorylation ou la délétion de ces domaines d'inhibition mènent à l'activation de C/EBP β et à l'augmentation de son activité transcriptionnelle. La phosphorylation de C/EBP β a été observée sur plusieurs résidus et est régulée par différentes voies de signalisation comme Ras-MAPK [382], les facteurs de croissance [383], les CDK (*cyclin-dependent kinase*) [384]. D'autres modifications post-traductionnelles sont impliquées dans la régulation de la liaison à l'ADN de C/EBP β et de son activité transcriptionnelle comme l'acétylation, la méthylation et la sumoylation [379].

Le facteur de transcription C/EBP β , comme les autres membres de cette famille, doit dimériser pour s'attacher à l'ADN [385]. Comme le domaine b-ZIP est très conservé entre toutes les protéines de cette famille, les C/EBP peuvent former des homo ou hétérodimères entre eux et se lier sur le même site consensus : 5'- RTTGCGYAAY -3' (R=A ou G; Y=C ou T) [386]. La nature des hétérodimères entre les membres de cette famille peut être variable et dépend de la disponibilité de chacun de ces membres. L'expression tissulaire spécifique des facteurs C/EBP ainsi que les stimuli ou médiateurs physiologiques qui régulent leur expression jouent un rôle important sur la composition et la formation de ces dimères. Ce qui est d'ailleurs le cas pour C/EBP β dans la glande mammaire normale et dans le cancer du sein.

5.3.2. C/EBPβ dans le cancer du sein

Le gène codant pour C/EBPβ n'est pas fréquemment muté dans les tumeurs mammaires. Quelques mutations ont été identifiées dans ce gène, mais elles ne contribuent pas au développement de tumeurs épithéliales [387]. D'après la base de données Oncomine 3.0 (<http://www.oncomine.org/> [388]) l'expression en ARNm de C/EBPβ n'est pas altérée dans le cancer du sein ou dans les lignées cellulaires de carcinomes mammaires comparativement au tissu mammaire normal. D'autres études ont aussi montré que les niveaux en ARNm de C/EBPβ restaient inchangés dans le cancer du sein suite à un stimulus comme l'activation du récepteur oncogénique ErbB [389, 390]. Cependant, il existait des différences dans l'expression ce facteur au niveau de certains sous-types de carcinomes mammaires. Une augmentation faible, mais significative, de l'ARNm de C/EBPβ était observée dans les carcinomes mammaires de sous-type basal [379, 391, 392]. De plus, cette augmentation de l'expression C/EBPβ était aussi associée à un potentiel métastatique du cancer du sein [393], un grade tumoral élevé [392, 394], et un mauvais pronostic [379, 390].

Parmi les isoformes de C/EBPβ, C/EBPβ-3 est souvent associée à la tumorigenèse mammaire. Une élévation du ratio C/EBPβ-3/ C/EBPβ-1 et 2 (ou ratio LIP/LAP) et donc de l'expression de l'isoforme C/EBPβ-3 a été observée dans les carcinomes mammaires de sous-type basal [395, 396]. De même, des souris transgéniques dont le gène codant pour C/EBPβ-3 est surexprimé dans la glande mammaire développent une hyperplasie alvéolaire et des carcinomes mammaires invasifs [397]. Il a aussi été démontré une expression de C/EBPβ-1 et C/EBPβ-2 dans des échantillons prélevés de biopsies de patients atteints de différents carcinomes mammaires [395, 398, 399]. En fait, C/EBPβ-1 s'exprimait de façon prédominante dans les cellules mammaires normales alors que C/EBPβ-2 était restreinte aux cellules en division à la fois dans les cellules épithéliales normales et les carcinomes mammaires [400]. De plus, la surexpression de C/EBPβ-2 dans les cellules MCF10A induisait une transition épithéliale-mésenchymateuse menant à la transformation maligne de ces cellules vers un phénotype invasif [268].

Les mécanismes par lesquels C/EBPβ contribue à la progression tumorale ne sont pas encore bien identifiés, cependant ce facteur serait en partie impliqué dans la régulation de la survie cellulaire et de l'apoptose. Il a été déterminé qu'il induisait la survie cellulaire en réduisant l'expression et l'activité de p53 en réponse à des dommages à l'ADN [401, 402]. Les rôles précis de C/EBPβ-1, C/EBPβ-2 et C/EBPβ-3 dans les cancers du sein de grade élevé ne sont pas clairs. Les études suggèrent que ces trois isoformes possèderaient des fonctions

distinctes sur les promoteurs des gènes bien qu'elles reconnaîtraient le même motif sur l'ADN. Des différences peuvent exister au niveau des partenaires d'interaction et de leur affinité ou spécificité pour leur site consensus sur les promoteurs. Par exemple, il a été observé que le facteur de transcription NF- κ B était régulé par les mêmes signaux inflammatoires que C/EBP β et que le site d'attachement de ces deux facteurs sur les promoteurs était fréquemment couplé [403]. C'est pourquoi l'interaction de ces deux facteurs de transcription pourrait être essentielle pour la régulation de certains processus cellulaires.

5.3.3. L'interaction entre NF- κ B et C/EBP β dans l'activation des gènes

Les facteurs C/EBP β et NF- κ B peuvent être activés par les mêmes cytokines inflammatoires comme l'IL-1, IL-6 et le TNF α [404-406]. Des données ont suggéré qu'une fois activés, ces deux facteurs pouvaient coopérer pour activer de façon synergique certains promoteurs, comme celui de l'*IL-6* [407]. Sur le promoteur de l'*IL-6*, les sites consensus pour les facteurs de transcription C/EBP β et NF- κ B sont très proches [408]. Un site intact pour l'attachement de NF- κ B sur le promoteur de *IL-6* est nécessaire pour l'activité de C/EBP β . L'analyse d'autres promoteurs de gènes impliqués dans la réponse immunitaire inflammatoire révèle que les sites d'attachement pour ces deux facteurs de transcription sont fréquemment présents et rapprochés [409, 410]. Il a été observé que sur le promoteur de l'*IL-8* la liaison du facteur C/EBP β était fortement augmentée lorsque NF- κ B était présent sur son site, adjacent à celui de C/EBP [411]. En fait, selon le ratio cellulaire de C/EBP β et NF- κ B, ces deux facteurs peuvent non seulement agir indépendamment, s'inhiber, mais aussi coopérer et activer de façon synergique certains promoteurs. Cette régulation positive ou négative des promoteurs par le complexe NF- κ B-C/EBP β dépend de la nature de leur site d'attachement sur l'ADN. Si ce complexe se fixe sur un motif NF- κ B, une inhibition du promoteur est observée. À l'inverse, ce complexe active de façon synergique le promoteur s'il se lie sur un site consensus pour C/EBP (**Figure 14**) [403, 411].

C/EBP peut aussi activer la transcription des gènes cibles de NF- κ B en absence d'une stimulation cellulaire. Lorsque la voie NF- κ B n'est pas activée, des homodimères de NF- κ B p50 inactifs peuvent tout de même s'attacher sur les promoteurs et réprimer la transcription de gènes dépendants de NF- κ B [412, 413]. Paz-Priel et ses collaborateurs ont démontré que les facteurs C/EBP pouvaient déplacer les histones désacétylase liées à ces homodimères de NF- κ B p50 pour induire des gènes cibles de NF- κ B en absence d'une stimulation cellulaire [414]. Ils ont aussi déterminé que l'interaction des facteurs C/EBP β avec le complexe NF- κ B

p65/p50 augmentait l'activation des gènes cibles de NF- κ B dans des cellules non stimulées. Une autre étude a observé que des cellules déficientes en C/EBP β présentaient des niveaux cytoplasmiques plus élevés de l'inhibiteur I κ B du facteur NF- κ B, comparé aux cellules de type sauvage [415]. À l'inverse, lorsque C/EBP β était surexprimé, la présence cytoplasmique des I κ B était diminuée ce qui permettait une plus grande translocation nucléaire des complexes NF- κ B et donc une activation des gènes cibles. En fait, les auteurs ont proposé que C/EBP β régulaît négativement le promoteur du gène codant pour l'I κ B en se fixant sur les sites consensus de NF- κ B présents sur ce gène.

Ces données suggèrent donc que comme une augmentation significative de C/EBP β a été associée aux carcinomes mammaires de sous-type basal [379, 391, 392], son interaction avec des complexes de NF- κ B pourrait permettre la régulation de gènes cibles de NF- κ B qui aurait dû être réprimés [373]. C'est par exemple le cas pour la protéine anti-apoptotique Bcl-2 [416], ce qui mène à l'activation de voies de signalisation favorisant la prolifération et la survie des cellules tumorales [268, 417].

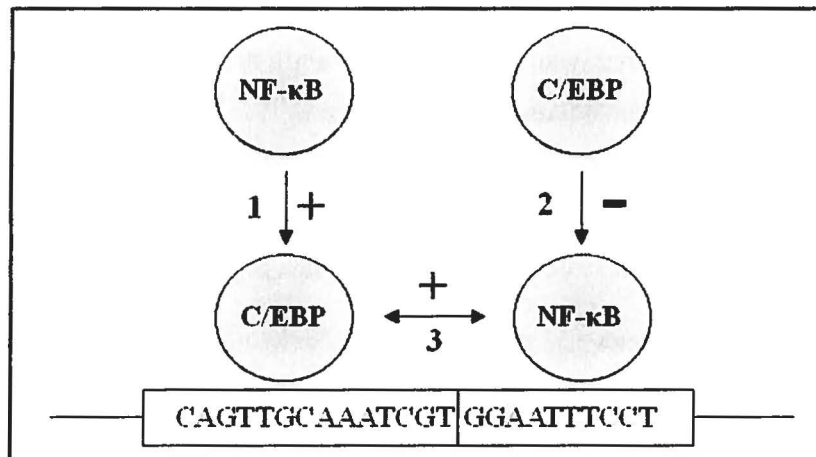


Figure 14. Modèle d'attachement de C/EBP et NF- κ B sur leurs sites adjacents sur le promoteur de l'*IL-8*. (1) Activation synergique de C/EBP par NF- κ B lorsque C/EBP est lié sur son site consensus. (2) Inhibition de NF- κ B par C/EBP lorsque NF- κ B est lié sur son site consensus. (3) Coopération de C/EBP et NF- κ B pour activer la transcription du gène *IL-8* lorsque ces deux facteurs lient leur site consensus (adaptée de [411]).

MISE EN CONTEXTE DU PROJET DE THÈSE

Des niveaux élevés de galectine-7 ont été détectés dans les cancers du sein de sous-type basal. De plus, galectine-7 favorise la métastase des cellules cancéreuses mammaires et confère une résistance à l'apoptose. Galectine-7 pourrait donc servir de cible thérapeutique potentielle dans les carcinomes mammaires de sous-type basal. Cependant, les mécanismes moléculaires qui régulent l'expression de *galectine-7* sont inconnus. Son promoteur possède plusieurs sites consensus pour les facteurs de transcription p53, C/EBP β et NF- κ B.

Une augmentation de l'expression des facteurs de transcription p53, C/EBP β et NF- κ B a été observée dans les cancers du sein de sous-type basal. De façon intéressante, ces facteurs de transcription, qui sont impliqués dans des fonctions variées et parfois opposées, peuvent néanmoins coopérer dans la régulation de l'expression de certains gènes.

L'objectif de mon projet de thèse était donc **d'élucider les mécanismes transcriptionnels responsables de l'expression anormalement élevée de galectine-7 dans le cancer du sein**. Notre hypothèse de recherche était qu'un ou plusieurs des facteurs de transcription, décrits dans cette revue de la littérature, soi(en)t responsable(s) de l'expression anormalement élevée de *galectine-7* dans le cancer du sein.

Nos résultats démontrent que :

- 1). *Galectine-7* est un gène cible de p53 et des mutants p53.
- 2). L'expression de mutants p53 associée à une activation constitutive du facteur NF- κ B est responsable de l'expression élevée de galectine-7 dans les cellules du cancer du sein.
- 3) C/EBP β est une voie d'activation alternative pour l'expression de galectine-7 dans le cancer du sein.

CHAPITRE 2

RÉSUMÉ DU CHAPITRE 2

Galectine-7 a initialement été décrite comme un marqueur des épithéliums stratifiés. Comme les autres membres de la famille des galectines, son expression est souvent altérée dans les cellules cancéreuses. Dans le cancer du sein, son expression est significativement augmentée dans les sous-types moléculaires agressifs, plus particulièrement dans les tumeurs négatives pour le récepteur à l'œstrogène et dans les lignées cellulaires avec un phénotype de type basal. Des études utilisant des modèles de souris ont démontré qu'une forte expression de galectine-7 était suffisante pour augmenter le potentiel métastatique de cellules de cancer du sein. Les cellules cancéreuses surexprimant galectine-7 seraient plus résistantes à l'apoptose. Ce patron d'expression dans les cellules du cancer du sein est surprenant, car galectine-7 a été à l'origine identifiée comme un gène induit par p53. Pour adresser ce paradoxe, nous avons examiné les mécanismes moléculaires qui régulent galectine-7 dans le cancer du sein. Nos résultats ont montré que la transfection de vecteurs qui codent pour des mutants p53 est suffisante pour induire l'expression en ARNm et en protéine de galectine-7 dans les cellules du cancer du sein. Un traitement à la doxorubicine de cellules du cancer du sein présentant différentes mutations du gène *TP53* induit aussi galectine-7. Cette induction est spécifique puisque l'inhibition de ces mutants p53 endogènes par des siRNA de p53 abolit l'expression de *galectine-7* induite par la doxorubicine. L'expression de galectine-7 induite par p53 dans les cellules du cancer du sein corrèle avec une augmentation de l'activité de NF- κ B et est réprimée par des inhibiteurs de NF- κ B. Ces données indiquent que l'habileté des mutants p53 à induire galectine-7 est dépendante de l'activité de NF- κ B. L'implication de NF- κ B a aussi été révélée par des résultats montrant que NF- κ B peut se lier au promoteur endogène de *galectine-7* et que l'expression de *galectine-7* induite par TNF α est abolie par des inhibiteurs de NF- κ B. L'ensemble de ces résultats permet non seulement d'expliquer le fait que galectine-7 présente des hauts niveaux d'expression dans les cellules cancéreuses, mais aussi de suggérer que galectine-7 participerait à la voie de signalisation utilisée par les mutants p53 pour favoriser la progression du cancer.

Expression of Galectin-7 Is Induced in Breast Cancer Cells by Mutant p53

Carole G. Camplon, Marilyne Labrie, Geneviève Lavole, Yves St-Pierre*

Institut national de la recherche scientifique, Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada

Abstract

Galectin-7 was initially described as a marker of epithelial differentiation expressed in the stratified epithelium of various tissues. Like other members of the galectin family, its expression level is often significantly altered in cancer cells. In breast cancer, its expression is significantly augmented in aggressive molecular subtypes, most notably in estrogen receptor-negative tumors and in cell lines with a basal-like phenotype. Studies using experimental mouse models have further shown high expression of galectin-7 was sufficient to increase the metastatic behavior of poorly metastatic breast cancer cells, rendering them more resistant to apoptosis. This expression pattern in breast cancer cells is unexpected because galectin-7 was originally identified as a *p53*-induced gene. To address this paradox, we have examined the molecular mechanisms regulating galectin-7 in breast cancer cells. Our results showed that transfection of breast cancer cells with expression vectors encoding mutant p53 was sufficient to induce galectin-7 at both mRNA and protein levels. Doxorubicin treatment of breast cancer cells harboring a mutant p53 also induced galectin-7. This induction was specific since knockdown of endogenous mutant p53 inhibited doxorubicin-induced galectin-7 expression. The p53-induced galectin-7 expression in breast cancer cells correlated with increased NF- κ B activity and was inhibited by NF- κ B inhibitors, indicating that the ability of mutant p53 to induce galectin-7 was dependent on NF- κ B activity. The implication of NF- κ B was further supported by data showing that NF- κ B bound to the endogenous galectin-7 promoter and that TNF α -induced *galectin-7* expression was abolished by NF- κ B inhibitors. Taken together, our data provide an explanation to the observed high galectin-7 expression levels in cancer cells and suggest that galectin-7 could be part of a common pathway used by mutant p53 to promote cancer progression.

Citation: Camplon CG, Labrie M, Lavoie G, St-Pierre Y (2013) Expression of Galectin-7 Is Induced in Breast Cancer Cells by Mutant p53. PLoS ONE 8(8): e72468. doi:10.1371/journal.pone.0072468

Editor: Andrei L. Gartel, University of Illinois at Chicago, United States of America

Received: March 4, 2013, **Accepted:** July 17, 2013, **Published:** August 14, 2013

Copyright: © 2013 Camplon et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by the Canadian Institutes for Health Research (Grant No. MOP-89697). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: Please note that YSP is a PLOS ONE Editorial Board member. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: yves.st-pierre@iaf.inrs.ca

Introduction

Evidence suggesting that interactions between lectins and their ligands play a major role in different steps of cancer progression has gained the attention of several oncologists [1]. This is particularly true for galectins. Changes in their expression levels correlate with alterations in cancer cell growth, intercellular adhesion, and apoptosis [2–8]. A case in point is galectin-7. In normal tissues, galectin-7 is present in epithelial cells in various tissues [9–11]. Using tissue microarrays constructed from samples obtained from normal breast tissues and breast carcinomas, we previously reported that galectin-7 was expressed at abnormally high levels in tissues collected from patients with a poor prognosis [12]. These results were consistent with the genomic profiling data previously reported by Perou et al. [13], who provided a molecular portrait of 65 surgical specimens of human breast

tumors from 42 individuals. Their data revealed that while *galectin-7* transcripts were expressed at low levels in normal breast tissues and mammary epithelial cell lines, they were highly expressed in estrogen receptor (ER)-negative breast cancer and in cell lines with a basal-like phenotype. This abnormally high expression level of galectin-7 is not restricted to breast cancer cells. It is also found in pancreatic cancer cell lines [14], and in esophageal, buccal, and hypopharyngeal squamous cell carcinoma [10,15–17]. Such high levels of galectin-7 in cancer cells are somewhat paradoxical because galectin-7 has generally been considered a pro-apoptotic protein under the control of p53. *Galectin-7* (also called *p53-induced gene 1*) was indeed identified as one of the 14 transcripts induced by ectopic p53 in colon carcinoma cells [18]. In normal epidermal keratinocytes, increase levels of galectin-7 also correlate with p53 stabilization [19]. Yet, galectin-7 is constitutively expressed in cells harboring mutant

p53 [18,19]. In the present work, we have examined this apparent contradiction by investigating the molecular mechanisms controlling galectin-7 expression in human breast cancer cells.

Material and Methods

Cell lines and reagents

Breast cancer cell lines were a generous gift from Dr. Peter Siegel (McGill University, Montreal, Qc, Canada) [20]. Immortalized human keratinocytes (HaCaT) were provided by Dr. Thierry Magnaldo (Génétique et physiopathologie des cancers épidermiques, Faculté de Médecine, Nice, France) [19]. MCF-7 cells were originally obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). All cell lines were maintained in complete Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 8% (v/v) FCS, 2 mmol/L L-glutamine and 10 mmol/L HEPES buffer. One mmol/L sodium pyruvate was added for maintenance of MCF-7 cells and one mmol/L of non-essential amino acids for HaCaT cells. All cell culture products were purchased from Life Technologies (Burlington, ON, Canada). Doxorubicin, quercetin and parthenolide were purchased from Sigma Chemicals (St. Louis, MO). Recombinant human TNF α was from R&D Systems (Minneapolis, MN). Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) was from Tocris Bioscience (Ellisville, MO).

Vectors, transfection and luciferase assay

The plasmids encoding the luciferase reporter vector containing *p53* (plasmid 219077) or NF- κ B (plasmid 219083) were purchased from Stratagene (Mississauga, ON, Canada). The vectors encoding mutant *p53* (R175H, plasmid 16436; R273H, plasmid 16439; V143A, plasmid 16435; R249S, plasmid 16438 and R248W, plasmid 16437 [21]) were obtained from Addgene (Cambridge, MA). The vector encoding the wild-type human *p53* gene was purchased from Ongene (Burlington, MA). The expression vector encoding human c-Rel was provided by Dr. Nathalie Grandvaux (University of Montréal, St-Luc Hospital, Montréal, Canada). pSuper and pSuper-*p53* siRNA vectors (siRNA CTRL and siRNAp53) were kindly provided by Dr. Reuven Agami (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Netherlands) [22]. The pCDNA3.1 vector was purchased from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). For transfection, cells were plated at equal density 24 h before transfection. Cells were then transfected with the indicated vector(s) using the Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. After transfection, cells were incubated in complete medium at 37° C in 5% CO₂ for the indicated periods of time and subjected to a dual reporter assay. Luciferase activity was measured using the Luciferase Assay System protocol (Promega, Madison, WI, USA) and a luminometer (Lumat LB 9507, Berthold). β -galactosidase activity was measured using a colorimetric enzyme assay using the Luminescent β -Galactosidase Detection Kit II according to the manufacturer's instructions (Clontech Laboratories, Mountain View, CA). Luciferase expression levels were normalized to the levels of β -galactosidase expression.

RNA Isolation and RT-PCR

Total cellular RNA was isolated from cells using the TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNA was prepared from 2 μ g of cellular RNA in a total reaction volume of 20 μ L using the reverse transcriptase Omniscript (QIAGEN, Mississauga, ON, Canada). After reverse transcription, human *galectin-7* (gene ID 3963, sense primer: 5'- ACC AAC CCG GTC CCA G -3' and antisense primer: 5'- GCG GGC TAA CGC TTT ATT TGC -3'), human *galectin-3* (gene ID 3958, sense primer: 5'- ATG GCA GAC AAT TTT TCG CTC C -3' and antisense primer: 5'- ATG TCA CCA GAA ATT CCC AGT T -3'), human *TP53* (gene ID 7157, sense primer: 5'- CCA GCC AAA GAA GAA ACC A -3' and antisense primer: 5'- TAT GGC GGG AGG TAG ACT GA -3'), human *p21WAF1* (gene ID 1026, sense primer: 5'- CTG GAG ACT CTC AGG GTC GAA -3' and antisense primer: 5'- GGA TTA GGG CTT CCT CTT GGA -3'), human *C/EBP β* (gene ID 1051, sense primer: 5'-GCG ACG AGT ACA AGA TCC -3' and antisense primer: 5'- AGC TGC TTG AAC AAG TTC C-3') and *GAPDH* (gene ID 2597, sense primer: 5'- CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3' and antisense primer: 5'-CAG AAG TGG TGG TAC CTC TTC CGA -3'). cDNAs were amplified using the following conditions: 94° C for 3 min, followed by 35 cycles of the following: 94° C for 1 min, 60° C for 1 minute, and 72° C for 1 min, followed by a final extension step at 72° C for 10 min. PCR was performed in a thermal cycler (MJ Research, Watertown, MA). The amplified products were analyzed by electrophoresis using 1.5% agarose gels and SYBR Safe (Life Technologies) staining and UV illumination.

p53 knockdown

MCF-7 and MDA-MB-231 cells were plated in 6-well plates at 3x10⁵ cells/well before transfected with pSuper and pSuper-*p53* siRNA vectors using the Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Twenty-four hours after transfection, 0.5 μ g/ml of doxorubicin was added, and cells were incubated for an additional 24 h before RNA isolation and RT-PCR.

Western Blot analysis

Cells were solubilized in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) lysis buffer (Thermo, Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) containing a cocktail of protease inhibitors (Roche, Laval, QC, Canada). Equal amounts of proteins (25 μ g) were separated on SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada). The membranes were first blocked with 5% milk in PBS/0.05% Tween 20 for 1 h and subsequently blotted overnight at 4° C with primary antibodies: rabbit anti-human *p53* polyclonal antibody (1:1000; Santa-Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and mouse anti- β -actin monoclonal antibody (1:20000; Sigma). Secondary antibodies consisted of horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit or anti-mouse (GE Healthcare, Mississauga, ON, Canada). The immunoblots were developed using ECL detection reagent (GE Healthcare).

ELISA Assay

Human galectin-7 proteins levels were quantified in whole cells using a commercial ELISA kit (R&D Systems) according to the manufacturer's protocol. Samples were analyzed using a Model 680 microplate reader (Bio-Rad).

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)

ChIP was performed using the EZ-Chromatin-Immunoprecipitation Assay Kit (Millipore, Billerica, MA) according to the manufacturer's protocol. Briefly, cells were fixed in 1% paraformaldehyde. Nuclei were isolated, sonicated, and pre-cleaned with protein G agarose/salmon sperm DNA. The pre-cleaned chromatin solution was either set aside as input DNA or incubated with anti-NF- κ B/p50 (06-886), (Millipore), anti-NF- κ B/c-rel (B-6), anti-p53 (DO-1), or anti-RNA polymerase II (05-623B) (Santa-Cruz Biotechnology) on a rotation platform at 4° C overnight. Input DNA and mouse IgG-pulled DNAs were used as controls for all the experiments. After reversal of the cross-linking, DNA was purified from the immune complex and amplified using PCR primers specific for the *galectin-7* promoter region: sense: 5'-GGC ATA GTC CTA GTG GAT CCC-3' and antisense: 5'-TGT AAT GGA ACA GCG GCC ACA-3'. The samples were incubated for 3 min at 94° C, followed by 40 cycles as follows: 1 min at 94° C, 1 min at 62° C, and 1 min at 72° C, with a final extension at 72° C for 10 min. The amplified products were analyzed by electrophoresis using 1.5% agarose gels and SYBR Safe (Life Technologies) staining and UV illumination.

Confocal analysis

MCF-7 cells were cultured onto glass coverslips to semi-confluency. After 24 h, the cells were washed with cold PBS, fixed with 3% paraformaldehyde in PBS and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS and blocked with 1% BSA in PBS (PBA) for 30 min. Cells were first incubated overnight at 4° C with a goat anti-human galectin-7 polyclonal antibody (1:100; R&D Systems) or a rabbit anti-human COX-IV antibody (1:500; New England Biolabs, Ipswich, MA) with PBA. After several washes, the cells were incubated with an Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-goat IgG (1:500; Life Technologies) or an Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG (1:500; New England Biolabs) for 1 h at room temperature. Samples were mounted using ProLong gold antifade Reagent with 4'-6-diamino-2-phenylindole (DAPI) (Life Technologies) on glass slides and visualized using a Zeiss LSM780 laser scanning microscope (Carl Zeiss Microimaging, Thornwood, NY).

Results

Wild-type p53 up-regulates galectin-7 expression in human breast cancer cells

Using MCF-7 cells transfected with a vector encoding wild-type p53 (p53^{wt}), we found that increased levels of wild-type p53 were able to induce galectin-7 expression at both mRNA and protein levels (Figure 1A and B). Similar results were obtained using the MDA-MB-231 cell line (Figure 1C and D). Treatment of MCF-7 cells, which harbor wild-type alleles of

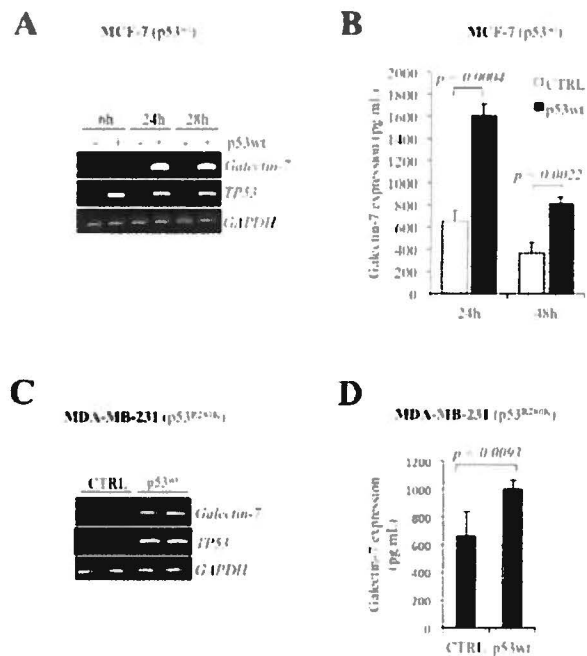


Figure 1. Wild-type p53 induces galectin-7 expression in breast cancer cell. Galectin-7 and *TP53* mRNA and protein levels in MCF-7 (A and B) and MDA-MB-231 (C and D) cells following transfection with an expression vector encoding wild type p53. Protein levels were measured by ELISA, as described the material and methods section. Control cells were generated using an empty pCDNA3.1 vector. *GAPDH* was used as loading control.

doi:10.1371/journal.pone.0072468.g001

TP53, with doxorubicin (Dox) also induced galectin-7 expression at both mRNA and protein levels (Figure 2A and C). At the protein level, the expression of galectin-7 was restricted to the cytosol and into mitochondria where it colocalized with COX-IV, a well established mitochondrial marker (Figure S1). This pattern of expression is consistent with recent data reported [23]. Knockdown of p53^{wt} further inhibited Dox-induced *galectin-7* expression in MCF-7 cells (Figure 2B).

Mutant p53 can induce galectin-7 expression in human breast cancer cells

We and others have previously found that galectin-7 was expressed in mammary tissues of aggressive subtypes of breast cancer cells. Because of the high incidence of p53 mutations in human breast cancer, we thus tested whether mutant p53 can also induce galectin-7 expression. To test this, transfected breast cancer cells with vectors encoding the most common forms of mutant p53, including "hot spots" mutants such as p53^{R175H} and p53^{R248W} [24]. Our results showed that p53^{R175H}, p53^{R273H} and p53^{R248W} were all able to induce *galectin-7* in MCF-7 (Figure 3A). No such increase in *galectin-7*

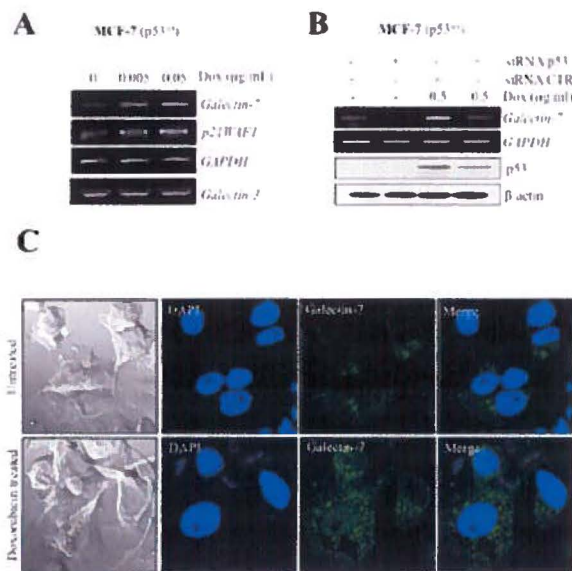


Figure 2. Doxorubicin induces galectin-7 expression in MCF-7^{p53wt}. (A) Increased expression of *galectin-7* and *p21WAF1* in MCF-7 cells treated with increasing doses of doxorubicin. No such increase was observed in *galectin-3* mRNA levels. *GAPDH* was used as loading control. (B) Inhibition of *galectin-7* mRNA levels and p53 protein levels by p53 siRNA in MCF-7 cells treated with 0.5 µg/ml of doxorubicin. A siRNA CTRL vector was used as control and *GAPDH* or β -actin was used as loading control. (C) Confocal images showing galectin-7 expression in doxorubicin-treated MCF-7 as compared to untreated control cells. Fixed cells were labeled with a goat anti-human galectin-7 polyclonal antibody and an Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-goat IgG (green fluorescence). Nuclei were stained with DAPI (blue).

doi: 10.1371/journal.pone.0072468.g002

was obtained using the control (empty) vector. The p53^{R175H} also induced *galectin-7* when expressed in MDA-MB-231, a human breast cancer cell line harboring a mutant *TP53* gene (p53^{R280K}) and in the p53^{null} MDA-MB-453 cells (Figure 3B, C and S5). Of note, mutant p53 were not all equally capable of inducing *galectin-7* in all cells types. In MCF-7 cells, for instance, ectopic expression of p53^{V143A} and p53^{R249S} were insufficient to induce *galectin-7*. Similar results were obtained in MDA-MB-453 transfected with a vector encoding p53^{R273H}, suggesting that the ability of mutant p53 to induce *galectin-7* was cell-specific. Our results showing that Dox-treated MDA-MB-231 cells expressed increased galectin-7 confirmed that endogenous p53^{R280K} was capable of inducing galectin-7 at both mRNA and protein levels (Figure 4A and B). No such increase was observed when the p53^{null} MDA-MB-453 cells were treated with Dox, indicating that the effect of Dox was p53-specific. This conclusion is supported by our data showing that Dox-induced *galectin-7* expression by endogenous p53^{R280K} in MDA-MB-231 cells was inhibited by partial knockdown of p53^{R280K} (Figure 4C).

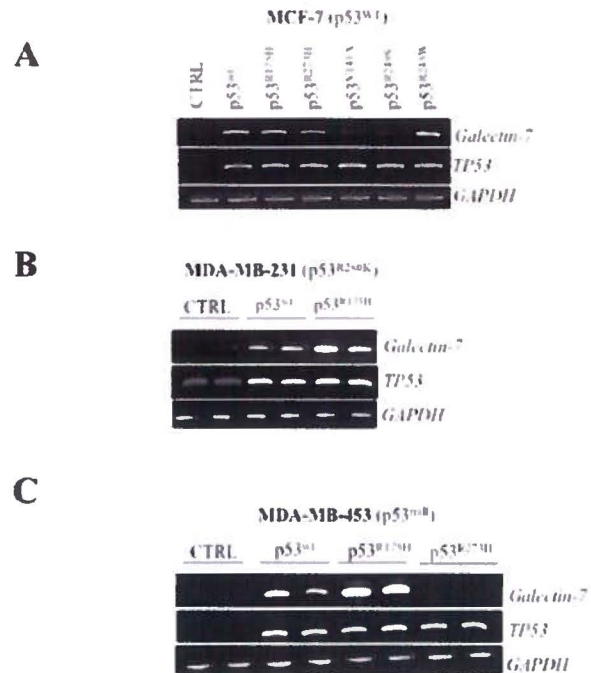


Figure 3. Mutant p53 induces galectin-7 expression in breast cancer cell lines. Semi-quantitative RT-PCR analysis showing *galectin-7* and *TP53* mRNA levels following transfection with an expression vector encoding the wt p53 or a mutated form of p53 (R175H, R273H, V143A, R249S or R248W) in MCF-7 (A), MDA-MB-231 (B) and MDA-MB-453 (C). An empty pCDNA3.1 vector was used as a control (CTRL). *GAPDH* is used as loading control.

doi: 10.1371/journal.pone.0072468.g003

The role of NF- κ B in galectin-7 expression

An *in silico* analysis of the human *galectin-7* promoter revealed the presence of a putative p53 binding site in its 5' proximal region relative to the transcriptional start site (Figure 5A). Several putative NF- κ B binding sites were also present within this region, raising the possibility that *galectin-7* could be regulated by via a transcriptional crosstalk between NF- κ B and p53. This hypothesis is supported by our data showing that both endogenous NF- κ B and p53 were equally capable of binding to the human *galectin-7* promoter (Figure 6). Further support to this hypothesis is provided by our data showing that MDA-MB-468 cells expressing galectin-7 constitutively have high levels of NF- κ B activity (Figure 5B and C). These cells do not have any detectable p53 activity since they have lost the wild-type allele of *TP53* and only express the transcriptionally inactive *TP53*^{R273H} allele. Similar results were obtained in the case of HaCaT cells, a transformed keratinocyte cell line known to express high levels of galectin-7 [23,25]. Like MDA-MB-468 cells, HaCaT cells do not have detectable p53 transcriptional activity and only express the transcriptionally inactive *TP53*^{H170Y/R262W} alleles (Figure 5C, S4 and S5). These

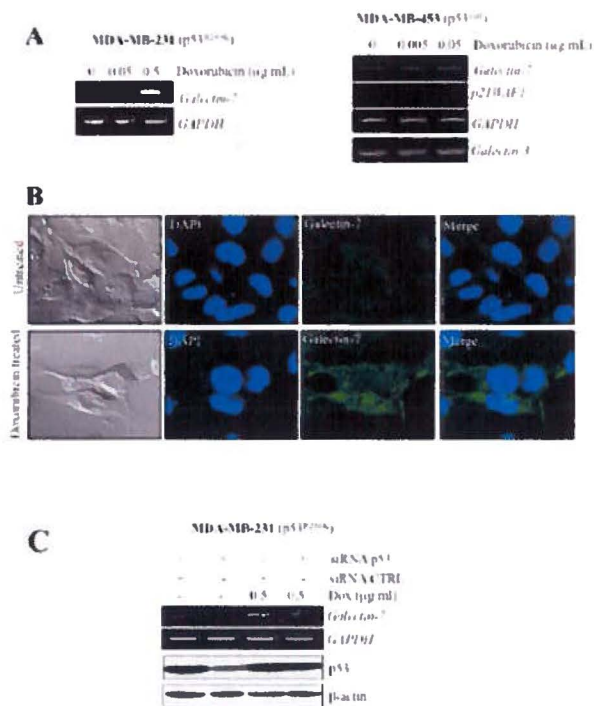


Figure 4. Doxorubicin induces *galectin-7* expression in MDA-MB-231^{p53R175H}. (A) Effect of increasing doses of doxorubicin on *galectin-7* expression in MDA-MB-231, a mutated p53^{R220K} cell line and MDA-MB-453, a p53^{null} cell line. No increase in *galectin-3* mRNA levels was observed in MDA-MB-453. *GAPDH* was used as loading control. (B) MDA-MB-231 were treated or not with 0.5 µg/ml of doxorubicin before cells fixation and permeabilization. A goat anti-human *galectin-7* polyclonal antibody was used in combination with an Alexa Fluor 488 donkey anti-goat IgG to detect endogenous *galectin-7*. MDA-MB-231 cells are shown with *galectin-7* (green) and nucleus (blue). (C) Inhibition of *galectin-7* mRNA levels and p53 protein levels by p53 siRNA in MDA-MB-231 cells treated with 0.5 µg/ml of doxorubicin. A siRNA CTRL vector was used as control and *GAPDH* or β-actin was used as loading control.

doi:10.1371/journal.pone.0072468.g004

results are thus consistent with a role for NF-κB in regulating *galectin-7* expression. This conclusion is supported by our data showing that transfection of an expression vector encoding c-Rel or treatment of cells with TNFα a well-known inducer of NF-κB activity, both induced *galectin-7* expression in MCF-7, HaCaT, and MDA-MB-468 (Figure 7A, B and S2). Our results with TNFα were in fact consistent with gene profiling data in a public profiling database (Geo Profiles, NCBI) showing a specific NF-κB-dependent increase of *galectin-7* in epidermal keratinocytes stimulated by TNFα (Figure 7C). We also found that parthenolide, a specific inhibitor of NF-κB, suppressed *galectin-7* expression in HaCaT cells (Figure 7D). Similar results were obtained following treatment of MDA-MB-468 cells

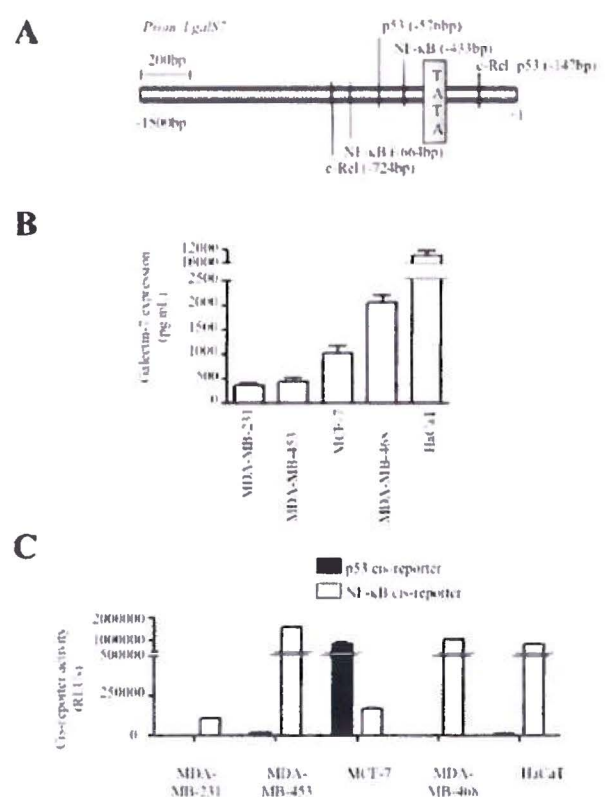


Figure 5. Correlation between *galectin-7* expression and NF-κB activity. (A) Putative binding sites for NF-κB, c-Rel and p53 within the proximal promoter region of the human *galectin-7* gene. The location of the putative binding sites were obtained by analyzing the sequence of the *galectin-7* promoter using the TFSearch program which searches highly correlated sequence fragments against TFMATRIX transcription factor binding site profile database in the 'TRANSFAC' databases by GBF-Braunschweig (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>). (B) *Galectin-7* protein levels measured by ELISA in MDA-MB-231, MDA-MB-453, MCF-7 and MDA-MB-468 breast cancer cell lines. Human epithelial keratinocytes (HaCaT) was used as a positive control. Similar results were obtained by Western blot analysis (Figure S4). (D) NF-κB and p53 activity as measured following transient transfection with luciferase reporter vectors in breast cancer cell lines with different p53 status and HaCaT cells. Transfection efficiency was normalized with co-transfection with a β-galactosidase reporter vector.

doi:10.1371/journal.pone.0072468.g005

with caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and quercetin, two other inhibitors of NF-κB [26,27] (Figure 7E and F). This inhibition of *galectin-7* expression in HaCaT and MDA-MB-468 cells following treatment with parthenolide and CAPE correlated with reduced NF-κB activity (Figure S3). Taken together, these results suggest that NF-κB plays a central role in the expression of *galectin-7*.

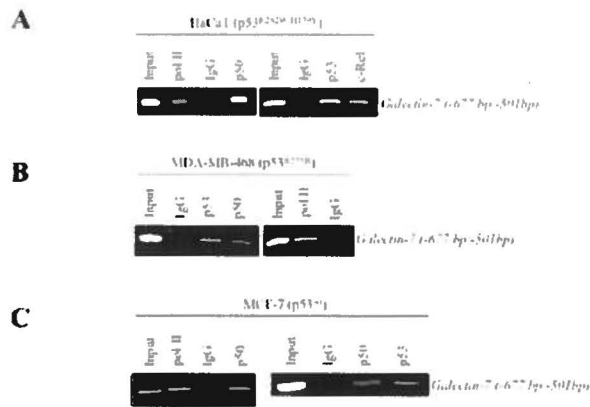


Figure 6. Binding of NF-κB and p53 on the endogenous galectin-7 promoter. Binding of NF-κB p50 and c-Rel isoform, p53 and RNA polymerase II (PolII) on the endogenous galectin-7 promoter was measured by ChIP assay using genomic DNA collected from HaCaT (A) and human breast cancer cell lines MDA-MB-468 (B) and MCF-7 (C). An isotopic control (IgG) was used as a negative control. Total DNA extract was used as a positive control (Input).

doi: 10.1371/journal.pone.0072468.g006

Wild-type and mutant p53 requires NF-κB for the induction of galectin-7.

We next investigated whether NF-κB-dependent galectin-7 expression could be triggered by increased levels of wt or mutant p53. For this purpose, cells expressing wt and mutant p53 were either treated with Dox or transfected with wt or mutant p53. Our results showed that increased expression of wt or mutant p53 (p53^{R179H}) both increased NF-κB activity in MCF-7, MDA-MB-231 and MDA-MB-453 cells (Figure 8A–C and S4). Similar results were obtained using the MDA-MB-231^{p53R220K} cells treated with Dox (Figure 8D and S4). Moreover, the induction of galectin-7 at the mRNA and protein levels by wt or mutant p53 was inhibited in a dose-dependent manner by CAPE (Figures 9 and 10).

Discussion

The present study shows that both wild type and mutant p53 can induce galectin-7 in breast cancer cells. This conclusion is based on the following: 1) transfection with an expression vector encoding wt or mutant p53 induced galectin-7 in several breast cancer cell lines, including p53^{mut} cells; 2) treatment of breast cancer cells harboring wild-type or mutated allele of TP53 with Dox induced galectin-7 expression in human cancer cell lines, and 3) depletion of endogenous p53 inhibited Dox-induced galectin-7 expression. We further showed that NF-κB was also capable of inducing galectin-7. This conclusion is supported by our data showing that: 1) NF-κB binds to the endogenous galectin-7 promoter; 2) transfection of NF-κB subunits or treatment of cells with TNFα, a well-known inducer of NF-κB, both increased galectin-7; 3) inhibitors of NF-κB

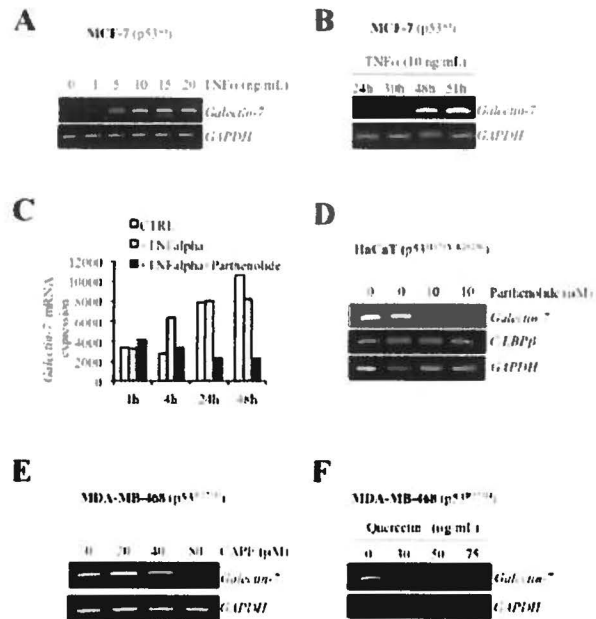


Figure 7. Galectin-7 expression is dependent of NF-κB signaling pathway. mRNA levels following treatment with increasing doses of TNFα (A) or at different time post-treatment with TNFα (B) (C) *In silico* analysis showing effect of parthenolide on TNFα-induced galectin-7 expression in epidermal keratinocytes. Data were retrieved from a dataset (GDS : 1289) in the Gene Expression Omnibus (GEO) repository. (D) Effect of parthenolide on galectin-7 expression in HaCaT cells. mRNA levels of galectin-7 was measured by semi-quantitative RT-PCR analysis 48h after treatment. No such effect was observed on C/EBPβ expression. GAPDH was used as loading control. (E) Dose-dependent inhibition of galectin-7 mRNA levels in MDA-MB-468 cells treated with CAPE. GAPDH was used as loading control. (F) Dose-dependent inhibition of galectin-7 mRNA levels in MDA-MB-468 cells treated with quercetin. GAPDH was used as loading control.

doi: 10.1371/journal.pone.0072468.g007

decreased constitutive or TNFα-induced galectin-7 expression. Finally, our results showing that p53-induced galectin-7 expression correlated with increased NF-κB activity and was inhibited by NF-κB inhibitors suggest galectin-7 expression results from a crosstalk between p53 and NF-κB.

Over the last decade, a large number of observations have brought support to the idea that NF-κB plays an important role in cancer. In most cancer cells, NF-κB is constitutively active and is responsible, at least in part, for resistance to apoptosis. It is therefore not surprising that a crosstalk exists between NF-κB and p53. In fact, our results are consistent with a number of studies showing that: 1) mutant p53 expression correlates positively with NF-κB activity in cultured cancer cells [28]; 2) elevated expression of mutant p53 is associated with increased NF-κB activation in cancer tissues [29]; and 3) mutant p53

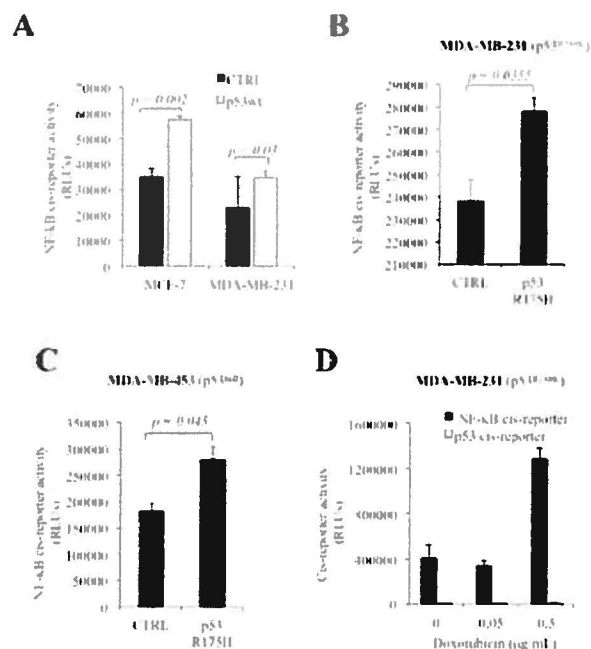


Figure 8. p53 induces galectin-7 expression via NF-kB. (A) Increased NF-kB reporter activity in MCF-7 and MDA-MB-231 cells 24h following transfection with an expression vector encoding wt p53. An empty pCDNA3.1 vector was used as a control (CTRL). Transfection efficiency was normalized by co-transfection with a β -galactosidase reporter vector. NF-kB reporter activity in MDA-MB-231 (B) and MDA-MB-453 (C) cells following transfection of the mutated p53^{R175H}. An empty pCDNA3.1 vector was used as a control (CTRL). Transfection efficiency was normalized by co-transfection with a β -galactosidase reporter vector. (D) Effect of increasing doses of doxorubicin on NF-kB reporter activity in MDA-MB-231, a mutated p53^{R220K} cell line. Transfection efficiency was normalized by co-transfection with a β -galactosidase reporter vector.

doi: 10.1371/journal.pone.0072468.g008

augments NF-kB activity by affecting both the strength and duration of NF-kB activation [30]. Because high levels of NF-kB have been associated with resistance to apoptosis [31], and galectin-7 induces resistance to apoptosis in breast cancer cells [12], our results suggest that galectin-7 may contribute to NF-kB-mediated resistance to apoptosis. Whether the clinical efficiency of some NF-kB inhibitors alone or in combination with other therapies is linked to reduced galectin-7 is an interesting question that merits future investigations. It will also be interesting to determine whether specific isoforms are all equally capable of binding to the *galectin-7* promoter to induce its expression. Homo- and heterodimerization between NF-kB isoforms generates a diverse range of DNA binding proteins which vary according to the cell type, the stimulus, and the duration of the signals. Using several pharmacological inhibitors to block NF-kB activity thus ensures that we target all

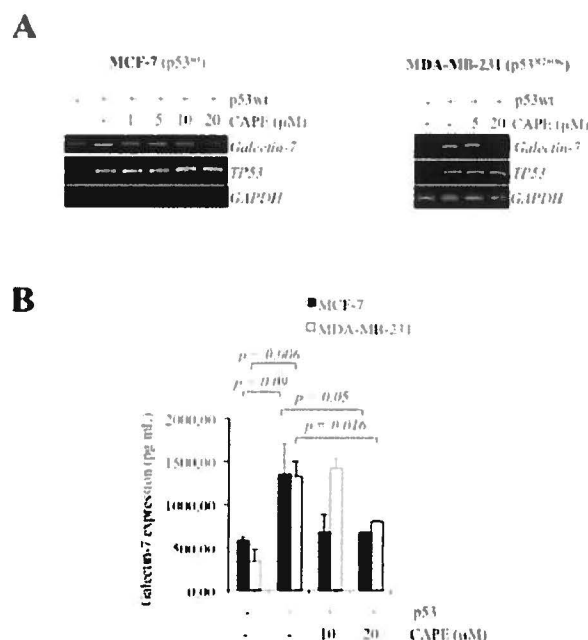


Figure 9. Galectin-7 expression induced by wild-type p53 required NF-kB. Inhibition of galectin-7 mRNA (A) and protein levels (B) by increasing doses of CAPE in MCF-7 and MDA-MB-231 cells transfected with an expression vector encoding wt p53. GAPDH was used as loading control.

doi: 10.1371/journal.pone.0072468.g009

NF-kB isoforms. It is important to note, however, there is yet no evidence yet that NF-kB alone is sufficient to induce galectin-7. For example, galectin-7 is not detected in MDA-MB-453 (null p53) cells, which harbor a constitutively high level of NF-kB activity. Moreover, in contrast to other cell models, we could not induce galectin-7 upon treatment of MDA-MB-453 (p53-null) cells with TNF α .

Mutations in the *TP53* gene are among the most common genetic alterations found in breast cancer. The presence of p53 mutations correlates with a high histologic grade, lack of ER and/or PR expression, deregulated apoptosis, and poor prognosis [32]. Such correlation is consistent with the expression pattern of galectin-7, which is exclusively found in ER/PR negative breast cancer [12,13]. Whether galectin-7 is part of a common pathway used by mutant p53 to aid in oncogenesis is an interesting possibility.

The mechanism by which mutant p53 can induce galectin-7 in breast cancer cells via NF-kB is unclear. Given the frequent overlap between p53 and NF-kB binding sites in gene promoters, it is possible that mutant p53 could influence the transcriptional output of specific NF-kB target genes by binding to their promoters. Increased basal NF-kB activity could also result from the ability of mutant p53 to transactivate the *NF-kB2* gene encoding p100/p52 [28]. Perhaps, this NF-kB/p53 complex is required for opening of chromatin at NF-kB loci and for the persistence of NF-kB complex to its binding motifs [33].

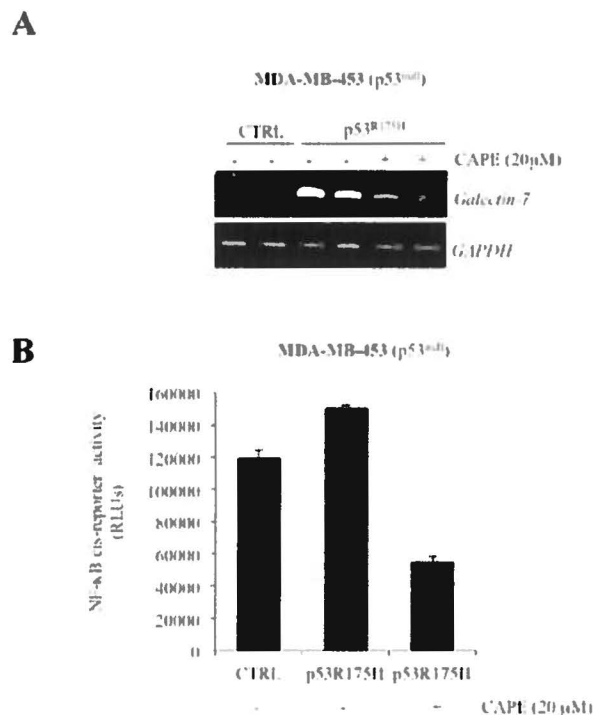


Figure 10. Galectin-7 expression induced by p53^{R175H} mutant is inhibited by CAPE (A) Inhibition of *galectin-7* mRNA levels by CAPE in MDA-MB-453 cells transfected with the expression vector encoding p53^{R175H} or with the (empty) pCDNA3.1 control vector (CTRL). GAPDH was used as loading control. (B) Effect of CAPE on NF-κB reporter activity in MDA-MB-453 cells transfected with the expression vector encoding p53^{R175H} or with the (empty) pCDNA3.1 control vector (CTRL). Transfection efficiency was normalized by co-transfection with a β-galactosidase reporter vector.

doi: 10.1371/journal.pone.0072468.g010

It is important to note, however, that a constitutive NF-κB activity is not sufficient to induce galectin-7. For example, the p53^{mut} MDA-MB-453 cells do harbor high levels of NF-κB activity but do not express detectable levels of galectin-7 (Figure 5B and C), suggesting that a NF-κB/p53 complex is required to transactivate the *galectin-7* promoter or that additional epigenetic regulatory mechanisms are involved. Future investigations are needed to clarify this issue. However, our results reveal a regulatory circuit placing NF-κB under the control of p53 and suggest that p53 can dictate cell fate decisions on induction of pro- or anti-apoptotic genes depending on cell status. Cells with p53 levels insufficient or instable to promote transcriptional activities of NF-κB would be disfavored. Inversely, cells with high levels of mutant p53 could mimic NF-κB activation and readily induce expression of anti-apoptotic NF-κB target gene like *galectin-7*. Our results using the HaCaT cell line, a keratinocyte cell line with high levels of NF-κB activity and galectin-7 expression, are interesting in this

regard In these cells, *TP53* is mutated on both alleles, at codon 179 of exon 5 and codon 282 of exon 8 (Figure S5). These mutations are commonly found in human tumors and are believed to play a significant role in the immortalization of this line [34]. The mutation at position 179 is known to destabilize the p53 protein by altering its ability to interact with a zinc molecule, causing loss of DNA-binding specificity [33]. While the mutation at position 282 alters the global architecture of the protein, it does not affect its ability to bind to DNA [35]. These specific properties of mutant p53 possibly explain the high transcriptional activity of NF-κB in HaCaT cells and the observed binding of mutant p53 to the endogenous galectin-7 promoter. Similar results were obtained in MDA-MB-468 cells, which express a single *TP53* allele that encodes a missense mutation at codon 273 (R→H) (Figure S5). This mutation is one of the most common mutations in cancer cells. It disrupts the sequence-specific DNA-binding core of p53 [36] while maintaining the overall architecture of the DNA binding surface, explaining why binding of specific DNA is not completely abolished. Interestingly, we found that this mutant induced *galectin-7* expression in MCF-7 breast cancer cell line while binding to the endogenous galectin-7 promoter. Surprisingly, it was not able to induce *galectin-7* in the p53^{mut} MDA-MB-453 cells. The mutant R249S was also unable to induce *galectin-7* in all cell lines tested, suggesting that cell-specific corepressors/coactivators are involved. We believe, however, that it is too early to determine if a relationship can be established between a specific type of mutation and its effect on galectin-7 expression as we have tested a relatively small repertoire of mutations (Figure S5). Moreover, it is important to take into account that the effect of a specific mutation may depend on the cell type and/or the expression of the other wild-type or mutated allele. Future studies will have to be conducted to answer this question. We have nevertheless added a sentence in the discussion regarding this possibility.

In conclusion, we found that both wt and mutant p53 can induce galectin-7 in breast cancer cells. While our data help to explain why galectin-7 is constitutively expressed in cancer cells, they also raise questions about the role of galectin-7 when induced by wt versus mutant p53. Our data support the view that galectin-7 cannot be solely considered a pro-apoptotic protein. The biological role of galectin-7 is likely dependent on functional interactions with other p53-induced genes and/or NF-κB-induced genes, a possibility consistent with its elevated levels in breast cancer tissues where mutant p53 is commonly found. Future investigations will be needed to determine how galectin-7 biological function is modulated by the crosstalk between p53 and NF-κB.

Supporting Information

Figure S1. (TIF)

Figure S2. (TIF)

Figure S3. (TIF)

Figure S4. (TIF)

Figure S5. (TIF)

Acknowledgements

The authors wish to thank Dr. Nathalie Grandvaux (Centre de recherche Du CHUM-hôpital St-Luc, Montreal, QC) for providing reagents and helpful discussions and Diane Tremblay for technical support.

References

- Liu FT, Rabinovich GA (2005) Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer* 5: 29-41. doi:10.1038/nrc1527. PubMed: 15630413.
- Bektas S, Bahadir B, Ucan BH, Ozdamar SO. (2010) CD24 and galectin-1 expressions in gastric adenocarcinoma and clinicopathologic significance. *Pathol Oncol Res* 16: 569-577. doi:10.1007/s12253-010-9248-8. PubMed: 20177845.
- Gomez-Brouchet A, Mourcin F, Gourraud PA, Bouvier C, De Pinieux G et al. (2010) Galectin-1 is a powerful marker to distinguish chondroblastic osteosarcoma and conventional chondrosarcoma. *Hum Pathol* 41: 1220-1230. doi:10.1016/j.humpath.2009.10.028. PubMed: 20399482.
- Jung EJ, Moon HG, Cho BI, Jeong CY, Joo YT et al. (2007) Galectin-1 expression in cancer-associated stromal cells correlates tumor invasiveness and tumor progression in breast cancer. *Int J Cancer* 120: 2331-2338. doi:10.1002/ijc.22434. PubMed: 17304502.
- Oka N, Takenaka Y, Raz A (2004) Galectins and urological cancer. *J Cell Biochem* 91: 118-124. doi:10.1002/jcb.10663. PubMed: 14689585.
- Orlandi F, Saggiolato E, Pivano G, Puligheddu B, Termine A et al. (1998) Galectin-3 is a presurgical marker of human thyroid carcinoma. *Cancer Res* 58: 3015-3020. PubMed: 9679965.
- Tang CE, Tan T, Li C, Chen ZC, Ruan L et al. (2010) Identification of Galectin-1 as a novel biomarker in nasopharyngeal carcinoma by proteomic analysis. *Oncol Rep* 24: 495-500. PubMed: 20596638.
- Mayoral MA, Mayoral C, Meneses A, Villalvazo L, Guzman A et al. (2008) Identification of galectin-3 and mucin-type O-glycans in breast cancer and its metastasis to brain. *Cancer Invest* 26: 615-623. doi:10.1080/07357900701837051. PubMed: 18584353.
- Gendronneau G, Sidhu SS, Delacour D, Dang T, Calonne C et al. (2008) Galectin-7 in the control of epidermal homeostasis after injury. *Mol Biol Cell* 19: 5541-5549. doi:10.1091/mbc.E08-02-0166. PubMed: 18829668.
- Magnaldo T, Fowls D, Damon M (1998) Galectin-7, a marker of all types of stratified epithelia. *Differentiation* 63: 159-168. doi:10.1046/j.1432-0436.1998.6330159.x. PubMed: 9697310.
- Saussez S, Kiss R (2006) Galectin-7. *Cell Mol Life Sci* 63: 686-697. doi:10.1007/s00018-005-5458-8. PubMed: 16429325.
- Demers M, Rose AA, Grosset AA, Biron-Pain K, Gaboury L et al. (2010) Overexpression of galectin-7, a myoepithelial cell marker, enhances spontaneous metastasis of breast cancer cells. *Am J Pathol* 176: 3023-3031. doi:10.2353/ajpath.2010.090876. PubMed: 20382700.
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS et al. (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406: 747-752. doi:10.1038/35021093. PubMed: 10963602.
- Takata T, Ishigaki Y, Shimasaki T, Tsuchida H, Motoo Y et al. (2012) Characterization of proteins secreted by pancreatic cancer cells with anticancer drug treatment in vitro. *Oncol Rep* 28: 1968-1976. PubMed: 22961650.
- Zhu X, Ding M, Yu ML, Feng MX, Tan LJ et al. (2010) Identification of galectin-7 as a potential biomarker for esophageal squamous cell carcinoma by proteomic analysis. *BMC Cancer* 10: 290. doi:10.1186/1471-2407-10-290. PubMed: 20546628.
- Saussez S, Decaestecker C, Lorfèvre F, Chevalier D, Mortuaire G et al. (2008) 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* 52: 483-493. doi:10.1111/j.1365-2559.2008.02973.x. PubMed: 18315601.
- St-Pierre Y, Campion CG, Grosset AA (2012) A distinctive role for galectin-7 in cancer? *Front Biosci* 17: 438-450. doi:10.2741/3937.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments CGC YSP. Performed the experiments CGC GL ML. Analyzed the data: CGC GL ML YSP. Contributed reagents/materials/analysis tools: CGC GL ML. Wrote the manuscript: CGC YSP. Helped to acquire funding: YSP.

- Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B (1997) A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 389: 300-305. doi:10.1038/38525. PubMed: 9305847.
- Berner F, Sarasin A, Magnaldo T (1999) Galectin-7 overexpression is associated with the apoptotic process in UVB-induced sunburn keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 11329-11334. doi:10.1073/pnas.96.20.11329. PubMed: 10500176.
- Mourskaia AA, Dong Z, Ng S, Banville M, Zwaagstra JC et al. (2009) Transforming growth factor-beta1 is the predominant isoform required for breast cancer cell outgrowth in bone. *Oncogene* 28: 1005-1015. doi:10.1038/ncr2008.454. PubMed: 19079339.
- Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Wilson JK, Vogelstein B (1990) Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* 249: 912-915. doi:10.1126/science.2144057. PubMed: 2144057.
- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296: 550-553. doi:10.1126/science.1068999. PubMed: 11910072.
- Villeneuve C, Baricault L, Canelle L, Barboule N, Racca C et al. (2011) Mitochondrial proteomic approach reveals galectin-7 as a novel BCL-2 binding protein in human cells. *Mol Biol Cell* 22: 999-1013. doi:10.1091/mbc.E10-06-0534. PubMed: 21289092.
- Petitjean A, Achatz M, Borresen-Dale AL, Hainaut P, Olivier M (2007) TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene* 26: 2157-2165. doi:10.1038/sj.onc.1210302. PubMed: 17401424.
- Kuwabara I, Kuwabara Y, Yang RY, Schuler M, Green DR et al. (2002) Galectin-7 (PIG1) exhibits pro-apoptotic function through JNK activation and mitochondrial cytochrome c release. *J Biol Chem* 277: 3487-3497. doi:10.1074/jbc.M109360200. PubMed: 11706006.
- Cho SY, Park SJ, Kwon MJ, Jeong TS, Bok SH et al. (2003) Quercetin suppresses proinflammatory cytokines production through MAP kinases and NF-kappaB pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophage. *Mol Cell Biochem* 243: 153-160. doi:10.1023/A:1021624520740. PubMed: 12619901.
- Natarajan K, Singh S, Burke TR Jr., Grunberger D, Aggarwal BB (1996) Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9090-9095. doi:10.1073/pnas.93.17.9090. PubMed: 8799159.
- Scian MJ, Stagliano KE, Anderson MA, Hassan S, Bowman M et al. (2005) Tumor-derived p53 mutants induce NF-kappaB2 gene expression. *Mol Cell Biol* 25: 10097-10110. doi:10.1128/MCB.25.22.10097-10110.2005. PubMed: 16260623.
- Weisz L, Damalas A, Liontos M, Karakaidos P, Fontemaggi G et al. (2007) Mutant p53 enhances nuclear factor kappa B activation by tumor necrosis factor alpha in cancer cells. *Cancer Res* 67: 2396-2401. doi:10.1158/0008-5472.CCR-06-2425. PubMed: 17363555.
- Schneider G, Henrich A, Greiner G, Wolf V, Lovas A et al. (2010) Cross talk between stimulated NF-kappaB and the tumor suppressor p53. *Oncogene* 29: 2795-2806. doi:10.1038/onc.2010.46. PubMed: 20190799.
- Karin M (2006) Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 441: 431-436. doi:10.1038/nature04870. PubMed: 16724054.
- Bidard FC, Conforti R, Boulet T, Michiels S, Delaloge S et al. (2007) Does triple-negative phenotype accurately identify basal-like tumour? An immunohistochemical analysis based on 143 'triple-negative' breast cancers. *Ann Oncol* 18: 1285-1286. doi:10.1093/annonc/mdm360. PubMed: 17675400.

33. Joerger AC, Fersht AR (2008) Structural biology of the tumor suppressor p53. *Annu Rev Biochem* 77: 557-582. doi:10.1146/annurev.biochem.77.060806.091238. PubMed: 18410249.
34. Lehman TA, Modali R, Boukamp P, Stanek J, Bennett WP et al. (1993) p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis* 14: 833-839. doi:10.1093/carcin/14.5.833. PubMed: 8504475.
35. Bullock AN, Henckel J, Fersht AR (2000) Quantitative analysis of residual folding and DNA binding in mutant p53 core domain: definition of mutant states for rescue in cancer therapy. *Oncogene* 19: 1245-1256. doi:10.1038/sj.onc.1203434. PubMed: 10713666.
36. Hainaut P, Hollstein M (2000) p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res* 77: 81-137. PubMed: 10549356.

Figure S1

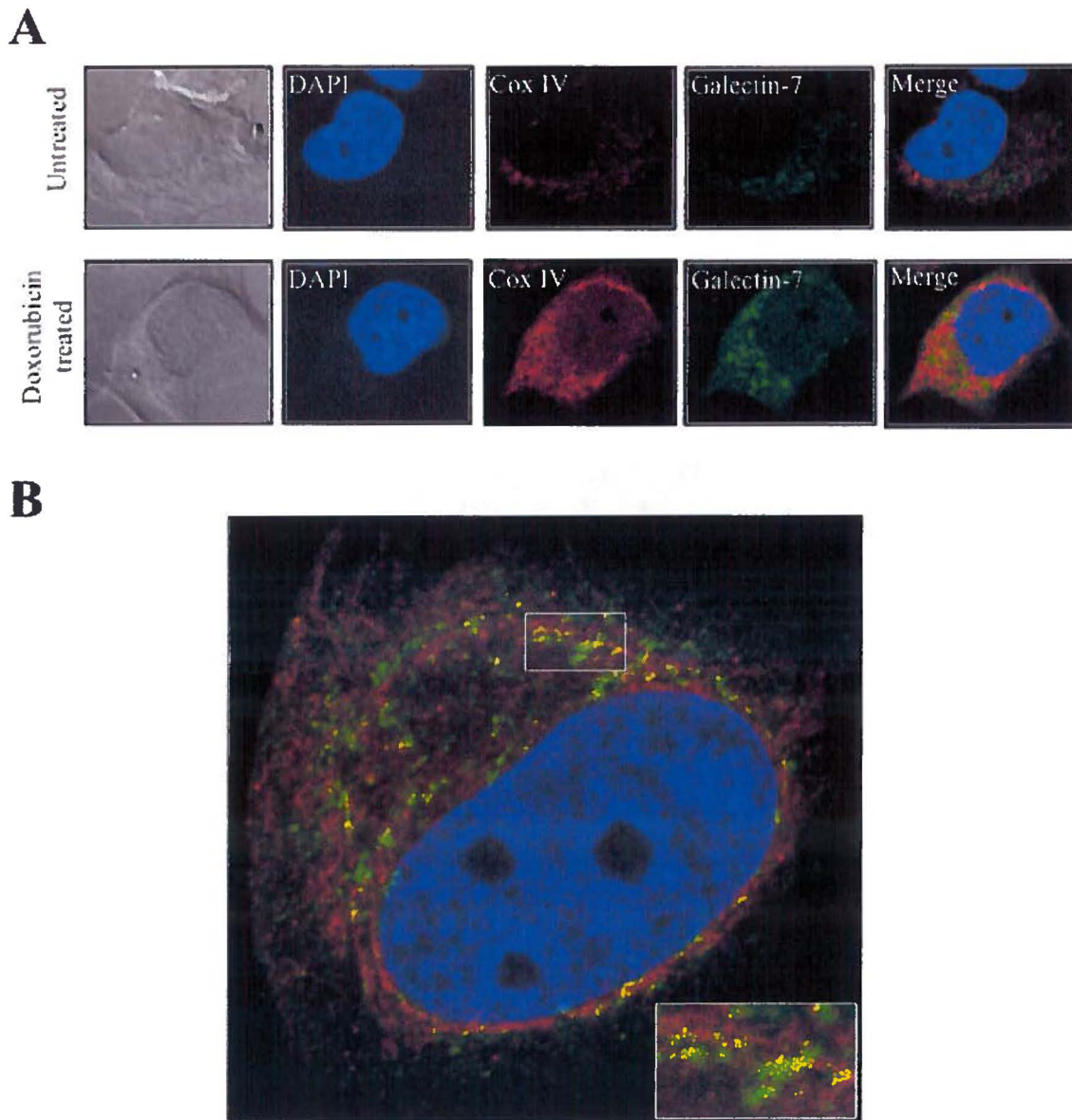


Figure S1: Intracellular localization of galectin-7 in MCF-7 cells treated with doxorubicin. (A) Confocal images showing intracellular expression of galectin-7 in MCF-7 treated with doxorubicin as compared to control cells. A goat anti-human galectin-7 (ref fluorescence) or a rabbit anti-human COX-IV (red fluorescence) antibodies were used in combination with an Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-goat IgG or an Alexa Fluor 568-conjugated goat anti-rabbit IgG to detect endogenous galectin-7 or COX-IV respectively. Nuclei were stained with DAPI (blue fluorescence). (B) Co-localization of galectin-7 and COX-IV in MCF-7 cells treated with doxorubicin. Galectin-7 is shown in green, COX-IV in red, nuclei in blue and co-localization in yellow.

Figure S2

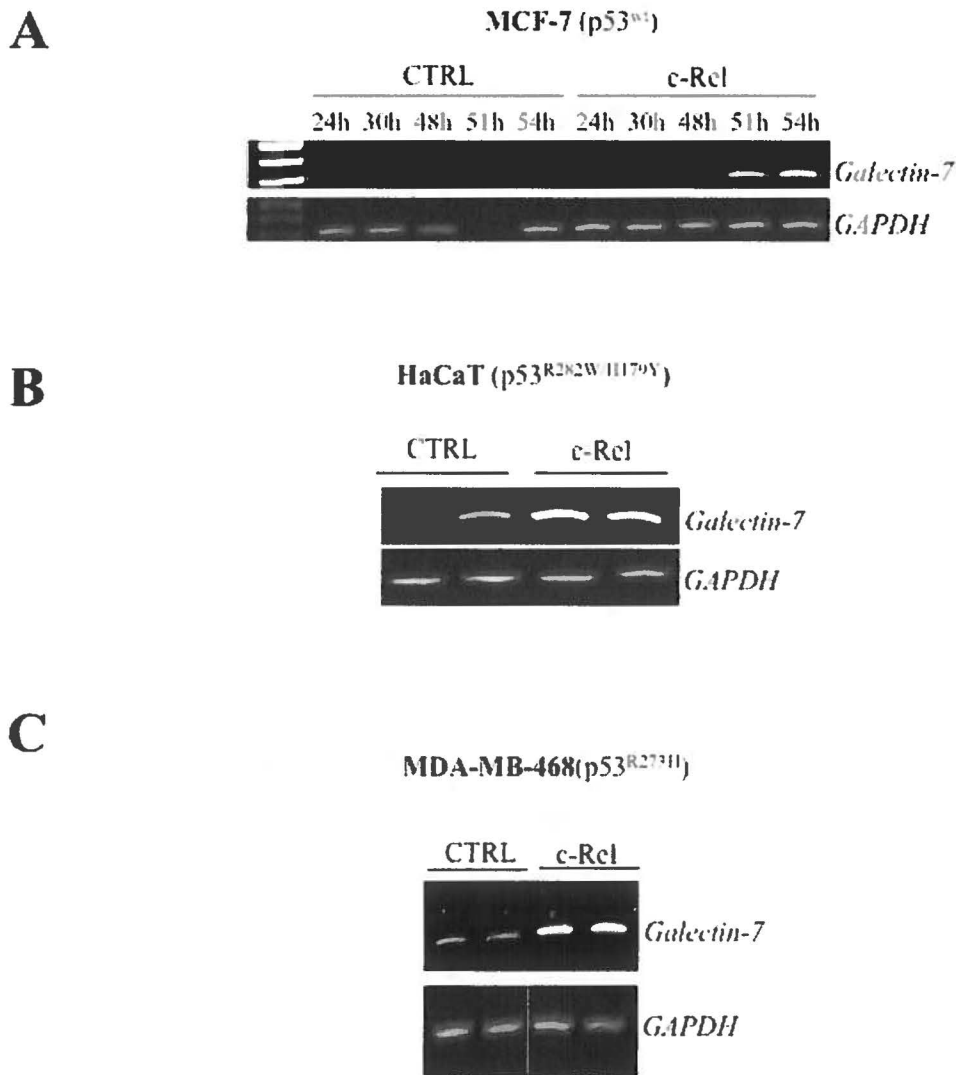
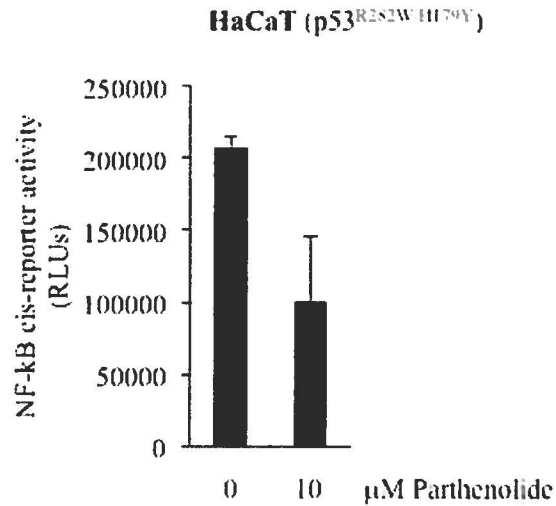


Figure S2: c-rel induces *galectin-7* expression. *Galectin-7* mRNA levels in (A) MCF-7, (B) HaCaT and (C) MDA-MB-468 cell lines following transfection with a reporter vector encoding c-Rel. An empty pCDNA3.1 vector was used as control (CTRL) and GAPDH was used as loading control

Figure S3

A



B

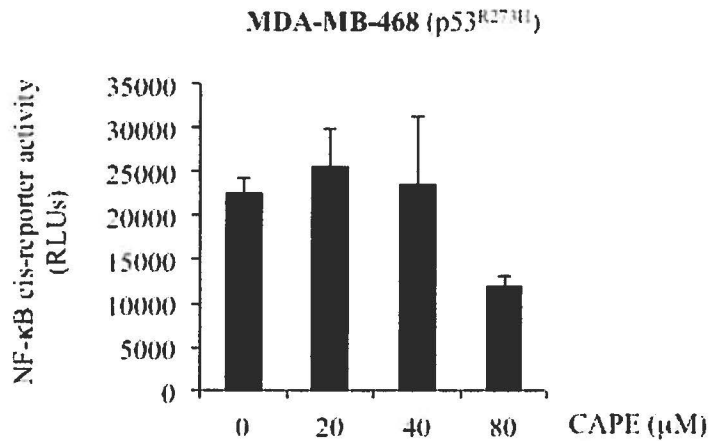


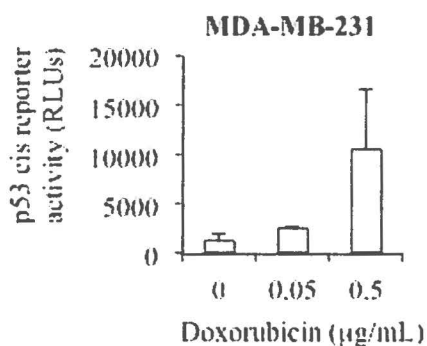
Figure S3: The effect of parthenolide and CAPE on NF-κB activity. (A) Treatment of HaCaT cells with parthenolide reduced NF-κB reporter activity. Transfection efficiency was normalized by co-transfection of a β-galactosidase reporter vector. (B) Dose-dependent inhibition of NF-κB reporter activity in MDA-MB-468 cells treated with CAPE. Transfection efficiency was normalized by co-transfection of a β-galactosidase reporter vector.

Figure S4

A



B



C

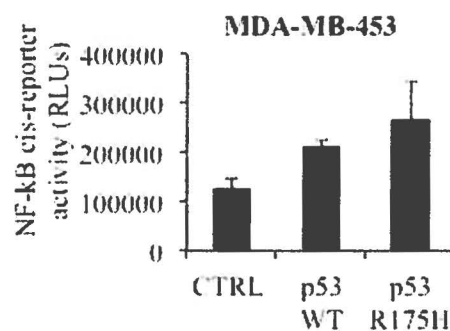
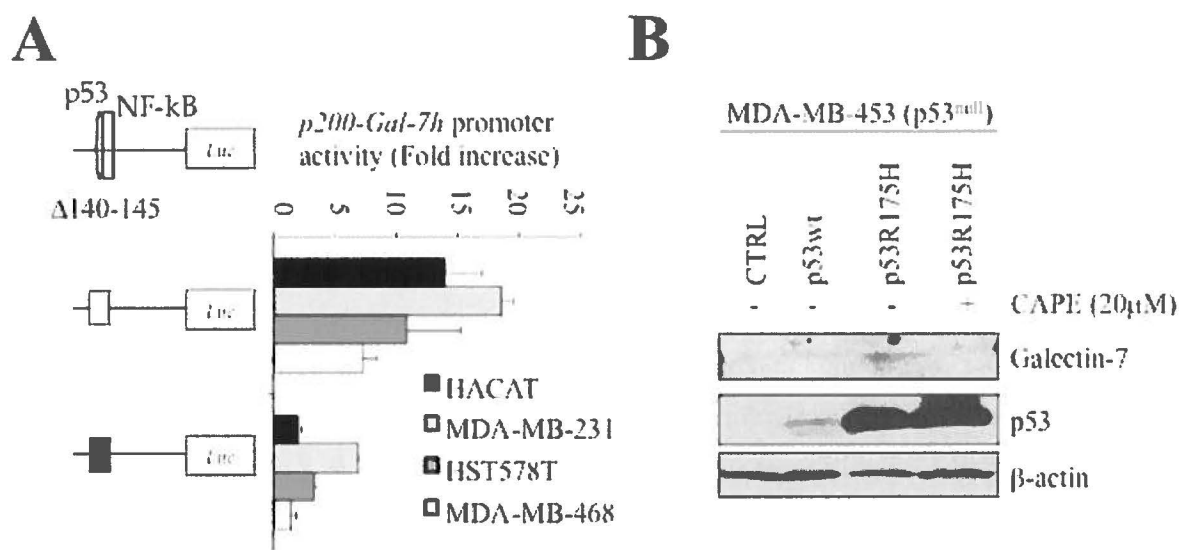


Figure S4: (A) Galectin-7 and p53 protein levels in breast cancer cell lines and HaCaT cells. β-actin was used as loading control. (B) Effect of increasing doses of doxorubicin on p53 reporter activity in MDA-MB-231. Transfection efficiency was normalized using a β-galactosidase reporter vector. (C) Increased NF-κB reporter activity in MDA-MB-453(p53-null) cells 24h following transfection with an expression vector encoding p53wt or mutant p53^{R175H}. An empty pCDNA3.1 vector was used as a control (CTRL). Transfection efficiency was normalized by co-transfection with a β-galactosidase reporter vector.

Figure S5



C

Cell lines used in this study	p53 status	NF-κB activity	Galectin-7 expression
1 : MCF-7	Wild-type	low	weak
2 : MDA-MB-231	R250K	low	No
3 : MDA-MB-453	null	high	No
4 : MDA-MB-468	R273H	high	High
5 : HaCat	H179Y-R282W	high	High

p53 variant used in this study	Structural region	Folded state (at 37°C)*	Effect on DNA binding activity*	Effect on <i>galectin-7</i> mRNA expression in cell lines		
				1	2	3
Wild type	-	Native	-	↑	↑	↑
R175H	Zinc	Globally denatured	-	↑	↑	↑
R273H	DNA-binding	Native	-	↑	↑	No effect
R248W	DNA-binding	Distorted	-	↑	NT	NT
R249S	DNA-binding	Distorted	-	No effect	NT	NT
V143A	β-sandwich	Globally denatured	-	No effect	NT	NT

NT: Not Tested
 *These data were detailed on the studies Brazda et al., *BHRC* 351 (2006) 499-506 and Bullock et al., *Oncogene* (2000) 19: 1245-1256

Figure S4: (A) Effect of a mutation in the DNA binding site of p53 and NF-κB (Δ140-145) on the activity of the human *galectin-7* promoter. (*p200-Gal-7h*). Activity of the *galectin-7* promoter was measured by a luciferase assay. Transfection efficiency was normalized using a β-galactosidase reporter vector. (B) Inhibition of galectin-7 protein levels by CAPE in a p53 null MDA-MB-453 cells transfected with the expression vector encoding p53wt, p53^{R175H} or with the (empty) pCDNA3.1 control vector (CTRL). GAPDH was used as loading control. (C) Overview of the expression of various mutants p53 in different cell lines and their effect on galectin-7 expression.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE 2

Dans cette étude, nous avons démontré qu'à la fois p53 de type sauvage et muté pouvaient induire galectine-7 dans les cellules du cancer du sein. Nos résultats permettent d'éclaircir pourquoi galectine-7 est constitutivement exprimée dans les cellules cancéreuses. Ces résultats ajoutent de nouvelles questions à propos du rôle de galectine-7 induite par p53 de type sauvage ou muté. Nos résultats supportent le concept que galectine-7 ne peut pas être seulement considérée comme une protéine pro-apoptotique. Le rôle biologique de galectine-7 serait dépendant des interactions fonctionnelles avec d'autres gènes induits par p53 et/ou NF- κ B. Cette hypothèse serait consistante avec les niveaux élevés de galectine-7 qui ont été observés dans les tissus du cancer du sein où les mutants p53 sont fréquemment retrouvés. Des investigations futures seront nécessaires pour déterminer comment la fonction biologique de galectine-7 est modulée par les interactions entre p53 et NF- κ B.

CHAPITRE 3

RÉSUMÉ DU CHAPITRE 3

Galectine-7 a été généralement considérée comme un gène sous le contrôle de p53. Paradoxalement, une expression élevée de galectine-7 a été reportée dans plusieurs types de cancers présentant une absence d'expression fonctionnelle de p53. C'est spécialement vrai pour le cancer du sein où une expression anormale de galectine-7 est exclusivement retrouvée dans les sous-types basaux et dans les lignées cellulaires présentant un phénotype basal. Ces observations suggèrent que d'autres facteurs de transcription contribueraient à induire galectine-7 dans les cellules du cancer du sein. Dans cette étude, nous avons examiné le rôle du facteur C/EBP β dans l'induction de l'expression de galectine-7. Les membres de la famille C/EBP β contribuent au cancer du sein en contrôlant l'expression de gènes impliqués dans l'invasion, la prolifération cellulaire, la survie et l'apoptose. Une attention particulière a été portée pour l'isoforme C/EBP β -2 qui est considérée comme la plus transcriptionnellement active parmi les autres isoformes de C/EBP β . Nos résultats ont démontré que l'expression ectopique de l'isoforme C/EBP β -2 dans plusieurs lignées cellulaires de carcinomes mammaires humains était suffisante pour induire l'expression en ARNm et en protéine de galectine-7. Nous avons identifié un site consensus pour le facteur C/EBP dans le promoteur de *galectine-7* qui semble être requis pour la transcription basale de ce gène. Une analyse par immunoprécipitation de la chromatine montre aussi que C/EBP β -2 se lie au promoteur endogène humain de *galectine-7*. De façon intéressante, nous avons observé que la liaison de C/EBP β -2 sur le promoteur de *galectine-7* déplaçait la sous-unité p50 de NF- κ B attachée sur un site adjacent. Dans l'ensemble, nos résultats identifient une nouvelle voie de régulation pour l'expression de galectine-7 dans les cellules du cancer du sein. Ces données établissent aussi que C/EBP β est un important médiateur de l'expression du gène *galectine-7* dans les cellules du cancer du sein et révèlent les différents mécanismes transcriptionnels qui contrôlent *galectine-7* dans les cellules cancéreuses.

**The CCAAT/enhancer-binding protein beta-2
isoform (CEBP β -2) upregulates galectin-7 expression
in human breast cancer cells**

Carole G. Champion¹, Marilyne Labrie¹, Andrée-Anne Grosset¹, and Yves St-Pierre^{1*}

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

*To whom correspondence should be addressed: Yves St-Pierre, INRS-Institut Armand-Frappier, University of Quebec, 531 Boul. Des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7.

Phone: 450-686-5354; Fax: 450-686-5501; E-mail: yves.st-pierre@iaf.inrs.ca

Keywords: Galectin-7, C/EBP β , NF- κ B, breast cancer

ABSTRACT

Galectin-7 is considered a gene under the control of p53. However, elevated expression of *galectin-7* has been reported in several forms of cancer harboring an inactive p53 pathway. This is especially true for breast cancer where *galectin-7* expression is readily expressed in a high proportion in basal-like breast cancer tissues, conferring cancer cells with increased resistance to cell death and metastatic properties. These observations suggest that other transcription factors are capable of inducing *galectin-7* expression. In the present work, we have examined the role of CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBP β) in inducing expression of *galectin-7*. C/EBP proteins have been shown to contribute to breast cancer by upregulating pro-metastatic genes. We paid a particular attention to C/EBP β -2 (also known as LAP2), the most transcriptionally active of the C/EBP β isoforms. Our results showed that ectopic expression of C/EBP β -2 in human breast cancer cells was sufficient to induce expression of *galectin-7* at both the mRNA and protein levels. *In silico* analysis further revealed the presence of an established CEBP element in the *galectin-7* promoter. Mutation of this binding site abolished the transcriptional activity of the *galectin-7* promoter. Chromatin immunoprecipitation analysis confirmed that C/EBP β -2 binds to the endogenous *galectin-7* promoter. Taken together, our findings identify a new regulatory pathway that regulates *galectin-7* expression. They further establish C/EBP β as an important mediator of *galectin-7* gene activation in breast cancer cells and highlight the different transcriptional mechanisms controlling *galectin-7* in cancer cells.

INTRODUCTION

Galectins constitute a family of lectins defined by shared consensus amino acid sequences and affinity for β -galactose-containing oligosaccharides [1]. In mammals, the distribution of galectins is tissue specific and their expression is developmentally regulated [1,2]. They play an important role in several physiological processes, including embryonic development, wound healing, apoptosis, intercellular adhesion, cell migration, and immune response. They are also involved in a number of pathological conditions, including infectious diseases and cancer. Most of our knowledge on galectins has been obtained while studying *galectin-1* and *galectin-3*. In contrast, *galectin-7* remains an unfamiliar member of the galectin family. This galectin was initially described as a marker of differentiation of stratified

epithelia by Magnaldo and colleagues [3]. Functionally, galectin-7 has been shown to be associated with UVB-induced apoptosis in epidermis since sunburn/apoptotic keratinocytes express abnormally high levels of galectin-7 [4]. In fact, galectin-7 has been considered an apoptosis regulator in many cell systems 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 major function is to control apoptosis [5].

In sharp contrast to the intuitively expected negative roles played by galectin-7 in tumor development, a study by Lu *et al.* reported that galectin-7 was overexpressed in tumors induced in an experimental model of chemically induced mammary carcinomas [6]. This provided the first indication that galectin-7 expression could be modulated in breast cancer. We and others have since shown that galectin-7 is also expressed in breast cancer tissues in humans. For example, genomic profiling data reported by Perou *et al.*, who provided a molecular portrait of human breast tumors from 42 individuals, has revealed that galectin-7 was highly expressed in estrogen receptor (ER)-negative tumors [7]. Subsequent microarray studies examining normal breast luminal and myoepithelial cells by Jones and his colleagues identified *galectin-7* as a myoepithelial-specific gene [8]. We have since confirmed the specific expression pattern of galectin-7 in breast cancer tissues using tissue microarrays (TMAs) constructed from samples obtained from normal individuals and in patients with breast carcinomas [9]. Using preclinical mouse models, we have further shown that high levels of galectin-7 expression in breast cancer cells increase their ability to metastasize to lungs and bones [9].

While a clear picture of the function of galectin-7 in breast cancer is emerging, very little is known about the molecular mechanisms regulating galectin-7 expression in human breast cancer cells. Among the transcription factors that could possibly regulate galectin-7 is CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBP β). Members of the C/EBP β family have been shown to contribute to tumor progression by controlling the expression of genes involved in invasion, cellular proliferation, survival and apoptosis [10-13]. In mammary tissues, this factor has been shown to be critical for normal growth and differentiation of the mammary gland [14-16]. It also contributes to malignant conversion of the human breast [12,17]. Of the three C/EBP β isoforms, a particular attention has been paid to C/EBP β -2 because overexpression of this isoform induces epithelial-mesenchymal transition [18]. A significant increase in C/EBP β is observed in estrogen and progesterone-receptor-negative breast cancer as compared to tumors positive for these receptors. Increased C/EBP β levels also correlate

with metastatic breast cancer and a high tumour grade [12]. In the present work, we have examined whether C/EBP β regulates expression of galectin-7 in breast cancer cells.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and reagents

Breast cancer cell lines were a generous gift from Dr. P. Siegel (the Goodman Cancer Centre, McGill University, Montreal, Qc). Immortalized human keratinocytes (HaCaT) were provided by Dr. Thierry Magnaldo (Université de Nice). All cells were grown in complete medium, and MDA-MB-231, MDA-MB-453 and MDA-MB-468, cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 8% (v/v) FCS, 2 mmol/L L-glutamine and 10 mmol/L HEPES buffer, while 1 mmol/L sodium pyruvate was included for maintenance of MCF-7 cells and 1 mmol/L non-essential amino acids were used with HaCaT cells. All cell culture products were purchased from Life Technologies (Burlington, ON, Canada).

Transient transfection and luciferase assay

Vectors encoding human C/EBP α or β (SC303472 and SC319561; Origene, Burlington, ON) and vectors encoding C/EBP β -2 and C/EBP β -3 (15738 and 15737; Addgene, Cambridge, MA) were obtained commercially. The cDNA encoding the human galectin-7 (provided by Dr. Thierry Magnaldo) was cloned in the *sra* eukaryotic expression vector (kind gift of Dr. François Denis) using SpeI and BamHI restriction sites. Cells were transfected using the Lipofectamine 2000 reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol. For reporter assays, NF- κ B or a C/EBP luciferase reporter vectors (Cat. No. 219078 and 240112 respectively; Stratagene, Santa Clara, CA) were used. The (empty) pCMV5 vector was used as a control. Transfection efficiency was measured using the pCMV/ β -gal reporter vector (Promega, Madison, WI). Luciferase activity was measured using the Luciferase Assay System protocol (Promega) and a luminometer (Lumat LB 9507, Berthold). β -galactosidase activity was detected using a colorimetric enzyme assay using the Luminescent β -Galactosidase Detection Kit II according to the manufacturer's instructions (Clontech Laboratories, Mountain View, CA). Luciferase expression levels were normalized to the levels of β -galactosidase expression.

Western blot analysis

Cells were solubilized in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) lysis buffer (Thermo Fisher Scientific, Ottawa, ON) containing a cocktail of protease inhibitors (Roche, Laval, QC). Equal amounts of protein (25 µg) were separated on SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON). The membranes were first blocked with 5% milk in PBS/0.05% Tween 20 for 1 h and subsequently blotted overnight at 4°C with primary antibodies: rabbit anti-C/EBPβ polyclonal antibody (1:1000; sc-150 (C-19) Santa-Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and mouse anti-β-actin monoclonal antibody (1:20000; Sigma, St-Louis, MO, USA). Secondary antibodies consisted of horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit or anti-mouse (GE Healthcare, Mississauga, ON). The immunoblots were developed using ECL detection reagent (GE Healthcare).

Confocal microscopy

Cells were cultured onto glass coverslips to semi-confluency. After 24 h of transfection with vector encoding C/EBPβ-2, cells were washed with cold PBS, fixed with 3% paraformaldehyde in PBS and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS and blocked with 1% BSA in PBS (PBA) for 30 min. Cells were first incubated overnight at 4°C with a goat anti-human galectin-7 polyclonal antibody (1:100; R&D Systems, Minneapolis, MN) with PBA. After several washes, cells were incubated with an Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-goat IgG (1:500; Life Technologies) for 1 h at room temperature. Samples were mounted using the ProLong gold antifade reagent together with 4'-6-diamino-2-phenylindole (DAPI) (Life Technologies) on glass slides and visualized using a Zeiss LSM780 laser scanning microscope (Carl Zeiss Microimaging, Thornwood, NY).

RNA Isolation and RT-PCR

Total cellular RNA was isolated from cells using the TRIzol reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNA was prepared from 2 µg of cellular RNA in a total reaction volume of 20 µL using the reverse transcriptase Omniscript (QIAGEN, Mississauga, ON, Canada). After reverse transcription, human *galectin-7* (gene ID 3963, sense primer: 5'- ACC AAC CCG GTC CCA G -3' and antisense primer: 5'- GCG GGC TAA CGC TTT ATT TGC -3') and *GAPDH* (gene ID 2597, sense primer: 5'- CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3' and antisense primer: 5'-CAG AAG TGG TGG TAC CTC TTC CGA -3') cDNAs were amplified using the following conditions: 94°C for 3 min, followed by 35 cycles of the following: 94°C for 1 minute, 60°C for 1 minute, and 72°C

for 1 minute, followed by a final extension step at 72°C for 10 minutes. PCR was performed in a thermal cycler (MJ Research, Watertown, MA). The amplified products were analyzed by electrophoresis using 1.5% agarose gels and SYBR Safe DNA gel (Invitrogen) staining and UV illumination.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

ChIP assays were performed using the EZ-Chromatin-Immunoprecipitation Assay Kit (Millipore, Billerica, MA). For this purpose, MCF-7 cells were grown overnight in 100-mm dishes to ~ 60-70% confluency and then transfected with either the empty pCMV5 control vector or vectors encoding C/EBP β -2 or C/EBP β -3 using Lipofectamine 2000 reagent. Cells were fixed in 1% paraformaldehyde. Nuclei were isolated, sonicated, and pre-cleaned with protein G agarose/salmon sperm DNA. The pre-cleaned chromatin solution was either set aside as input DNA or incubated with anti-NF- κ B/p50 (Cat. No. 06-886; Millipore) or anti-C/EBP β (C-19, sc-150; Santa-Cruz Biotechnology) on a rotation platform at 4°C overnight. Input DNA and mouse IgG-pulled DNA were used as controls for all the experiments. After reversal of the cross-linking, DNA was purified from the immune complex and amplified using PCR primers specific for the *galectin-7* promoter region encompassing +1 to -200 bp: sense: 5'-CCT GGG TGA TGG GGG GAT CAGG -3' and antisense: 5'-CCA TGT CCG TGA GTG CTC CAG GG-3'. The samples were incubated for 3 min at 94°C, followed by 40 cycles as follows: 1 min at 94°C, 1 min at 62°C, and 1 min at 72°C, with a final extension at 72°C for 10 min.

Scratch wound healing assay

Confluent monolayers were obtained by seeding 3×10^5 cells onto 6-well glass bottom culture plates (MatTek Corporation, Ashland, MA). Cells were transfected with vectors encoding specific cDNA using the Lipofectamine 2000 reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol. After 24h, a scratch with a pipet tip was made in the cell monolayer, followed by washing with PBS to remove cell debris. The plates were moved to an incubator PM S1 and migration was visualized with a Carl Zeiss LSM780 confocal microscope (Carl Zeiss). Images were captured every 10 min for 2 h. For each cell type, the movement of 30 or 60 different cells was measured. Cell movement was analyzed using the Image J plugins manual tracking and chemotaxis tool.

RESULTS

C/EBP β -2 induces galectin-7 expression in breast cancer cell lines

We first set out to determine if the C/EBP β -2 isoform could induce *galectin-7* gene expression in human breast cancer cell lines. Using semi-quantitative RT-PCR, we found that *galectin-7* mRNA increased in all cell lines tested following transfection of a vector encoding the C/EBP β -2 isoform (Figure 1A). This expression by C/EBP β -2 was independent of the p53 status of the cells. It was observed in cells expressing a wild-type form of p53, such as MCF-7, or in cells harboring an inactive p53 pathway, such as the p53^{null} MDA-MB-453, or MDA-MB-231, which express the p53^{R280K} mutant allele. It was also found in HaCaT cells, which express the transcriptionally inactive TP53^{H179Y/R282W} alleles. In all cases, *de novo* expression of *galectin-7* was induced following transfection of a vector encoding C/EBP β -3 (also known as LIP). This increased expression of *galectin-7* by C/EBP β -2 was also dose-dependent (Figure 1B). C/EBP β -3, which lacks the N-terminal transactivation domains but represses the transcription activity of other C/EBPs by competing for C/EBP consensus binding sites or by forming inactive heterodimers with other C/EBPs [12,19], did not repress the constitutive expression of *galectin-7* in MDA-MB-468 or HaCaT cells, nor did it repress C/EBP β -2-induced *galectin-7* (Figure 1C). The ability of C/EBP β -2 to induce *galectin-7* was also confirmed at the protein level by confocal microscopy in both MDA-MB-231 and MCF-7 cells (Figure 2). Taken together, these results suggest that increased expression of C/EBP β -2 is sufficient to induce *galectin-7* in breast cancer cell lines, and possibly other types of cells.

A C/EBP β consensus site in human *galectin-7* promoter

Using *in silico* computational analysis of the human *galectin-7* promoter region (using the TFSEARCH program), we found eight potential C/EBP binding sites within the proximal 1.5 kb 5' flanking region of the *galectin-7* gene. Using progressive deletion reporter constructs of the 5' flanking region of the *galectin-7* promoter, we found that deletion of the distal C/EBP binding sites did not modulate the transcriptional activity of the promoter as compared to the transcriptional activity of a reporter construct containing the two promoter-proximal C/EBP binding sites located at positions -105/-93 bp and -147/-132 bp (Figure 3A). Mutational analysis showed that a mutation (Δ -103-98) of the C/EBP β binding site located at -105/-93 bp had minimal effect on the transcriptional activity of *galectin-7* promoter compared to the wild-type promoter. On the other hand, disruption of C/EBP β binding site located at position -147/-132 bp (Δ -145-140) resulted in a 2.5-fold decrease in the promoter

activity (**Figure 3B**). A 3.5-fold decrease was observed when both C/EBP β binding sites were disrupted (Δ -145-140/-103-98). These findings provide additional evidence that C/EBP plays an important role in controlling *galectin-7* promoter activity.

Expression of galectin-7 and C/EBP β in epithelial tissues

To further examine whether we could find an association between C/EBP β and galectin-7 expression profiles in epithelial tissues, we looked at the Human Protein Atlas database, which contains high-resolution images showing the spatial distribution of proteins in normal and cancer tissues. We paid a particular attention to epithelial tissues known to express galectin-7 constitutively, including skin, esophagus, oral mucosa and cervical tissues. As expected, immunohistochemistry staining of normal epithelial tissues showed a predominantly nuclear pattern of C/EBP β protein expression while galectin-7 was mostly found in the cytosolic and nuclear compartments (**Figure 4**). In all cases, the distribution of galectin-7 expression co-located with that of C/EBP β . Identical findings were observed in normal mammary tissues where galectin-7 and C/EBP β were both specifically expressed in myoepithelial cells. Using the ONCOMINE public cancer microarray database, we also found that C/EBP β was expressed at significantly higher levels in oestrogen receptor (ER)-negative and triple-negative (TN) breast cancer tissues (**Figure 5**), a pattern identical to that of galectin-7 in human breast cancer tissues (9).

DISCUSSION

Galectin-7 has generally been considered a gene under the control of p53. There is an increasing number of reports, however, showing that galectin-7 is overly expressed in cancer cells, most notably in as esophageal, lung and buccal squamous cell carcinomas, thyroid carcinomas, bladder cancer, lymphoma, and breast cancer [7,20-25]. This is somewhat paradoxical since p53 is often inhibited by mutations within its DNA binding domain that lead to the expression of a transcriptionally inactive p53. Here, we have provided a possible explanation for this paradox. More specifically, we found that increased expression of C/EBP β -2 is sufficient to upregulate galectin-7 expression at both the mRNA and protein levels in breast cancer cells. Such a role for C/EBP β was specific to C/EBP β -2 since C/EBP β -3, another isoform that often acts as a dominant negative factor against C/EBP β -2, could not induce galectin-7 nor did it repress the constitutive expression of *galectin-7* or the C/EBP β -2-

induced galectin-7 expression. The role of C/EBP β -2 as an important transcription factor for galectin-7 is further supported by our mutational analysis showing that mutation in the C/EBP binding motif located at position -147/-132 bp of the *galectin-7* promoter region strongly inhibits its transcriptional activity. It is also supported by data found in public databases, which showed that C/EBP β and galectin-7 have an almost identical distribution pattern in both normal and cancer tissues. Taken together, these results identify a novel regulatory pathway that regulates *galectin-7* expression in human breast cancer cells.

Close examination of a number of public databases supports the view that C/EBP is a positive regulator of *galectin-7* in breast cancer cells. For example, a significant increase in C/EBP β mRNA has been observed in estrogen and progesterone-receptor-negative breast cancer versus those tumors positive for these receptors [26-28]. An increase of C/EBP β mRNA also correlates with metastatic breast cancer and high tumor grade, making it an interesting biomarker for a more aggressive subset of tumors with a poor prognosis [28-30]. Moreover, our preliminary results have shown that transfection of C/EBP β -2 in MCF-7 cells increases their motility (Figure S1). Similar results were obtained when we increased *galectin-7* expression (Figure S2), consistent with our previous findings that high levels of galectin-7 increase metastasis of breast cancer cells to the bone and the lung [9]. Future investigations will be needed to determine whether direct suppression of galectin-7 expression or via specific targeting C/EBP β are valuable alternatives to inhibit breast cancer progression.

Our *in silico* analysis of the human *galectin-7* promoter has revealed some other interesting features, most notably within the C/EBP binding site located at position -147/-132 bp. This site contains an overlapping consensus binding motif for NF- κ B. Overlapping binding motifs for transcription factors are frequently found genome-wide in both eukaryotic and prokaryotic cis-regulatory regions of a gene promoter. Such overlap often results in competitive binding of transcription factors to the overlapping site [20]. Our preliminary investigations on the relevance of the overlap in the consensus binding motifs for C/EBP and NF- κ B at position -147/-132 bp have shown that a mutation (Δ -147-145) in the NF- κ B recognition sequence of the *galectin-7* reporter construct that leaves intact the C/EBP recognition site increased rather than reduced the activity of the promoter (Figure S3). This would suggest that endogenous NF- κ B units, such as transcriptionally inactive p50 complexes, bound to this site hinder binding C/EBP for the same site. This possibility is supported by our results showing that caffeic acid phenethyl ester (CAPE), which prevents NF- κ B binding to DNA, increased C/EBP β -2-induced *galectin-7* expression (Figure S3). The ability of C/EBP β to displace NF- κ B on the *galectin-7* promoter was confirmed by ChIP

analysis which showed that while endogenous p50 is constitutively bound to the *galectin-7* promoter, transfection of C/EBP β -2 displaced the p50 homodimers, leading to a strong activation of *galectin-7* expression. However, in presence of transcriptionally active NF- κ B complexes, containing c-Rel for example, NF- κ B could possibly exert a positive influence of *galectin-7* expression, as we recently showed (32). In other words, *galectin-7* expression in cancer cells with an inactive p53 pathway possibly involves C/EBP and/or NF- κ B. Future investigations will be needed to determine which specific signaling pathway. These observations also consistent with a model where expression of *galectin-7* gene is repressed by transcriptionally inactive p50:p50 homodimers that bind to this overlapping C/EBP β /NF- κ B site on *galectin-7* promoter. During malignant transformation, we envisage that increased expression of C/EBP β -2 or a transcriptionally active NF- κ B complex displaces the p50 homodimers, leading to a strong activation of *galectin-7* expression. Future investigations will be needed to determine how specific signaling pathways can dictate an NF- κ B or C/EBP β response.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by a grant from the Canadian Institutes for Health Research of Canada (CIHR). The authors wish to thank Dr. T. Magnaldo, P. Siegel, and Dr. François Denis for providing reagents and cell lines. They also thank Dr. Louis Gaboury, Dr. Joëlle St-Pierre, and M. Jesse Tremblay for their expert technical advice. C.G.C. is supported by doctoral studentships from the Canadian Institute for Health Research of Canada (CIHR) and M.L. and A.A.G are both supported by the Fonds de la Recherche du Québec-Santé (FRQS).

REFERENCES

1. Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H (1994) Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem* 269: 20807-20810.
2. Kasai K, Hirabayashi J (1996) Galectins: a family of animal lectins that decipher glycocodes. *J Biochem* 119: 1-8.
3. Magnaldo T, Fowlis D, Darmon M (1998) Galectin-7, a marker of all types of stratified epithelia. *Differentiation* 63: 159-168.
4. Bernerd F, Sarasin A, Magnaldo T (1999) Galectin-7 overexpression is associated with the apoptotic process in UVB-induced sunburn keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 11329-11334.

5. Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B (1997) A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 389: 300-305.
6. Lu J, Pei H, Kaeck M, Thompson HJ (1997) Gene expression changes associated with chemically induced rat mammary carcinogenesis. *Mol Carcinog* 20: 204-215.
7. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, et al. (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406: 747-752.
8. Jones C, Mackay A, Grigoriadis A, Cossu A, Reis-Filho JS, et al. (2004) Expression profiling of purified normal human luminal and myoepithelial breast cells: identification of novel prognostic markers for breast cancer. *Cancer Res* 64: 3037-3045.
9. Demers M, Rose AA, Grosset AA, Biron-Pain K, Gaboury L, et al. (2010) Overexpression of galectin-7, a myoepithelial cell marker, enhances spontaneous metastasis of breast cancer cells. *Am J Pathol* 176: 3023-3031.
10. Pal R, Janz M, Galson DL, Gries M, Li S, et al. (2009) C/EBPbeta regulates transcription factors critical for proliferation and survival of multiple myeloma cells. *Blood* 114: 3890-3898.
11. Ramji DP, Foka P (2002) CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J* 365: 561-575.
12. Zahnow CA (2009) CCAAT/enhancer-binding protein beta: its role in breast cancer and associations with receptor tyrosine kinases. *Expert Rev Mol Med* 11: e12.
13. Zhu S, Yoon K, Sterneck E, Johnson PF, Smart RC (2002) CCAAT/enhancer binding protein-beta is a mediator of keratinocyte survival and skin tumorigenesis involving oncogenic Ras signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 207-212.
14. Robinson GW, Johnson PF, Hennighausen L, Sterneck E (1998) The C/EBPbeta transcription factor regulates epithelial cell proliferation and differentiation in the mammary gland. *Genes Dev* 12: 1907-1916.
15. Seagroves TN, Krnacik S, Raught B, Gay J, Burgess-Beusse B, et al. (1998) C/EBPbeta, but not C/EBPalpha, is essential for ductal morphogenesis, lobuloalveolar proliferation, and functional differentiation in the mouse mammary gland. *Genes Dev* 12: 1917-1928.
16. Seagroves TN, Lydon JP, Hovey RC, Vonderhaar BK, Rosen JM (2000) C/EBPbeta (CCAAT/enhancer binding protein) controls cell fate determination during mammary gland development. *Mol Endocrinol* 14: 359-368.

17. Zahnow CA (2002) CCAAT/enhancer binding proteins in normal mammary development and breast cancer. *Breast Cancer Res* 4: 113-121.
18. Bundy LM, Sealy L (2003) CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBPbeta)-2 transforms normal mammary epithelial cells and induces epithelial to mesenchymal transition in culture. *Oncogene* 22: 869-883.
19. Zahnow CA, Cardiff RD, Laucirica R, Medina D, Rosen JM (2001) A role for CCAAT/enhancer binding protein beta-liver-enriched inhibitory protein in mammary epithelial cell proliferation. *Cancer Res* 61: 261-269.
20. Chen J, He QY, Yuen AP, Chiu JF (2004) Proteomics of buccal squamous cell carcinoma: the involvement of multiple pathways in tumorigenesis. *Proteomics* 4: 2465-2475.
21. Daniel VC, Marchionni L, Hierman JS, Rhodes JT, Devereux WL, et al. (2009) A primary xenograft model of small-cell lung cancer reveals irreversible changes in gene expression imposed by culture in vitro. *Cancer Res* 69: 3364-3373.
22. Demers M, Biron-Pain K, Hebert J, Lamarre A, Magnaldo T, et al. (2007) Galectin-7 in lymphoma: elevated expression in human lymphoid malignancies and decreased lymphoma dissemination by antisense strategies in experimental model. *Cancer Res* 67: 2824-2829.
23. Matsui Y, Ueda S, Watanabe J, Kuwabara I, Ogawa O, et al. (2007) Sensitizing effect of galectin-7 in urothelial cancer to cisplatin through the accumulation of intracellular reactive oxygen species. *Cancer Res* 67: 1212-1220.
24. Rorive S, Eddafali B, Fernandez S, Decaestecker C, Andre S, et al. (2002) Changes in galectin-7 and cytokeratin-19 expression during the progression of malignancy in thyroid tumors: diagnostic and biological implications. *Mod Pathol* 15: 1294-1301.
25. Zhu X, Ding M, Yu ML, Feng MX, Tan LJ, et al. (2010) Identification of galectin-7 as a potential biomarker for esophageal squamous cell carcinoma by proteomic analysis. *BMC Cancer* 10: 290.
26. Gruvberger S, Ringner M, Chen Y, Panavally S, Saal LH, et al. (2001) Estrogen receptor status in breast cancer is associated with remarkably distinct gene expression patterns. *Cancer Res* 61: 5979-5984.
27. Ma XJ, Dahiya S, Richardson E, Erlander M, Sgroi DC (2009) Gene expression profiling of the tumor microenvironment during breast cancer progression. *Breast Cancer Res* 11: R7.
28. Richardson AL, Wang ZC, De Nicolo A, Lu X, Brown M, et al. (2006) X chromosomal abnormalities in basal-like human breast cancer. *Cancer Cell* 9: 121-132.

29. Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, et al. (2005) Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* 436: 518-524.
30. Schuetz CS, Bonin M, Clare SE, Nieselt K, Sotlar K, et al. (2006) Progression-specific genes identified by expression profiling of matched ductal carcinomas in situ and invasive breast tumors, combining laser capture microdissection and oligonucleotide microarray analysis. *Cancer Res* 66: 5278-5286.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. C/EBP β -2 induces *galectin-7* mRNA levels in various breast cancer cell lines.

(A) RT-PCR analysis showing increased expression of *galectin-7* in various human breast cancer cells after transfection with an expression vector encoding C/EBP β -2. The two lanes represent two different samples. No such increase was observed in cells transfected with an expression vector encoding C/EBP β -3. Similar results were obtained with HaCaT cells, a keratinocyte cell line which constitutively express *galectin-7*. An empty pCMV5 vector was used as control (CTRL) and GAPDH was used as loading control. (B) RT-PCR analyses showing expression of *galectin-7* mRNA levels in MCF-7 cells after transfection with increasing doses of an expression vector encoding C/EBP β -2. GAPDH was used as loading control. (C) RT-PCR analysis of MCF-7 cells co-transfected with vectors encoding C/EBP β -2 and C/EBP β -3. Below, control Western blot analysis showing expression of C/EBP β -2 and C/EBP β -3 after transfection. β -actin were used as loading control.

Figure 2. Protein expression of *galectin-7* in breast cancer cell lines. MCF-7 or MDA-MB-231 was transfected with an expression vector encoding C/EBP β -2 before cells fixation and permeabilization. A goat anti-human *galectin-7* polyclonal antibody was used in combination with an Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-goat IgG to detect endogenous *galectin-7* (green). Nuclei were stained with DAPI (blue).

Figure 3. C/EBP β consensus binding site in *galectin-7* promoter. (A) Schematic representation of C/EBP binding sites within the 5' flanking region of the human *galectin-7* gene. A series of 5' deletion constructs of the 1500 bp *galectin-7* promoter region was generated and cloned into the pGL3 Basic luciferase reporter vector. The resulting plasmids were transfected in MCF-7 and MDA-MB-468 cells. Locations of the putative C/EBP binding sites in the promoter, as determined using the TFsearch computational tool, are shown as

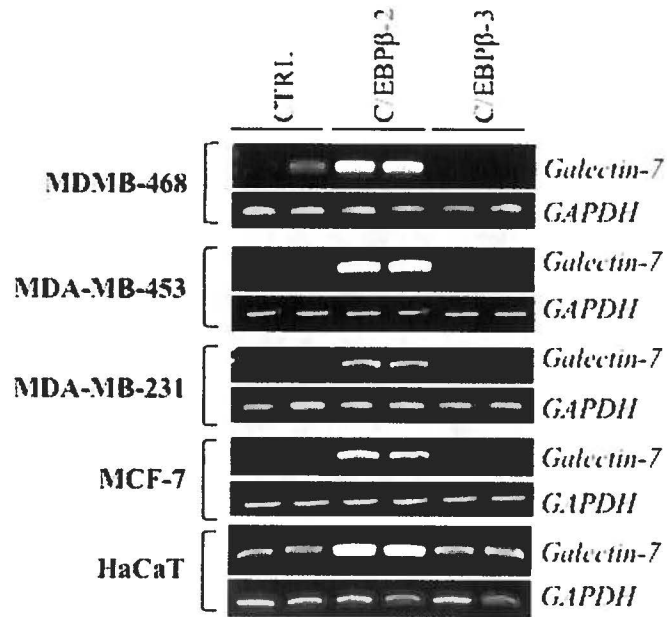
empty boxes. (B) Sequence analysis of the C/EBP binding sites located at positions -105-98 and the -145-140. (C) Mutated constructs of the C/EBP β binding sites on the 200 bp *galectin-7* promoter region were generated and cloned into the pGL3 Basic luciferase reporter vector. The resulting plasmids were co-transfected in MCF-7 cells and were compared to the wild-type *p200-galectin-7* promoter. Transfection efficiency was normalized by co-transfection with a β -galactosidase reporter vector.

Figure 4. Correlation between expression of galectin-7 and C/EBP β in epithelial tissues. Immunohistological analysis of galectin-7 and C/EBP β expression in (A) human normal epithelial tissues and (B) in normal mammary gland tissue and breast carcinoma. Data were provided by the human protein atlas database (<http://www.proteinatlas.org/>) and by [9].

Figure 5. High C/EBP β expression predicts poor outcome in human breast cancer. Data obtained from the OncoPrint cancer microarray database (www.oncoPrint.org) showing higher C/EBP β expression in (A) estrogen receptor (ER)-negative and (B) triple negative (TN) human breast carcinomas.

Figure 1

A



B



C

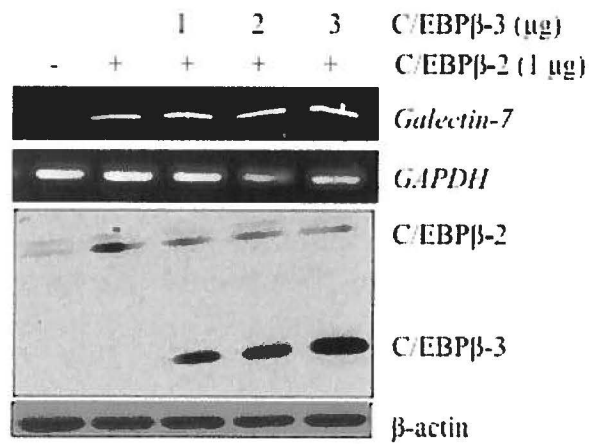


Figure 2

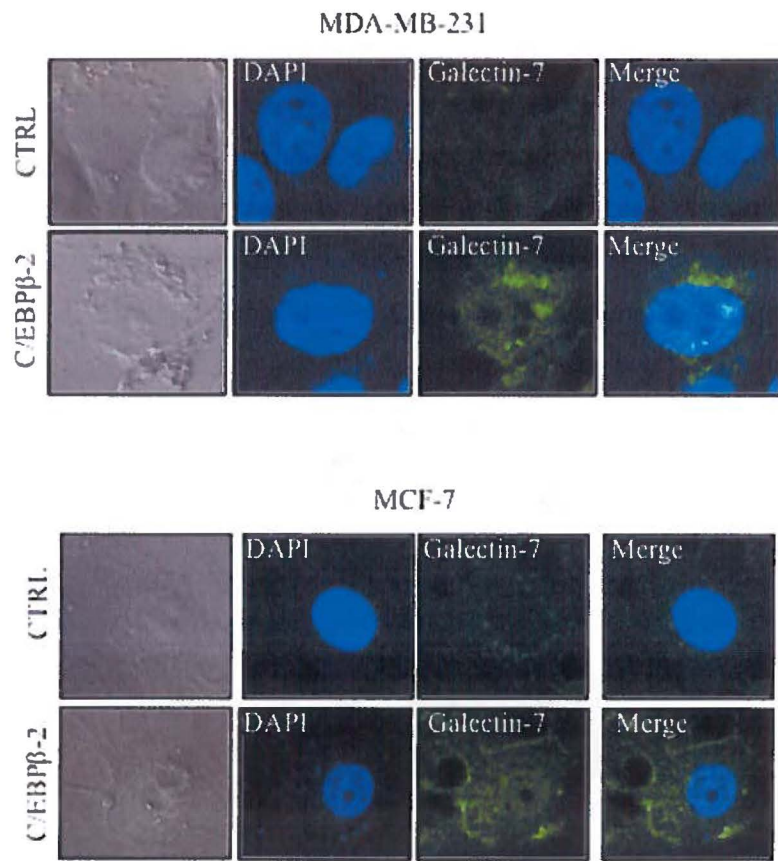
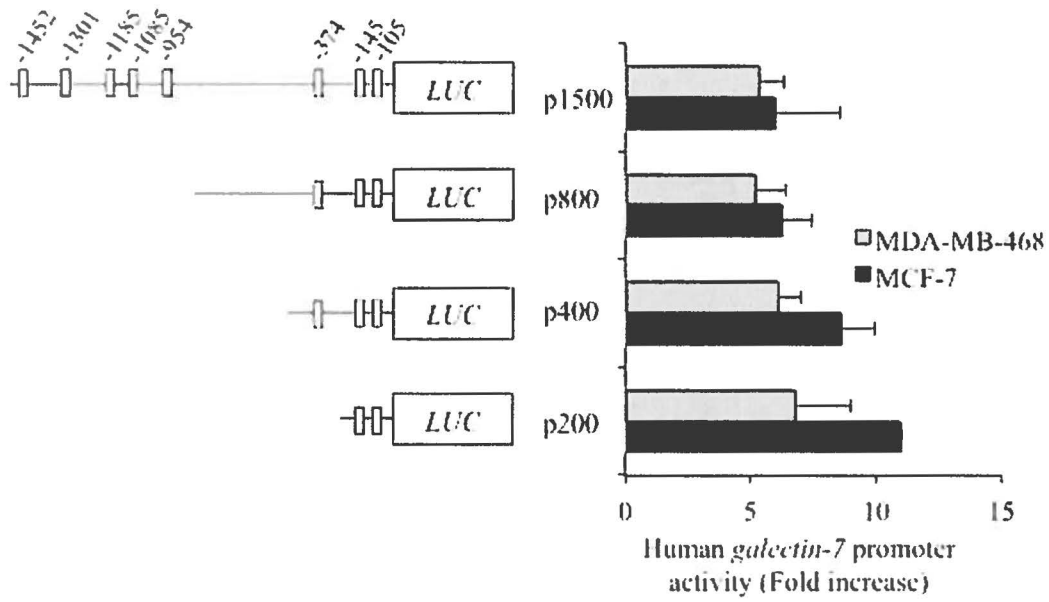
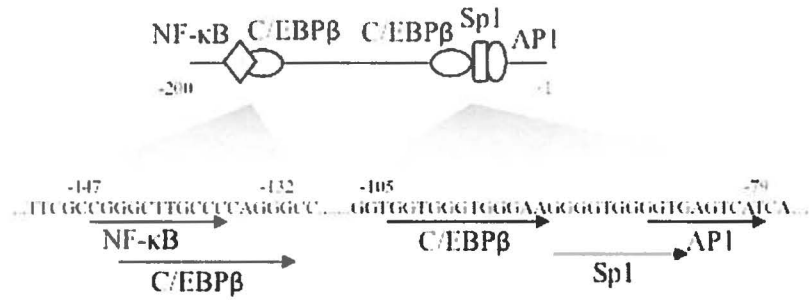


Figure 3

A



B



C

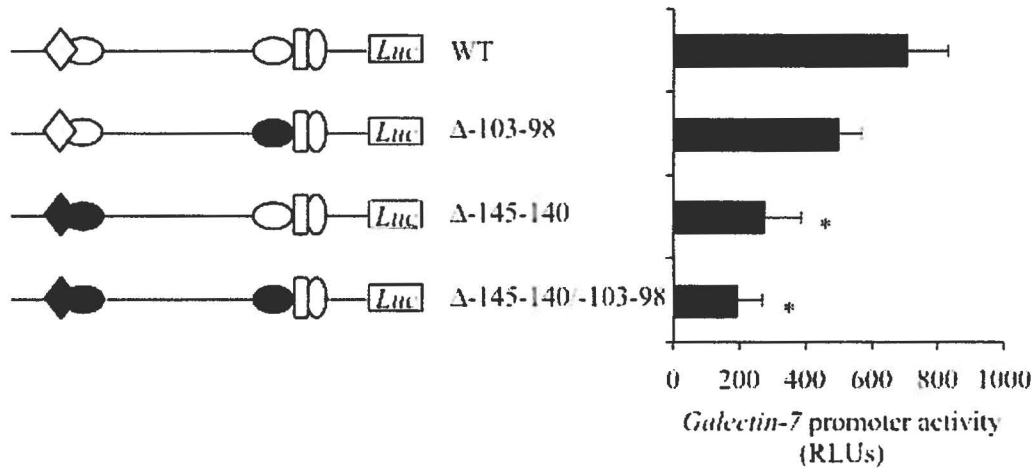
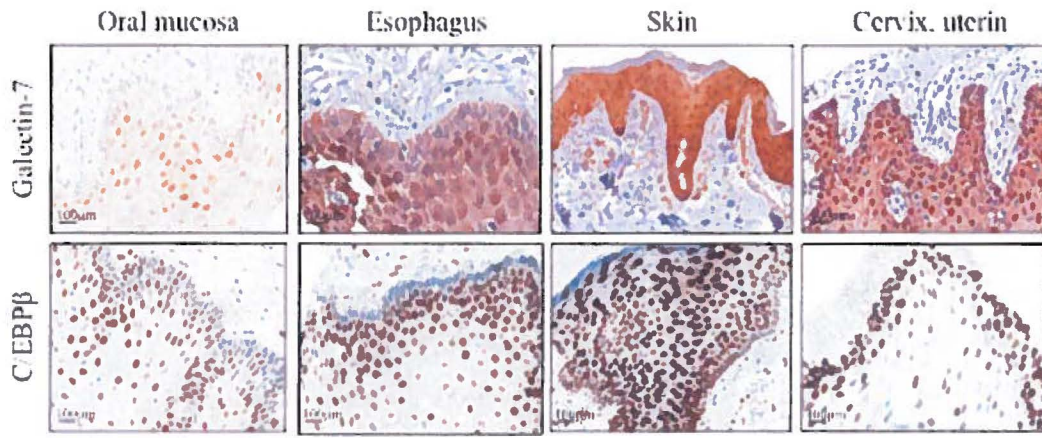


Figure 4

A



B

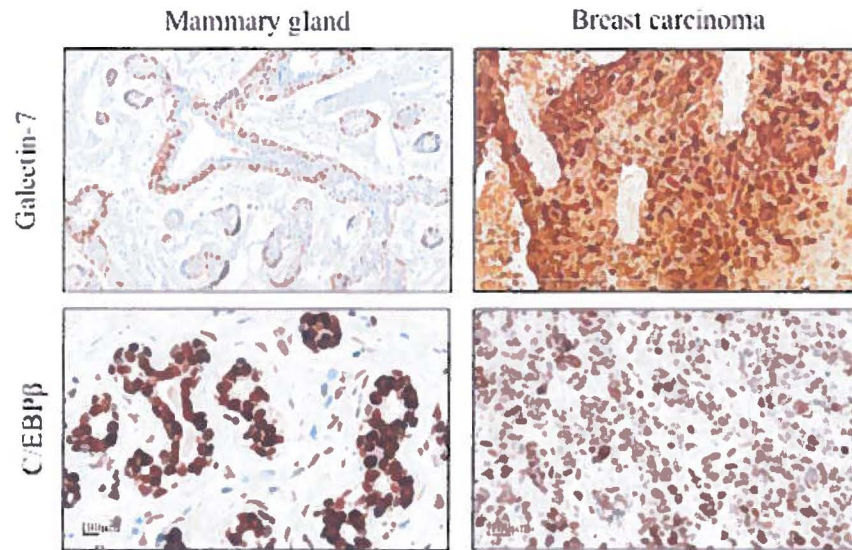
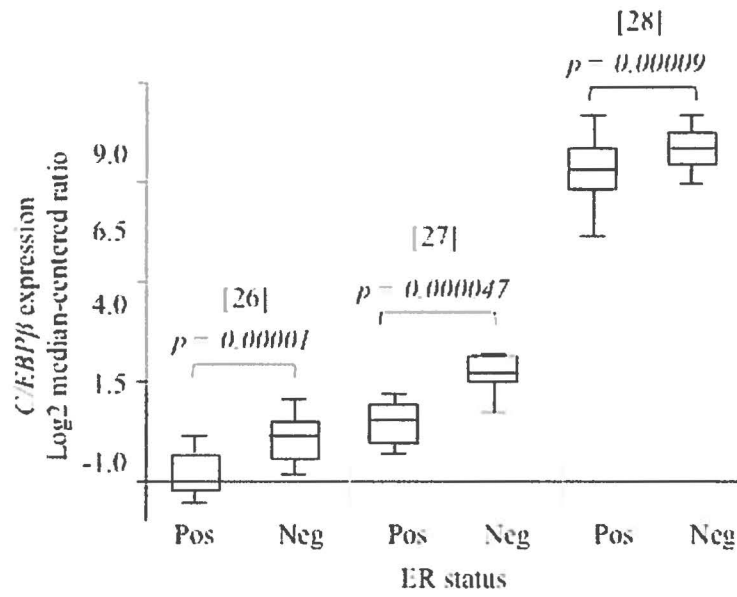


Figure 5

A



B

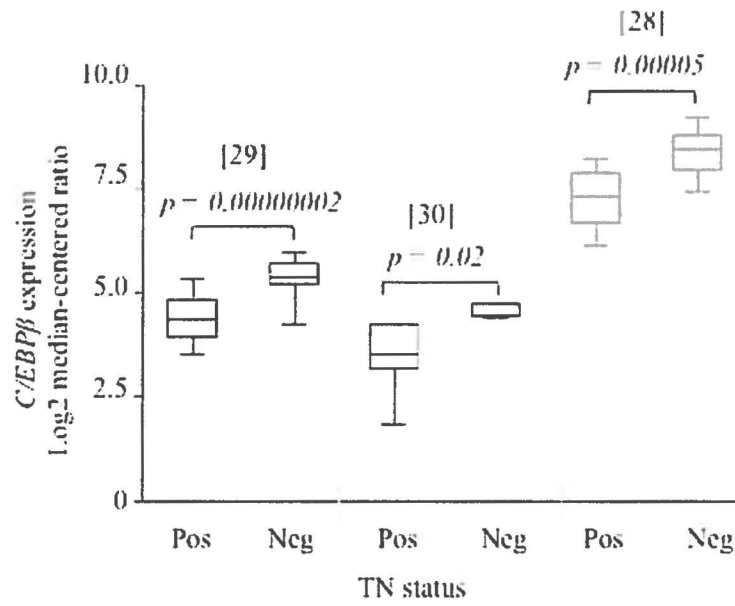


Figure S1

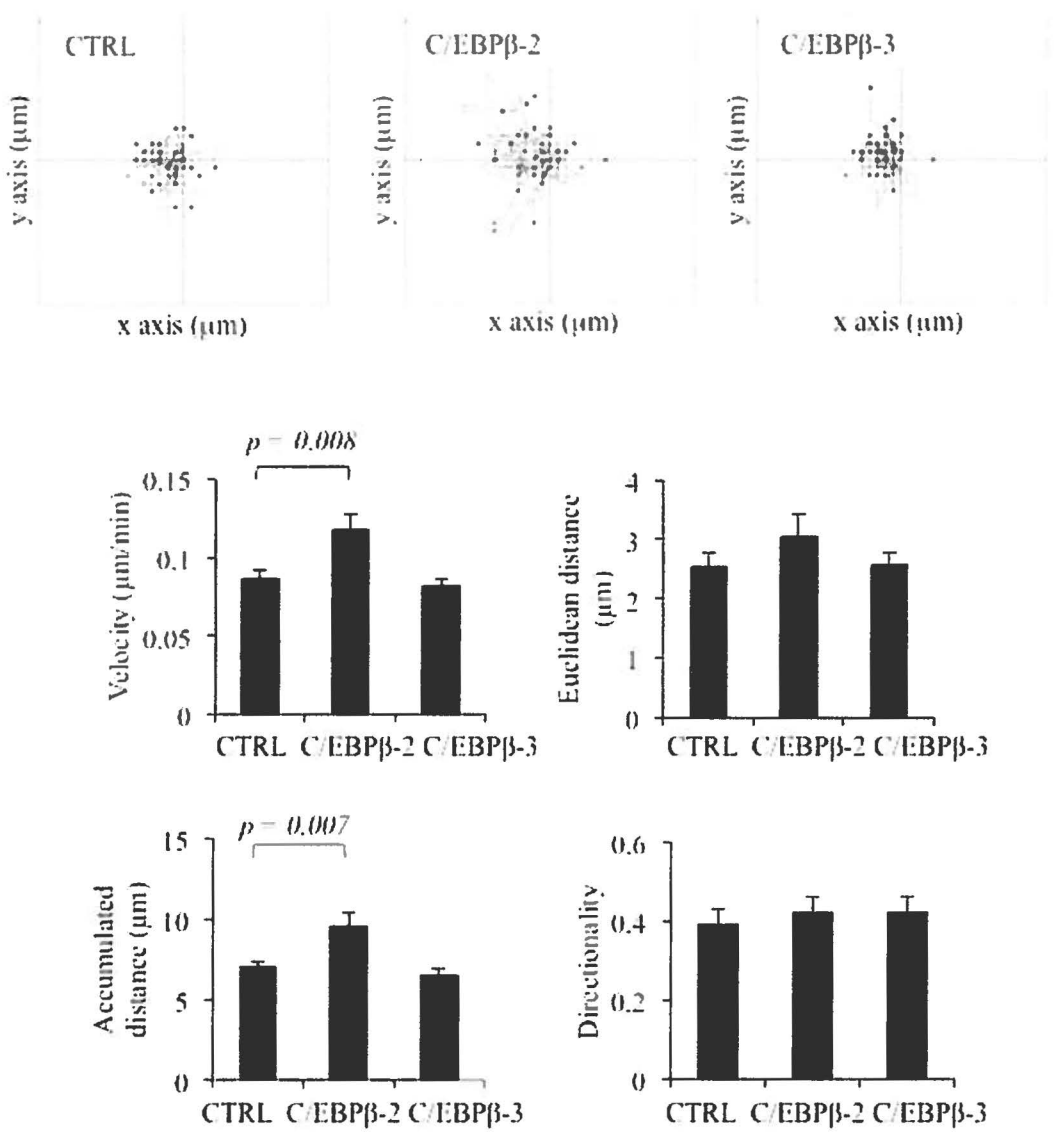


Figure S1. Overexpression of C/EBPβ-2 enhanced migration of MCF-7 cells line. Migration in 6-well plates of MCF-7 cells line transfected with pCMV5 vector (CTRL), C/EBPβ-2 or C/EBPβ-3 cDNA vectors. Plots of 30 cells/sample tracked by live cell imaging are represented. Quantifications of velocity, directionality, accumulated distance and euclidean distance represent mean values ± SEM from all plots.

Figure S2

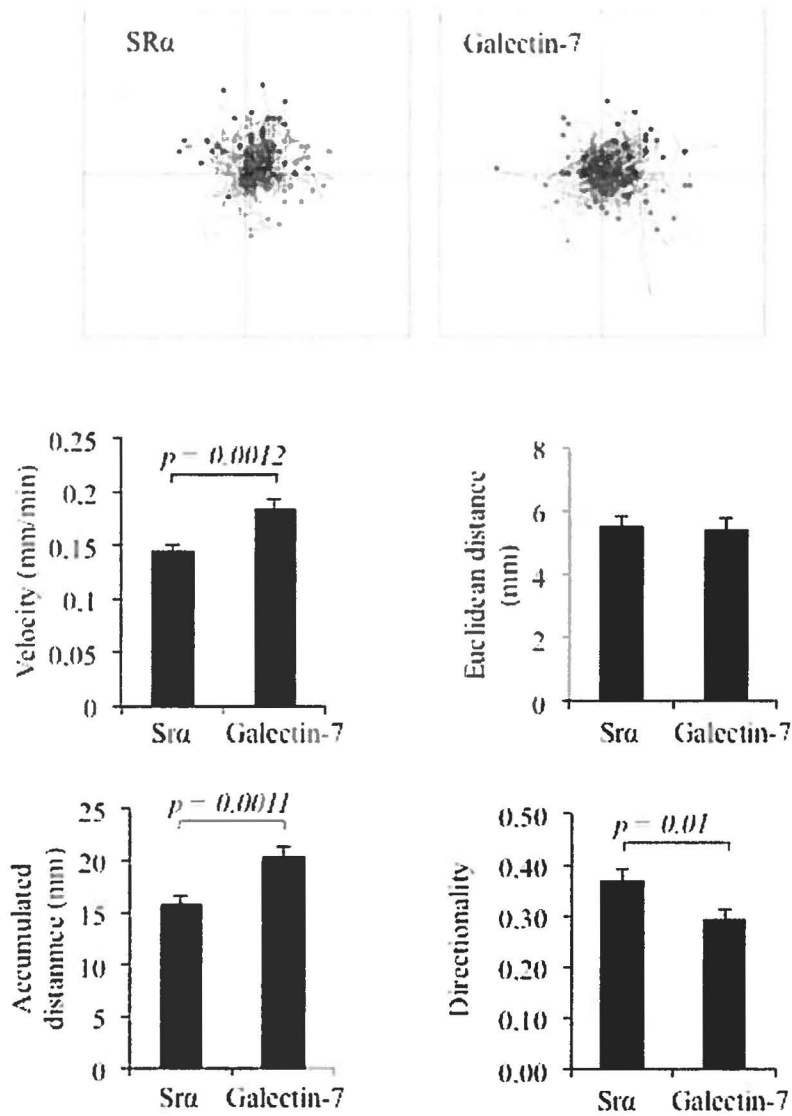


Figure S2. Overexpression of galectin-7 enhanced migration of MCF-7 cells line. Migration in 6-well plates of MCF-7 cells line transfected with Sra or galectin-7 cDNA vectors. Plots of 60 cells/sample tracked by live cell imaging are represented. Quantifications of velocity, directionality, accumulated distance and euclidean distance represent mean values \pm SEM from all plots.

Figure S3

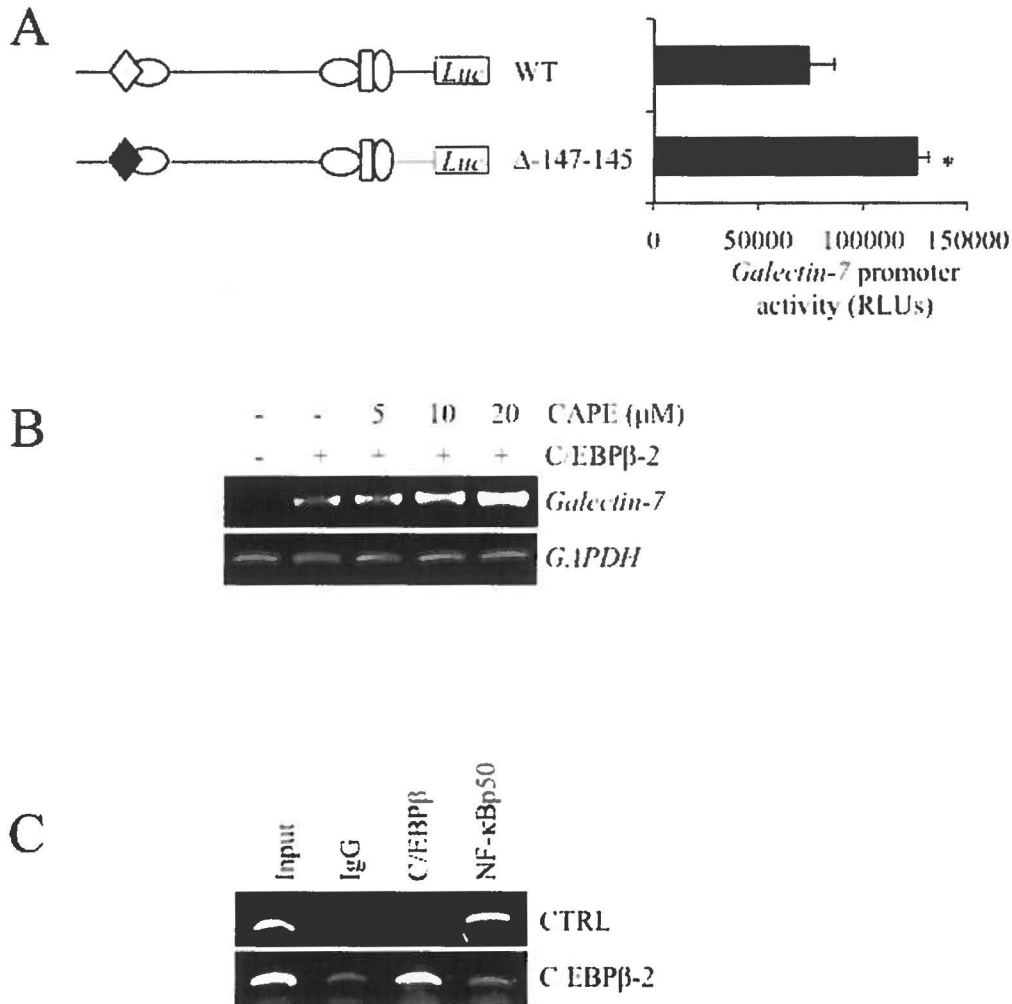


Figure S3. Binding of C/EBPβ and NF-κB on *galectin-7* promoter. (A) Transcriptional activity of the *galectin-7* promoter following a mutation (Δ-147-145) that disrupts the NF-κB binding site located at -148 bp of a luciferase vector encoding a promoter construct of the human *galectin-7* gene. Transfection efficiency was normalized by co-transfection with a β-galactosidase reporter vector. (B) Effect of CAPE on C/EBPβ-2-induced *galectin-7* expression in MCF-7 cells. Expression was measured by semi-quantitative RT-PCR. GAPDH was used as loading control. (C) ChIP analyses showing displacement of the p50 complexes by C/EBPβ-2. Comparative binding of p50 complexes and C/EBPβ on the endogenous *galectin-7* promoter in control cells MCF-7 and cells transfected with an expression vector encoding C/EBPβ-2. Binding to the promoter was measured using anti-p50 and anti-C/EBPβ using genomic DNA. An isotopic antibody (IgG) was used as a negative control. Total DNA extract was used as a positive control (input).

CONCLUSIONS DU CHAPITRE 3

Nos résultats démontrent que le facteur de transcription C/EBP β dont l'expression est altérée dans le cancer du sein, peut induire l'expression de galectine-7. Nous avons donc identifié une nouvelle voie de régulation qui contrôle l'expression de galectine-7 dans les cellules du cancer du sein (Figure 8). Nos résultats permettraient d'expliquer pourquoi galectine-7 est exprimée dans les cellules cancéreuses qui expriment des formes de p53 transcriptionnellement inactives.

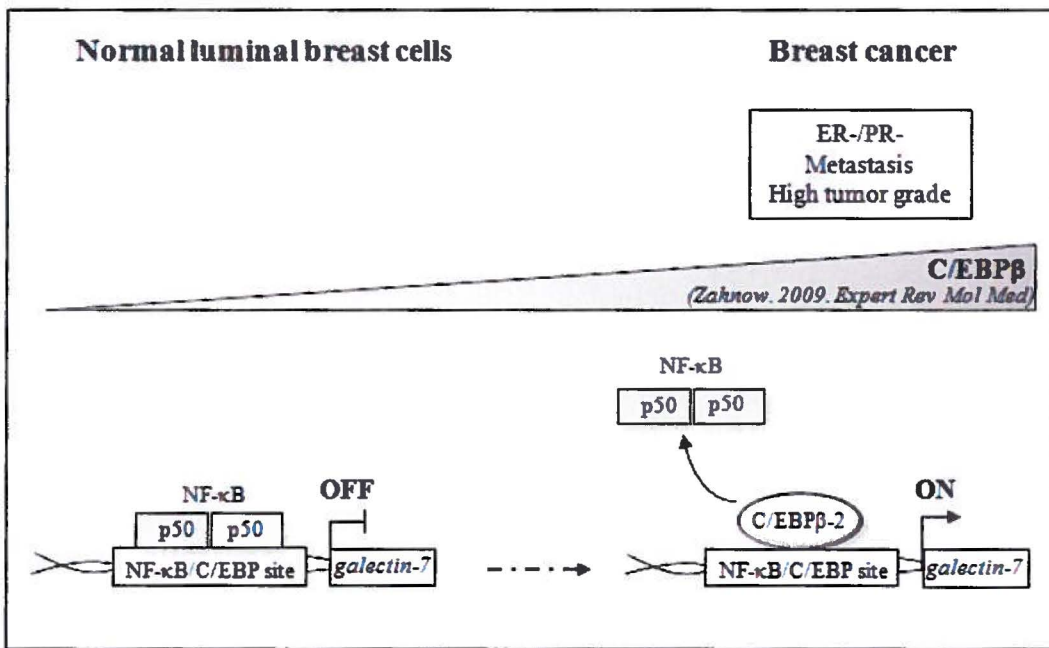


Figure 15. Modèle d'activation transcriptionnelle du promoteur *galectine-7* par C/EBP β -2 durant la progression tumorale. Dans les cellules lumorales normales mammaires, l'expression de *galectine-7* est réprimée transcriptionnellement par des homodimères de NF- κ B p50 qui se lient sur les sites consensus pour C/EBP β et NF- κ B qui se superposent. Durant la transformation maligne, la régulation à la hausse de l'expression du facteur C/EBP β (particulièrement C/EBP β -2) déplace les homodimères de NF- κ B p50 menant à une forte activation de l'expression de *galectine-7*.

CHAPITRE 4
DISCUSSION GÉNÉRALE

1. Identification de mécanismes moléculaires régulant l'expression de *galectine-7* dans le cancer du sein

Bien que plus de 4000 articles ont été publiés sur les galectines, seulement 97 ont étudié *galectine-7*, et plus de la moitié de ces articles ont été publiés au cours des cinq dernières années. Les différentes études sur *galectine-7* confirment que contrairement aux autres membres de cette famille, elle possède un profil d'expression unique, étant spécifiquement exprimée dans les épithéliums stratifiés [230]. Une altération de son expression a aussi été associée dans la progression de certains types de cancer comme le lymphome, le cancer de la thyroïde, du pancréas, de l'ovaire et du sein [186, 194, 198, 200, 239]. Dans le cancer du sein, une expression anormalement élevée de *galectine-7* a été détectée dans les carcinomes mammaires de sous-type basal, un des sous-types ayant le plus mauvais pronostic et pour lequel aucun traitement efficace n'est encore disponible [77, 186]. Dans le but d'identifier les mécanismes moléculaires responsables de son expression anormalement élevée dans le cancer du sein, nous avons démontré que : i) L'expression de *galectine-7* peut être induite par des mutants p53; ii) L'activation transcriptionnelle de *galectine-7* par p53 de type sauvage ou muté requiert NF- κ B; iii) Une autre voie d'activation de *galectine-7* par C/EBP β permettrait d'induire l'expression de ce gène dans le cancer du sein.

Galectine-7 : un gène cible des mutants p53

La régulation de *galectine-7* par p53 de type sauvage ou muté n'est pas unique chez les galectines. Parmi les autres membres de cette famille, il a été démontré que *galectine-3* pouvait être induite par des mutants p53, dont R273H [255]. Par contre, contrairement à *galectine-7* où p53 de type sauvage induit son expression, l'activité du promoteur *galectine-3* est modulée à la baisse lorsque p53 de type sauvage est surexprimé. Étant donné que les facteurs p53 de type sauvage et muté sont impliqués dans des fonctions opposées, il est étonnant qu'ils puissent activer un même gène comme dans le cas de *galectine-7*. Le gène *EGFR* est un autre exemple de cette situation peu retrouvée dans la littérature [312]. Il est d'ailleurs possible que cette régulation ambivalente de *galectine-7* par p53 de type sauvage ou par ces mutants influence les fonctions pro ou anti-apoptotiques de cette protéine.

Certains mutants p53 peuvent augmenter l'expression de *galectine-7* (R175H, R273H, R248W) alors que d'autres n'ont aucun effet (R249S, V143A). Les différences dans la régulation de l'expression des gènes par les mutants p53 peuvent dépendre de la nature de ceux-ci ou de la spécificité cellulaire. Il existe des mutants déficients dans leur contact avec

l'ADN et ceux déficients au niveau de leur structure tertiaire [294-296]. Une augmentation de l'expression de *galectine-7* est observée suite à la surexpression de mutants p53 altérés non seulement au niveau de leur structure conformationnelle, comme R175H, mais aussi au niveau de leur domaine de liaison à l'ADN, comme pour les mutants R273H et R248W. Cependant, le mutant R273H, qui peut induire l'expression de *galectine-7* dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231, n'a aucun effet dans les cellules MDA-MB-453. Ces données suggèrent que l'expression de *galectine-7* ne serait pas dépendante de la nature des mutants p53. Pour confirmer cette hypothèse, il sera nécessaire, dans un premier temps, de tester d'autres mutants p53. Dans un deuxième temps, des analyses par ChIP dans un type cellulaire donné nous révéleraient si la liaison des mutants p53 sur le promoteur de *galectine-7* et son activation transcriptionnelle subséquente est dépendante de la nature des mutations de p53.

Si l'expression de *galectine-7* induite par les mutants p53 semble différer selon le type cellulaire, nous pourrions déterminer quels sont les mécanismes associés aux gains de fonction de ces mutants. Plusieurs hypothèses ont été suggérées concernant les GOF des mutants p53. La présence de p53 de type sauvage endogène dans certaines cellules peut, par exemple, avoir une influence sur la régulation de l'expression des gènes induite par l'expression ectopique de mutants p53 [320]. Les cellules MDA-MB-453 n'expriment pas de protéines p53 fonctionnelles et aucune induction de l'expression de *galectine-7* n'est observée lorsque ces cellules sont transfectées avec un vecteur d'expression codant pour le mutant p53 R273H. Une co-transfection des vecteurs d'expression codant pour p53 de type sauvage et pour le mutant p53 R273H dans les cellules MDA-MB-453 permettrait de déterminer si la présence de ces deux facteurs est nécessaire pour induire l'expression de *galectine-7*. De même, l'inhibition de p53 de type sauvage endogène dans les MCF-7 par des antisens révélerait si ce facteur est essentiel à l'expression de *galectine-7* induite par le mutant p53 R273H dans ces cellules. Il a été observé que *galectine-7* n'était pas exprimée dans des lignées cellulaires de SCC présentant des mutations du gène *TP53* [184, 230]. Comme la nature des mutants p53 exprimés dans ces cellules n'a pas été analysée, nous ne pouvons pas associer l'absence d'expression de *galectine-7* observée dans cette étude avec la nature des mutants p53 ou avec la spécificité cellulaire. Par conséquent, l'analyse de l'expression de *galectine-7* induite par les mutants p53 devra être testée dans différents types cellulaires qui présentent un p53 de type sauvage, muté ou absent afin de déterminer si la spécificité cellulaire joue un rôle dans cette régulation.

Il a aussi été proposé que c'est en interagissant avec certains complexes transcriptionnellement actifs sur les promoteurs de gènes que les mutants p53 obtenaient leur

GOF [297]. Des analyses par CHIP pourront être effectuées pour confirmer cette hypothèse. Cependant, l'identité des complexes transcriptionnellement actifs sur le promoteur de *galectine-7* devront être au préalable connus afin de mieux cibler les analyses. La littérature propose une liste de facteurs de transcription comme p63, p73, p300, NF- κ B, Sp1, EGR1 et bien d'autres [297] qui pourraient agir comme cofacteurs avec les mutants p53 dans la régulation transcriptionnelle de certains gènes. En analysant les sites consensus potentiels pour la fixation de facteurs de transcription sur le promoteur de *galectine-7*, il sera possible d'en sélectionner certains pour déterminer s'ils peuvent coopérer avec les mutants p53 dans la régulation transcriptionnelle de *galectine-7*. Des lignées cellulaires qui expriment ou non ces cofacteurs, ou qui en sont génétiquement déficientes pourront aussi être utilisées pour confirmer la nécessité de ces interactions dans les GOF des mutants de p53 qui induisent l'expression de *galectine-7*.

L'activation transcriptionnelle de galectine-7 par p53 requiert NF- κ B

Un des GOF des mutants p53 les plus décrits dans la littérature est l'association des mutants p53 avec NF- κ B sur les promoteurs de certains gènes [297, 338]. Plusieurs sites consensus pour NF- κ B ont été observés sur le promoteur de *galectine-7*. De plus, dans les carcinomes mammaires MDA-MB-468 mutés pour p53 (R273H), qui expriment de façon constitutive *galectine-7*, nous avons détecté une activité élevée du facteur de transcription NF- κ B. En utilisant des inhibiteurs spécifiques de la voie d'activation de NF- κ B, le parthenolide ou la quercétine, nous avons supprimé l'expression constitutive de *galectine-7* dans ces cellules MDA-MB-468. L'expression de *galectine-7* induite par p53 de type sauvage ou muté dans plusieurs lignées cellulaires était aussi supprimée par un inhibiteur spécifique de la liaison de NF- κ B à l'ADN, le CAPE. Ces données suggèrent donc que la présence de NF- κ B comme cofacteur pour les mutants p53 est essentielle dans la régulation de l'expression de *galectine-7*.

Nous avons démontré que les mutants p53 présents dans les cellules MDA-MB-468 et HaCaT, ainsi que de NF- κ B p50, étaient capables de se lier au promoteur de *galectine-7* *in vivo* dans la région de -677 à -501 pb de l'ATG. Les sites consensus pour p53 et NF- κ B se retrouvent fréquemment rapprochés sur le promoteur de *galectine-7*. Dans la région se situant entre -147 et -136 pb de l'ATG, un site consensus pour p53 se retrouve superposé à un élément κ B. La mutation de ces deux sites consensus (Δ 145-140) inhibe de façon significative l'activité du promoteur de *galectine-7* dans plusieurs lignées cellulaires de cancer du sein. La

mutation des différents sites de liaison pour ces deux facteurs sur le promoteur de *galectine-7*, notamment dans la région de -677 à -501pb de l'ATG, pourra être envisagée afin de définir si un/plusieurs de ces éléments de réponse est/sont essentiel(s) à l'activité du promoteur de *galectine-7*.

Plusieurs études dans différents modèles, incluant les cellules du cancer du sein, ont démontré que les mutants p53 possédaient un site d'attachement distinct de l'élément de réponse de la forme normale de p53. La mutation des sites consensus pour p53 sur le promoteur de *galectine-7* nous permettrait de déterminer si la liaison des mutants p53 observée *in vivo* se produit dépendamment ou indépendamment des éléments de réponse de p53. D'autres études suggèrent aussi que les mutants p53 activaient la transcription des gènes en interagissant directement avec NF- κ B sur les éléments κ B. Pour déterminer cela, nous pourrions réaliser une immunoprécipitation des mutants p53 par ChIP sur le promoteur de *galectine-7* muté sur les éléments κ B, dans les cellules MDA-MB-468.

L'interaction de NF- κ B avec les mutants p53 peut aussi être nécessaire pour permettre l'ouverture de la chromatine ou pour stabiliser ce complexe sur les promoteurs des gènes [338, 372]. Nous avons observé que contrairement au MCF-7^{p53wt}, les cellules MDA-MB-453^{p53null} traitées à la doxorubicine n'exprimaient pas *galectine-7*. Il est suggéré que les complexes NF- κ B induits par la doxorubicine ne sont pas stables sur l'ADN [418]. Il est donc possible que l'absence d'une expression fonctionnelle de p53 dans les cellules MDA-MB-453 empêche la stabilisation de NF- κ B sur le promoteur de *galectine-7*. Des analyses par re-ChIP (deux ChIP effectués successivement avec deux anticorps, soit ici p53 et NF- κ B) pourront être effectuées pour confirmer si la présence de ces deux facteurs est nécessaire sur le promoteur de *galectine-7* pour induire ce gène. Ces données pourront être comparées dans plusieurs types cellulaires présentant différents statuts de p53 afin de déterminer si l'interaction de NF- κ B avec p53 sur le promoteur de *galectine-7* dépend de l'état de type sauvage ou muté de ce dernier. De même, nous pourrions déterminer si, dans les cellules qui expriment constitutivement *galectine-7* comme MDA-MB-468, les mutants p53 peuvent co-immunoprécipiter sur le promoteur de *galectine-7* avec des complexes associés à la modification de la chromatine comme les histones acétyl transférases, p300/CBP, etc. [419]. Ces données nous informeraient si les mutants p53 sont impliqués dans l'ouverture de la chromatine, permettant la transcription du gène *galectine-7*.

C/EBP β : une voie d'activation alternative pour l'expression de galectine-7

De façon surprenante, en mutant spécifiquement le site consensus pour NF- κ B (Δ 147-145) sur le promoteur de *galectine-7*, nous avons observé non pas une diminution, mais une augmentation significative de l'activité de *galectine-7* dans les cellules MCF-7. L'analyse de cette région du promoteur a démontré qu'en plus de NF- κ B et de p53, un autre site consensus pour le facteur de transcription C/EBP β se superposait à l'élément κ B. En mutant le site NF- κ B, nous avons permis au facteur de transcription C/EBP β de se lier à son site consensus. Parmi les trois isoformes (C/EBP β -1, C/EBP β -2 et C/EBP β -3) codées par C/EBP β , C/EBP β -2 présente un meilleur potentiel de transactivation des promoteurs. Contrairement à C/EBP β -1, l'expression de C/EBP β -2 a été associée à la carcinogenèse mammaire [379, 400]. Nous avons déterminé que l'isoforme C/EBP β -2 pouvait activer la transcription du gène *galectine-7* dans plusieurs lignées cellulaires de carcinomes mammaires. En analysant la liaison des facteurs de transcription C/EBP β et NF- κ B sur le promoteur endogène de *galectine-7* dans les MCF-7 par ChIP, nous avons observé une liaison prédominante de NF- κ B p50 au niveau de la région de -200 à +1 pb de l'ATG. Par contre, lorsque nous avons surexprimé C/EBP β -2, une forte liaison de cet isoforme a pu être observée sur cette région du promoteur en parallèle à une diminution de la liaison de NF- κ B p50. Les facteurs de transcription NF- κ B p50 et C/EBP β semblent donc compétitionner pour le même site de liaison sur le promoteur de *galectine-7*. Cependant, alors que le facteur NF- κ B p50 ne semble pas être associé à une expression de *galectine-7*, le facteur C/EBP β est capable à lui seul d'induire l'activation transcriptionnelle de *galectine-7*.

Ces données suggèrent donc qu'une surexpression du facteur de transcription C/EBP β serait suffisante pour induire l'expression de *galectine-7* dans des lignées de carcinomes mammaires où *galectine-7* est normalement réprimée. Des expériences supplémentaires de ChIP de C/EBP β sur le promoteur de *galectine-7* dans d'autres lignées cellulaires présentant une forte activité du facteur C/EBP β permettraient de confirmer ces données. L'utilisation de siRNA de C/EBP β dans des lignées cellulaires qui expriment constitutivement *galectine-7* pourrait aussi être envisagée afin de démontrer que ce facteur est impliqué dans l'expression de ce gène.

2. Implication de ces résultats dans l'expression anormalement élevée de galectine-7 dans le cancer du sein

Nos données suggèrent que l'altération de l'expression de l'un des facteurs de transcription p53, NF- κ B ou C/EBP β pourrait avoir une influence sur la régulation transcriptionnelle du gène *galectine-7* dans le cancer du sein. Par ces résultats, il serait donc possible d'expliquer pourquoi *galectine-7* présente une expression anormalement élevée dans plusieurs cancers, dont le cancer du sein. D'une part, elle pourrait être régulée par les mutants p53 qui sont fréquemment observés dans le cancer du sein. D'autre part, son expression pourrait aussi être induite par C/EBP β dans les tumeurs mammaires qui ne présenteraient ni d'altérations du gène *TP53*, ni une activation constitutive de NF- κ B. L'expression de ces facteurs de transcription ayant été associée spécifiquement aux carcinomes mammaires de sous-type basal [261, 336, 379], il n'est donc pas surprenant que ce soit dans ce sous-type que *galectine-7* présente une expression anormalement élevée [186]. Nous avons aussi démontré que la présence de mutants p53 dans la cellule n'était pas suffisante pour induire l'expression de *galectine-7* et qu'elle nécessitait l'activation de la voie NF- κ B. Ces résultats sont compatibles avec l'hypothèse que si les mutants p53 pouvaient seuls induire l'expression de *galectine-7*, toutes les tumeurs présentant une altération de ce gène exprimeraient des hauts niveaux de *galectine-7*. Or, plusieurs lignées cellulaires présentant des mutants p53 n'expriment pas *galectine-7*, comme les cellules MDA-MB-231. La probabilité qu'une expression anormale simultanée des facteurs de transcription NF- κ B et des mutants p53 soit observée dans les tumeurs mammaires reste cependant élevée. En effet, l'activation constitutive de NF- κ B dans le cancer du sein peut être induite par les mutants p53 [338]. Nous avons d'ailleurs observé une induction de l'activité NF- κ B par les mutants p53 dans plusieurs lignées cellulaires dans notre étude.

Pour confirmer l'implication de ces différents facteurs de transcription dans l'expression anormalement élevée de *galectine-7* dans le cancer du sein, nous pourrions analyser par immunohistochimie l'expression de ces facteurs de transcription dans différents échantillons de tumeurs mammaires. De même, l'utilisation de modèles murins déficients génétiquement en l'un de ces facteurs de transcription ou à l'inverse des souris transgéniques surexprimant l'un de ces facteurs, pourraient être des alternatives pour confirmer ces données. L'expression de *galectine-7* pourrait alors être analysée dans des échantillons de tumeurs mammaires induites dans ces différents modèles murins afin de déterminer l'impact de l'absence ou, au contraire, de la surexpression de l'un de ces facteurs. Les sites de liaison pour

ces facteurs de transcription sont très conservés entre les promoteurs murins et humains de *galectine-7* (**Figure 9**). La confirmation de ces résultats dans des lignées cellulaires murines serait au préalable nécessaire.

Une expression anormalement élevée de *galectine-7* a aussi été associée à d'autres types de cancer (thyroïde, ovaire, lymphome, pancréas...). Nous pourrions déterminer si les facteurs de transcription p53 de type sauvage ou muté, NF- κ B et/ou C/EBP β , sont impliqués dans cette expression anormale de *galectine-7* dans d'autres cancers. C'est le cas, par exemple, de *galectine-3* dans le cancer de la thyroïde. Une corrélation positive entre les mutants p53 et la protéine anti-apoptotique *galectine-3* dans le cancer de la thyroïde a été observée [256]. Dans le lymphome non hodgkinien où des niveaux anormalement élevés de *galectine-7* ont été observés, les mutants p53 les plus fréquemment retrouvés sont R175H, R273H et R248W, comme dans le cancer du sein (données tirées de la base de données : p53.free.fr). Nous pourrions déterminer s'il existe aussi une association entre l'expression de ces mutants et *galectine-7* dans ce type de lymphome.

3. Implication de ces résultats dans l'expression spécifique de *galectine-7* dans les cellules myoépithéliales

Nous n'avons pas déterminé si l'expression spécifique de *galectine-7* dans les cellules myoépithéliales mammaires était associée à l'un ou à plusieurs de ces facteurs de transcription. Si on se réfère à la littérature, une expression des facteurs de transcription p53, NF- κ B ou C/EBP β , n'a pas été spécifiquement associée aux cellules myoépithéliales mammaires. Cependant, il est possible que dépendamment de la nature du complexe multiprotéique et de la disponibilité de ces facteurs, la régulation du promoteur de *galectine-7* puisse être modulée différemment selon le type cellulaire. Dans cette étude, nous avons uniquement utilisé des lignées cellulaires de carcinomes mammaires. Plusieurs lignées cellulaires épithéliales non tumorigéniques sont disponibles (MCF-12A, MCF-12F, MCF-10A, HLB-100, etc., ATCC, <http://www.atcc.org>). Au laboratoire, nous avons démontré que les cellules MCF-10A présentaient de hauts niveaux en ARNm et en protéine de *galectine-7*. Ces cellules expriment un p53 de type sauvage. Cette lignée cellulaire pourra être utilisée comme modèle afin de déterminer si les facteurs de transcription p53, NF- κ B et C/EBP β peuvent être impliqués dans l'expression constitutive de *galectine-7* dans ces cellules. Cependant, l'utilisation de ces lignées cellulaires ne permettra pas de distinguer le sous-type basal/myoépithélial du sous-type luminal normal puisque les MCF-10A ne présentent pas de

caractéristiques de l'un ou de l'autre de ces sous-types. Une analyse immunohistochimique de l'expression de ces facteurs dans différents échantillons tissulaires de la glande mammaire normale pourrait être envisagée afin de démontrer leur présence dans les cellules myoépithéliales où galectine-7 est exprimée. Une autre alternative serait d'utiliser les modèles murins cités dans le paragraphe précédent. En effet, si l'un de ces facteurs est essentiel à l'expression de galectine-7 dans les cellules myoépithéliales, aucune expression de galectine-7 ne serait détectée dans ces cellules dans des souris déficientes génétiquement en ce facteur.

Plusieurs hypothèses pourraient aussi expliquer la spécificité d'expression de *galectine-7* dans les cellules myoépithéliales mammaires. Il est possible qu'un autre facteur de transcription soit responsable de la régulation transcriptionnelle de *galectine-7* spécifiquement dans ce type de cellule. Par exemple, le facteur de transcription p63, et plus particulièrement l'isoforme Δ Np63, est impliqué dans la régulation des épithéliums stratifiés. Il est aussi un marqueur nucléaire des cellules myoépithéliales mammaires [17, 420]. Comme l'expression de Δ Np63 n'a pas été détectée dans la majorité des carcinomes mammaires invasifs [281], ce facteur pourrait par contre être responsable de l'expression constitutive de galectine-7 dans les cellules myoépithéliales mammaires. Aucun site de fixation pour p63 n'a été observé sur le promoteur de *galectine-7*. Cependant, p53 et p63 présentent une forte homologie structurelle, ce qui suggère que ces deux facteurs pourraient lier les mêmes séquences d'ADN et activer des promoteurs communs [274]. Le facteur p63 pourrait donc activer le promoteur *galectine-7* en se liant aux éléments de réponse de p53 présents sur le promoteur. Plusieurs expériences comme des ChIP de p63, l'utilisation d'antisens de p63 ou la surexpression de l'isoforme Δ Np63 dans des lignées cellulaires épithéliales normales pourront être réalisées afin d'investiguer cette hypothèse.

L'expression spécifique de *galectine-7* dans les cellules myoépithéliales mammaires pourrait aussi être due à des mécanismes de régulation épigénétiques. Des données tirées de NCBI démontrent que le promoteur de *galectine-7* présente un profil méthylé dans les cellules mammaires luminales et non dans les cellules myoépithéliales (**Figure 8**). De façon intéressante, la région du promoteur de *galectine-7* qui semble être méthylée dans les cellules luminales débute à environ -150 pb de l'ATG. Nous avons déterminé qu'une mutation des nucléotides de -145 à -140 pb de l'ATG abolissait significativement l'activité du promoteur de *galectine-7* dans plusieurs lignées cellulaires de carcinomes mammaires. Plusieurs dinucléotides CpG sont présents dans cette région dont un situé sur le site de liaison de NF- κ B à -147 pb de l'ATG. La méthylation de l'ADN est un mécanisme reconnu pour moduler

l'expression des gènes au niveau transcriptionnel [421]. Il est donc possible que la liaison des facteurs de transcription p53, NF- κ B et/ou C/EBP β sur le promoteur de *galectine-7* soit contrôlée par la méthylation de l'ADN dans les cellules épithéliales mammaires. Nous avons déjà observé que l'expression de *galectine-7* pouvait être induite par un agent déméthylant, le 5-aza-2'-deoxycytidine, dans différents modèles de lignées cellulaires où l'expression de *galectine-7* est normalement réprimée [422] et dans la lignée de carcinomes mammaires MCF-7.

D'autres facteurs de transcription pourraient aussi réguler de façon négative la transcription du gène *galectine-7* dans les cellules luminales mammaires. Par exemple, plusieurs études démontrent que GATA-3, qui est un facteur de transcription essentiel à la différenciation des cellules luminales mammaires [423], peut aussi réprimer certains gènes [424]. Une corrélation négative a été observée entre l'expression de *galectine-7* et GATA-3 dans différents échantillons de carcinomes mammaires [186]. Plusieurs sites consensus pour le facteur de transcription GATA-3 sont présents sur le promoteur humain de *galectine-7*. Afin de déterminer si ce facteur est impliqué dans l'inhibition de l'expression de *galectine-7* dans certaines cellules, plusieurs expériences peuvent être réalisées. Par exemple, l'utilisation de siRNA de GATA-3 et des analyses de ChIP pour ce facteur dans des cellules présentant un phénotype de type luminal pourraient être réalisées. De même, la surexpression d'un vecteur d'expression codant pour GATA-3 dans des lignées cellulaires exprimant constitutivement *galectine-7*, comme les cellules MDA-MB-468, nous permettrait d'évaluer si ce facteur peut inhiber l'expression de *galectine-7*.

4. Implication de ces résultats sur la fonction de *galectine-7* dans le cancer

Nous avons démontré que p53 et NF- κ B pouvaient réguler la transcription du gène *galectine-7* et que la présence de ces deux facteurs semblait être requise sur le promoteur de ce gène pour l'activer. D'un côté, ces résultats sont surprenants étant donné que ces deux facteurs de transcription sont connus pour réguler des gènes dont les fonctions sont opposées. Alors que le facteur p53 est associé à l'expression de gènes favorisant l'apoptose, le facteur NF- κ B est à l'inverse impliqué dans l'activation de gènes anti-apoptotiques [283, 339]. En plus, il est rare qu'un même gène puisse être à la fois activé par p53 de type sauvage et par ses formes mutées. D'un autre côté, cela donnerait une explication à la fonction paradoxale de *galectine-7* dans l'apoptose. L'habileté du facteur de transcription NF- κ B à avoir une fonction pro- ou anti-apoptotique sur les promoteurs des gènes cibles peut être déterminée par la

présence du facteur p53 de type sauvage ou muté. En effet, p53 de type sauvage peut induire l'activation de NF- κ B et dans ce contexte, NF- κ B présente des fonctions pro-apoptotiques [371]. À l'inverse, les mutants p53 peuvent induire une activation constitutive de NF- κ B ce qui mène à l'expression de gènes anti-apoptotiques [338, 370, 371]. Il est donc possible que suivant la présence de p53 de type sauvage ou muté dans les cellules cancéreuses, galectine-7 puisse être impliquée dans des fonctions pro ou anti-apoptotiques. Si cela est bien le cas, cela pourrait aussi expliquer le paradoxe que galectine-7 puisse être pro ou anti-tumorale dans certaines tumeurs. Des expériences pourront être faites afin de déterminer si le statut de p53 a un impact sur les fonctions de galectine-7 dans l'apoptose.

5. Impact clinique de ces résultats dans le cancer

Des niveaux élevés de galectine-7 ont été observés chez les patients atteints de carcinomes mammaires de hauts grades, notamment ceux avec un phénotype de type basal (i.e. négatifs pour ER, PR et HER-2). Aucun des carcinomes mammaires de bas grade ou de type luminal n'est positif pour le marquage de galectine-7. C'est pourquoi il a été suggéré que galectine-7 pouvait être utilisée comme biomarqueur afin d'identifier plus précisément ces carcinomes mammaires de haut grade. Nos résultats pourraient avoir un impact sur la prévention des cancers du sein de sous-type basal. D'une part, la présence de mutants p53 associée à une activation constitutive de NF- κ B ou à une expression élevée de C/EBP β dans des tumeurs mammaires permettrait de prédire une altération de l'expression de galectine-7, un mauvais pronostic de survie et un risque élevé de métastases. D'autre part, l'analyse de l'expression de galectine-7 pourrait être utilisée afin de déterminer si un agent thérapeutique, dirigé contre p53 et/ou NF- κ B, est efficace.

À plus long terme, il sera peut-être possible d'associer l'expression anormale de galectine-7 à des mutants spécifiques de p53 dans certains cancers. Ces mécanismes moléculaires pourraient aussi être une cible thérapeutique dans l'inhibition de galectine-7 dans le cancer du sein. La voie d'activation de p53 constitue déjà une cible thérapeutique majeure dans le traitement de certaines pathologies et cancers. En effet, plusieurs approches sont suggérées pour l'activation de p53 de type sauvage ou de la réactivation des fonctions des mutants p53 dans les cellules cancéreuses [425]. Cependant, il sera nécessaire de déterminer au préalable l'impact de la présence de p53 de type sauvage ou muté sur les fonctions de galectine-7 dans les cellules cancéreuses, notamment lorsque NF- κ B est constitutivement activé. En effet, si la coopération de p53 et de NF- κ B est associée à des

fonctions pro-apoptotiques de galectine-7, l'inhibition de NF- κ B dans des tumeurs qui présenteraient un p53 de type sauvage pourrait alors diminuer et non augmenter la réponse thérapeutique. Si la réponse pro ou anti-apoptotique de galectine-7 dépend de la présence de p53 de type sauvage ou muté dans les cellules cancéreuses, cela peut avoir des conséquences majeures dans la chimiorésistance de certaines patientes. En effet, certaines patientes atteintes d'un cancer du sein avancé présentent une résistance à certains traitements chimiothérapeutiques [426]. Plusieurs mécanismes sont impliqués dans cette chimiorésistance, dont la dérégulation de l'apoptose. Des traitements thérapeutiques qui cibleraient l'activation de p53 pourraient favoriser la résistance à l'apoptose au lieu de l'inhiber si galectine-7 induite par p53 présente des fonctions anti-apoptotiques. Prédire la réponse aux traitements chimiothérapeutiques est donc essentiel pour cibler une meilleure stratégie thérapeutique. Plusieurs marqueurs ont été étudiés dans le but d'établir une prédiction de la réponse des traitements, mais peu semblent efficaces.

Les mécanismes de régulation de galectine-7 par p53 de type sauvage ou muté, NF- κ B et/ou C/EBP β dans les cancers du sein avancés pourraient donc être une nouvelle cible pour les thérapies anti-cancers, pour la prédiction de la réponse et des possibles rechutes au cours des cinq années suivant les premiers traitements.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Ces résultats apportent de nouvelles informations sur la régulation transcriptionnelle de *galectine-7* qui était jusqu'à présent peu caractérisée. Nous avons découvert que les facteurs de transcription p53 de type sauvage ou muté, NF- κ B et/ou C/EBP β sont impliqués dans la régulation transcriptionnelle de *galectine-7*. Un modèle du contrôle de l'expression de *galectine-7* peut être envisagé à partir de ces données (**Figure 14**). Par ces mécanismes de régulation, *galectine-7* serait donc directement impliquée dans les processus biologiques qui mènent au développement et à la progression tumorale.

L'implication des mutants p53 dans l'activation du promoteur de *galectine-7* n'avait jamais été démontrée dans d'autres études jusqu'à présent. Cette donnée nous permettra peut-être d'expliquer l'expression anormalement élevée de *galectine-7* dans certains cancers, mais aussi sa fonction apoptotique ambivalente.

Nous avons aussi identifié une nouvelle voie de régulation, celle de C/EBP β , indépendante de p53 et de NF- κ B qui induirait l'expression de *galectine-7* dans les cellules du cancer du sein. Ces résultats permettraient d'expliquer pourquoi *galectine-7* est induite dans les cellules cancéreuses qui n'exprimeraient pas des formes mutées de p53 ou qui ne présenteraient pas une activation constitutive de NF- κ B.

Pour la suite de ces études, il sera essentiel, d'une part, de déterminer l'impact de ces mécanismes moléculaires, notamment pour les mutants p53, dans les fonctions de *galectine-7* dans le cancer du sein. D'autre part, nous pourrions analyser ces mêmes mécanismes moléculaires dans les autres cancers où *galectine-7* présente une expression altérée.

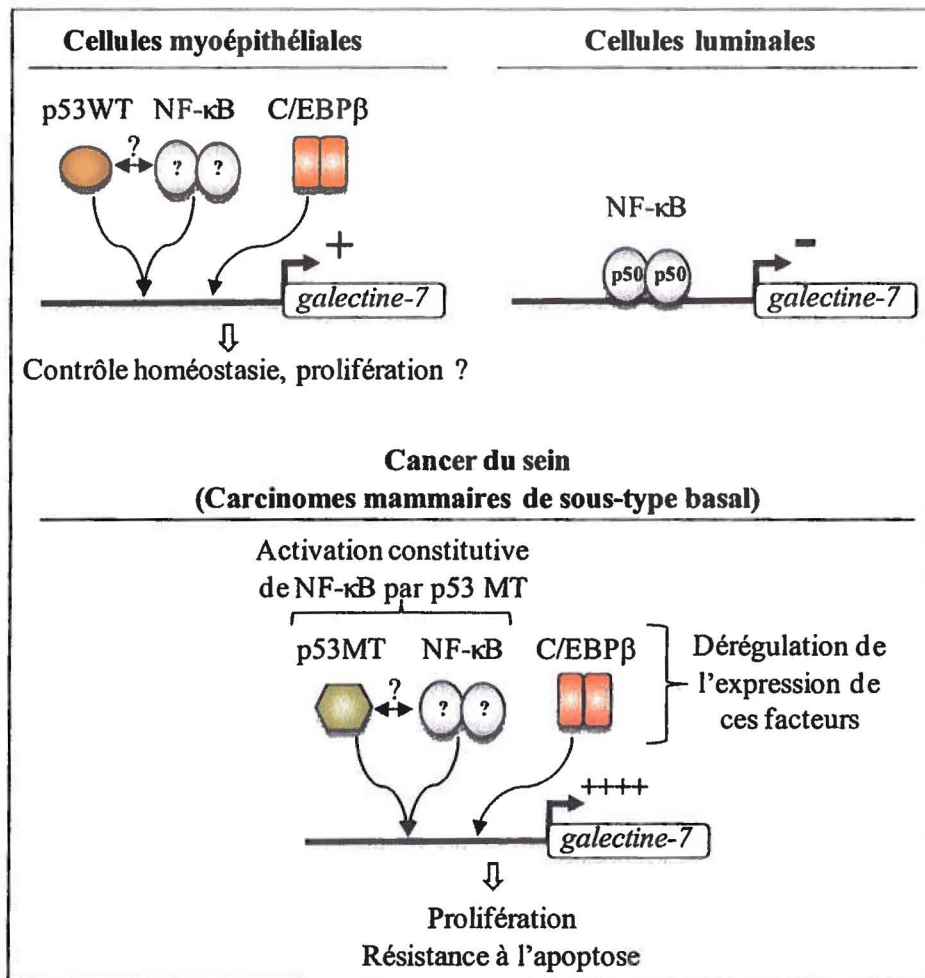


Figure 16. Modèle de régulation du promoteur *galectine-7* par p53, NF-κB et C/EBPβ dans les cellules épithéliales mammaires normales et dans le cancer du sein. Dans les cellules myoépithéliales mammaires, les facteurs de transcription p53, NF-κB et C/EBPβ pourraient coopérer ensemble sur le promoteur de *galectine-7* pour induire l'expression constitutive de ce gène dans ces cellules. La présence du facteur de transcription NF-κB serait requise sur le promoteur de *galectine-7* pour que p53 puisse activer ce gène et vice-versa. Galectine-7 induite par ces facteurs pourrait être impliquée dans le contrôle de la prolifération et de l'homéostasie des cellules myoépithéliales. Dans les cellules luminales mammaires, l'expression de galectine-7 serait réprimée par la fixation d'homodimères de NF-κB p50 transcriptionnellement inactifs sur le promoteur. Dans le cancer du sein et plus particulièrement dans les carcinomes mammaires de sous-type basal, une expression altérée des facteurs de transcription NF-κB et C/EBPβ-2 et du gène *TP53* induirait une expression anormalement élevée de *galectine-7*. Dans ce cas-ci, galectine-7 pourrait être associée à la prolifération et à la résistance à l'apoptose des cellules cancéreuses. Les membres de la famille NF-κB impliqués dans la régulation de galectine-7 n'ont pas été identifiés dans cette étude et devront faire l'objet d'investigations futures.

ANNEXES

ANNEXE A

Potentials directions for drug development against galectine-7 in cancer.

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

Expert Opinion

Potential directions for drug development against galectin-7 in cancer

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

Yves St-Pierre¹, 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.

informa
healthcare

2. Galectins

Galectins constitute a family of lectins defined by shared consensus amino acid sequences and affinity for beta-galactose-containing oligosaccharides [1]. 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 [2,3]. 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 [4-7]. 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 galectin-3 in the nucleus have been associated with tumor progression of melanoma cells [10]. Translocation of galectin-1 to the nucleus has also been shown to occur after treatment with chemotherapeutic agents [11]. This suggests that its activity is highly regulated at the cell level, in addition to being specific to cell types and developmental stage [1,12]. 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 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 differentiation 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 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 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 apoptosis in HeLa cells [21] or overcome the chemoresistance of

urothelial carcinoma cells [22], others have shown that binding of galectin-7 to cell surface receptors can trigger signals that in fact reduce neuroblastoma cell growth, although without the characteristic features of apoptosis [23]. Similar results have been found in the DLD-1 colon cancer cells [24]. 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 in different types of cancer cell lines [25,26].

4. Galectin-7 in tumor progression

At first glance, galectin-7 should aid in the elimination of 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 [22] who showed that although over-expression of galectin-7 alone, following gene transfer in 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 by galectin-7 in colon cancer, however, Lu *et al.* [27] 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 tissues examined in the adult rat, thus providing the first indication that galectin-7 could be associated with tumor progression. Rorive *et al.* [28] later observed that galectin-7 expression was markedly higher in different forms of papillary carcinomas than in benign thyroid tumors. High levels of 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 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 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, 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

162 mice injected with control lymphoma cells that do not
 165 express galectin-7 only few scattered foci of tumor cells with
 limited infiltration were observed [32]. We also found that
 expression of galectin-7 overcomes the resistance of mice
 that were otherwise genetically resistant to lymphoma dissemina-
 tion. 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
 180 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 reper-
 toire 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 [34]. 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 obser-
 215 vations). This correlation between galectin-7 and MMP-9
 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 involve-
 ment 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 demon-
 strated 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 [44]. Podosomes are actin-rich contractile 235
 structures and are involved in the adhesion process of cells
 to solid substrates initiating migration and tissue invasion [45].
 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 carbohy-
 drate such as *N*-acetyl-lactosamine, lactose, galactose and
 galactosamine [49], 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 expres-
 sion 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 [50]. 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

272 HUVEC [50], which have been shown to inhibit spontane-
 275 ously 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* [52] 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
 280 apoptosis in myeloma cells by suppressing the antiapoptotic
 effect of galectin-3 on cytochrome c and is now being tested
 in clinical trial in patients with diffuse large B cell lym-
 phoma (DLBCL) and other hematological malignancies [53].
 Interestingly, we have shown that whereas normal individu-
 285 als have undetectable galectin-7 in their serum, some patients
 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 thera-
 peutic effect does indeed disrupt galectin-3 specific func-
 tions 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 [54-55] and ligand affinity data [56], has yielded several
 high-affinity and stable thiogalactoside-based inhibitors that
 preferentially bind to recombinant galectin-3 *in vitro* [57].
 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
 310 (K_d ≥ 320 nM), suggesting that fine-tuning can considerably
 increase the affinity of these inhibitors for galectins [58].
 By replacing the *N*-acetyl glucosamine moiety by a non-
 carbohydrate aglycon, they were then able to gain significant
 specificity for galectin-7 [59], indicating that development of
 315 high-affinity monosaccharide-derived galectin-7-selective
 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
 325 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 330
 unit [61]. When tested in solid-phase competition assays,
 these glycodendrimers have been reported to successfully
 inhibit the binding function of galectin-1. Studies compar-
 ing their inhibitory capacity relative to monomeric com-
 pounds are highly in favor for further development of such
 335 glycobusters as effective blocking reagents against galectins,
 suggesting that combining such multivalent scaffolding with
 monovalent ligands is a promising avenue [62-63]. Synthetic
 lactulose amines (SLA) have also been described as potent
 and specific inhibitors of galectin-1 and galectin-3 [64-65].
 340 There are three kinds of SLA: 1) *N*-lactulose-octamethylene-
 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 [65], 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
 355 very powerful technique to identify short pentapeptides
 based on a common tyr-x-tyr motif of glycomimetic peptides
 that can inhibit the binding of several galectins in the mil-
 limolar range [66-67]. Such peptides have proven to be very
 effective in their ability to inhibit *in vitro* the binding of
 360 galectin-3 to the purified tumor-specific Thomsen-Friedenreich
 glycoantigen normally expressed on carcinoma cells [68].
 Interestingly, André *et al.* [69] have shown that the phage
 display method has yielded sequences binding at or near the
 carbohydrate-binding site. Using label-free galectin to dissociate
 365 phage-galectin complexes, these authors were able to select
 for peptides interfering with both protein-carbohydrate and
 protein-protein interactions. Although they were not success-
 ful for all galectins tested, suggesting that either the phage
 library they had used might not have been optimal, or that
 370 not all galectins mediate protein-protein interactions, this
 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

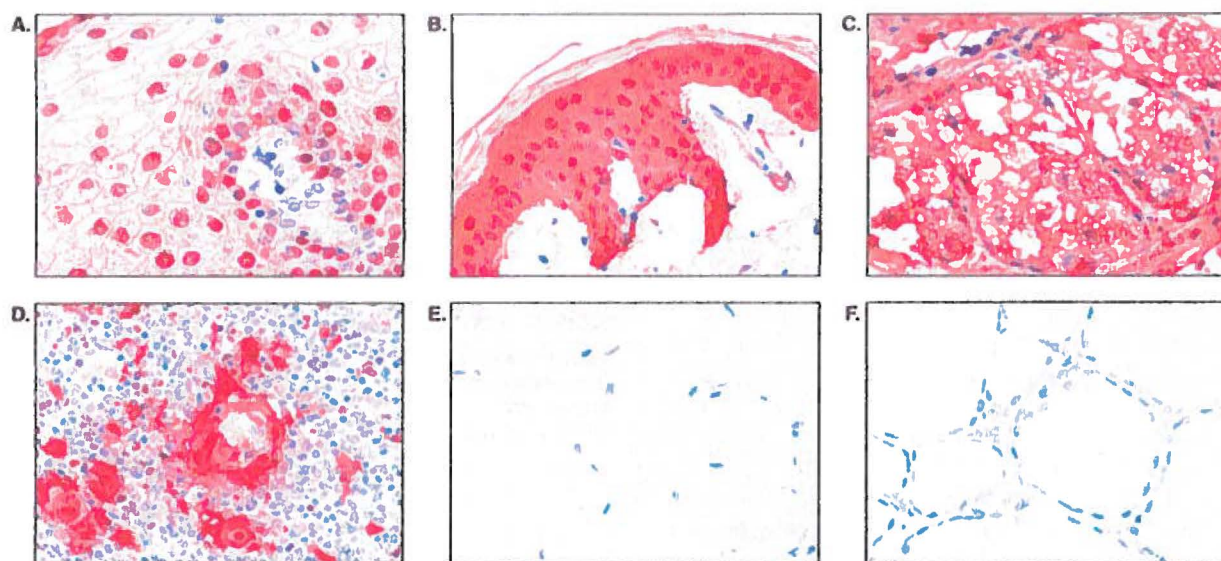


Figure 1. Expression of galectin-7 in normal human tissues. A. Expression of galectin-7 in the normal esophagus tissue showing moderate to strong nuclear and cytoplasmic staining in mucosal squamous epithelium. B. and C. Strong cytoplasmic and nuclear staining in squamous epithelium and sebaceous glands. 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).

382 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
 385 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 investi-
 gators, 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-1 (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 func-
 tions 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 412
 that were susceptible to apoptosis by galectin-7 revealed that 413
 most of the genes that were modulated by galectin-7 have 415
 been associated with intracellular functions, such as apoptosis 415
 and the redox-status. Although the existence of soluble forms 416
 of galectin-7 has been documented [73], high levels of galectin-7 417
 have been consistently found in the cytoplasm and nuclei of various 418
 cell types (Figure 1). The recent data from Saussez *et al.* [74] 420
 have also shown that increased expression of galectin-7 in dys- 420
 plasias was accompanied by a shift from the cytoplasmic 421
 compartment to the nucleus. More specifically, they showed 422
 that initiation of tumorigenesis in laryngeal squamous cell 423
 carcinoma (LSCC) is associated with nuclear localization of 425
 galectin-7. In carcinomas it is shifted back to cytoplasmic 426
 sites. This observation was specific to galectin-7 as the presence 427
 of galectin-1, in contrast, remained in the nucleus during 428
 the course of malignant progression. Moreover, a recent study 429
 provides support for the idea that galectin-7, like other galectins, 430
 may also be engaged in intracellular protein-protein processes. 431
 Inagaki *et al.* [75] have shown that galectin-7 is a transcrip- 432
 tional regulator that antagonizes TGF- β -elicited stimulation 433
 of type I collagen and PAI-1 expression in response to HGF 434
 via protein-protein interaction with Smad3. In their study, 435
 Inagaki and colleagues have shown that galectin-7-specific 436
 siRNA inhibited HGF-induced nuclear export of Smad3, a 437
 transcriptional factor linked to the TGF- β signaling cascade. 438
 In cancer, Smad3 mediates the tumor-suppressor activity of 439
 TGF- β , 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]
Thyroid	Hypopharyngeal and laryngeal	Low grade dysplasia and carcinoma	Increased expression	Nuclear	[74]
	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 equi-
445 librium between galectin-7 and its nuclear substrates in the
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
455 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
460 an enigmatic protein with regard to its implication in various
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
465 neoplastic progression and metastasis. Of course, it is possible
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
470 from genetically engineered mouse models have shown that
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
475 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 evaluat-
480 ing 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 485
might operate by means of CRD-independent interactions,
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 490
to identify peptides or blocking monoclonal antibodies that
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 495
antibodies specific for members of the MMP family that
harbor similarity in structure of their catalytic pocket that
had made so difficult the design of truly specific small molecule
inhibitors [77]. Finally, a fourth challenge is the delivery
of such drugs to the relevant cellular compartment. It is becom- 500
ing clear that galectin-7, like many other galectins, has impor-
tant intracellular functions, including nuclear functions.
As nuclear protein import is stimulated in proliferating
cells compared to quiescent cells [78], it will be important to
investigate nucleocytoplasmic trafficking of galectin-7 and
505 how its modulation and putative drugs will affect its functions.
We are confident, however, that future collaborations
between basic cancer researchers, clinicians, the pharmaceutical
industry will improve chances of successfully developing
novel therapeutic strategies. 510

Acknowledgements

Supported by a grant from the Canadian Institute for Health
Research (Grant No. MOP-89697). 515

Declaration of interest

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

Bibliography

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

1. Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, et al. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell* 1994;76:597-8
2. 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
3. Ochieng J, Furtak V, Lukyanov P. Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconj J* 2004;19:527-35
4. 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
5. Demetriou M, Granovsky M, Quaggin S, et al. Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgar5 N-glycosylation. *Nature* 2001;409:733-9
6. Perillo NL, Pace KE, Seilhamer JJ, et al. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature* 1995;378:736-9
7. 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
8. 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
9. 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
10. 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
11. 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
12. Kasai K, Hirabayashi J. Galectins: a family of animal lectins that decipher glyco-codes. *J Biochem* 1996;119:1-8
13. 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.**
14. Magnaldo T, Fowles 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
15. Magnaldo T, Fowles D, Darmon M. Galectin-7, a marker of all types of stratified epithelia. *Differentiation* 1998;63:159-68
16. 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
17. 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
18. 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
19. 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
20. Polyak K, Xia Y, Zweier JL, et al. A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 1997;389:300-5
21. 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, Waranabe 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
23. 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
24. 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 II T cell apoptosis. *Cancer Res* 2003;63:8302-11
26. Lu LH, Nakagawa R, Kashio Y, et al. Characterization of galectin-9-induced death of Jurkat T cells. *J Biochem* 2007;141:157-72
27. Lu J, Pei H, Kaeck M, Thompson HJ. Gene expression changes associated with chemically induced rat mammary carcinogenesis. *Mol Carcinog* 1997;20:204-15
28. 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.**
30. 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
31. 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
32. 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.**
33. 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

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
37. 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
38. 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
39. 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.**
41. 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
42. Hirrelet 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
43. 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
44. 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.**
45. Yamaguchi H, Pixley F, Condeelis J. Invadopodia and podosomes in tumor invasion. *Eur J Cell Biol* 2006;85:213-8
46. 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.**
47. 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
48. Liu FT. Galectins: novel anti-inflammatory drug targets. *Expert Opin Ther Targets* 2002;6:461-8
49. Leonidas DD, Vatzaki EH, Vorum H, et al. Structural basis for the recognition of carbohydrates by human galectin-7. *Biochemistry* 1998;37:13930-40
50. 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
51. 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
53. Available from: <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=GCS-100>
54. Collins PM, Hidari KI, 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
55. 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
56. 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 I, Arnoux P, Kahl-Knutsson B, et al. Structural and thermodynamic studies on cation- π 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
60. 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
61. 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
64. 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

- 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
68. Zou J, Glinsky VV, Landon IA, 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
70. 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
71. 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
72. 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
73. 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.
76. 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
77. Overall CM, Kleinfeld O. Towards third generation matrix metalloproteinase inhibitors for cancer therapy. *Br J Cancer* 2006;94:941-6
78. 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
80. Langbein S, Brade J, Badawaj 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
81. 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-Pierre¹, Katherine Biron-Pain, Carole Campion, Geneviève Lavoie, Frédéric Bouchard & Julie Couillard
¹Author 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

A distinctive role for galectin-7 in cancer ?

St-Pierre Y, Campion CG, Grosset AA.

A distinctive role for galectin-7 in cancer ?

Yves St-Pierre¹, Carole G. Camplon and Andree-Anne Grosset¹

¹INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 Blvd des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7

TABLE OF CONTENTS

1. Abstract
2. Introduction
3. Galectin-7: Comparison with other members of the galectin family
 - 3.1. Galectins
 - 3.2. Distinctive expression pattern of galectin-7
 - 3.3. Cellular localization of galectin-7
4. Galectin-7 in cancer
 - 4.1. The pro-apoptotic function of galectin-7: a logical role in suppressing tumor growth
 - 4.2. Unexpected roles of galectin-7
 - 4.3. Galectin-7: a marker for mammary myoepithelial cells and aggressive breast cancer?
5. Other functions for galectin-7
6. Concluding remarks
7. Acknowledgement
8. References

1. ABSTRACT

The galectins are a family of evolutionarily-conserved carbohydrate-binding proteins. They are distributed widely in all living organisms and have been implicated in many essential functions including development, differentiation, cell-cell adhesion, cell-matrix interaction, growth regulation, apoptosis. Several members of the galectin family have also been shown to be involved in cancer progression and metastasis. In the case of galectin-7, several studies have reported alterations in its expression pattern during cancer progression. In a variety of tumors, its expression can range from being completely down-regulated to highly up-regulated. Accordingly, its precise role in this field is still debated. The evidence shows that galectin-7 may promote or inhibit cancer development. In this article, we review the data concerning expression and roles of galectin-7 in cancer and propose a comprehensive view of its contribution during cancer progression.

2. INTRODUCTION

In recent years, cancer-associated changes in protein glycosylation have generated considerable interest. Accordingly, carbohydrate-binding proteins (lectins) that are present in the extracellular matrix (ECM) and have high affinities for specific oligosaccharide structures expressed on the cell surface have emerged as promising markers for and therapeutic targets in a large number of diseases, including cancer. This is particularly true for members of the galectin family. A role of galectins in cancer invasion and metastasis has been well documented. However, most of the attention has been focused on galectin-1 and galectin-3, and thus we still know very little about how galectin-7 expression affects cancer progression and how distinctive its role is. Although most studies report that galectin-7 is associated with apoptosis, a number of observations suggest that it may paradoxically promote disease progression. Here, we offer an explanation for this paradox and discuss data suggesting that galectin-7 may

Table 1. Cell-specific expression of galectin-7 in normal tissues

Tissue	Cell type	Localization	References
Oral mucosa	Squamous epithelial cells	Nuclear and cytoplasmic/membranous	(80)
Skin	Epidermal cells and outer root sheath of the hair follicle	Nuclear and cytoplasmic/membranous	(10, 13, 14, 80, 81)
Cervix	Squamous epithelial cells	Nuclear and cytoplasmic/membranous	(80, 82)
Vagina	Squamous epithelial cells	Nuclear	(80, 82)
Vulva/anal skin	Squamous epithelial cells	Nuclear and cytoplasmic/membranous	(80)
Ovary	Stroma epithelial cells and epithelial cells of the surface	Nuclear and cytoplasmic/membranous	(14, 83)
Breast	Myoepithelial cells	Nuclear and cytoplasmic/membranous	(15, 63)
Forestomach	Squamous epithelial cells	Nuclear and cytoplasmic/membranous	(13, 17)
Hypopharynx and larynx	Epithelial cells	Nuclear and cytoplasmic/membranous	(45)
Bladder and Urogenital ridges	Urothelial cells, predominantly those near the external urethral orifice	Cytoplasmic	(16, 84, 85)
Esophagus	Epithelial cells	Nuclear	(13, 86) (82)
Colon (upper crypts)	Epithelial cells	Nuclear	(83)
Trachea	Epithelial cells	Nuclear and cytoplasmic/membranous	(14)
Tongue	Squamous epithelial cells	Nuclear and cytoplasmic/membranous	(13, 87)
Lip	Sebaceous glands	Cytoplasmic/membranous	(13, 87)
Artery	Intima	Nuclear and cytoplasmic/membranous	(88)
Cornea	Epithelial cells	Nuclear and cytoplasmic/membranous	(13, 49)
Thymus	Epithelial cells of Hassall's corpuscles	Nuclear and cytoplasmic/membranous	(13)

serve as a novel marker for and a therapeutic target in some forms of cancer.

3. GALECTIN-7: COMPARISON WITH OTHER MEMBERS OF THE GALECTIN FAMILY.

3.1. Galectins

Galectins constitute a family of lectins defined by shared consensus amino acid sequences and affinities for beta-galactose-containing oligosaccharides (1). In humans, galectins are numbered according to the order of their discovery, and the 15 members of the family are normally classified according to their structure and number of carbohydrate recognition domains (CRD) (2,3). The galectins have either one (Galectin-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14, and -15) or two (Galectin-4, -6, -8, -9, and -12) CRD linked by a hinge peptide. Typically, CRD are located in the C-terminal end of a protein and consists of a typical β -sandwich fold of approximately 130 amino acid residues that are conserved in all galectins and that include a glycine which stabilizes galectin-carbohydrate interactions (4-7). Analysis of the three-dimensional structure of galectin-7 reveals its homology to galectin-1 and galectin-3, although its overall structure more closely resembles galectin-10, a lysophospholipase expressed primarily in eosinophils, basophils, and some T cells (8, 9). Although early reports suggested that galectin-7 was a monomer (10), further analyses of its crystal structure and its aggregation properties by mass spectrometry indicated that it has the ability to form homodimers (11, 12).

3.2. Distinctive expression pattern of galectin-7

Unlike other most commonly studied galectins, galectin-7 exhibits a high degree of tissue specificity; its expression is restricted mostly to stratified epithelial cells of the esophagus, tongue, lip, and epidermis (13, 14). Galectin-7 is found in several types of epithelial cells, including epithelial cells of hair follicles, the esophagus, the oral epithelia, the cornea, Hassall's corpuscles of the thymus, the urinary system, the stratified squamous epithelium of the forestomach, and mammary myoepithelial

cells (13, 15-17) (Table 1). Accordingly, high levels of galectin-7 are found in HaCaT cells, a transformed keratinocyte cell line, and in MDA-MB-468, a human breast cancer cell line. Although aggressive lymphoma cells may express galectin-7 constitutively, cell lines derived from the lymphoid and myeloid lineages, such as Jurkat T lymphoma cells, do not express detectable levels of galectin-7 (18, 19).

Although a number of stimuli have been shown to positively or negatively regulate galectin-7 expression in different cell types (Tables 2 and 3), the molecular mechanisms regulating the cellular specificity of galectin-7 expression remain poorly characterized. The expression of galectin-7, like that of other members of the galectin family, is partially controlled by epigenetic mechanisms, such as DNA methylation (20-23). This conclusion is largely based on experiments showing that treatment of cell lines with DNA methyltransferase inhibitors, such as 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC), can induce galectin-7 expression in cells that do not normally express the protein, such as Jurkat T lymphoma cells and HCT116 colon cancer cells (18, 24). Genome profiling experiments comparing several cell lines and primary cells (such as primary dermal fibroblasts) with or without 5-aza-dC treatment have also revealed a possible link between DNA hypomethylation and galectin-7 expression (25-27). A positive correlation between the hypomethylation state of the galectin-7 promoter and constitutive expression of galectin-7 has also been reported (24). Whether DNA hypomethylation favors the binding of specific transcription factors to the galectin-7 promoter is currently unclear. In fact, the identity of the transcription factors that regulate galectin-7 expression remains largely unknown. Results from gene profiling experiments indicate, however, that a number of transcription factors may be involved in inducing or repressing galectin-7 expression. The first transcription factor shown to regulate galectin-7, at least in colorectal cancer cells, was p53 (28). A study from the group of Bert Vogelstein revealed that *galectin-7* mRNA was one of the 14 transcripts (or "PIG's", for *p53-induced genes*) out of

Galectin-7 in cancer

Table 2. Stimuli that increase galectin-7 expression

Compound	Specificity	Model system	References
Dimethylallyllysine	2-oxoglutarate (2-OG) dependent dioxygenase inhibitor	Human mammary MCF-7 tumor cells	(89)
5'-methylazacytidine	DNA methyltransferase inhibitor	Lymphoma cells	(24)
p63	Transcription factor	p63 null mutation and its effect on skin	(90)
Early growth response factor 1 (EGR1)	Transcription factor/hormone	Human umbilical vascular endothelial cells (HUVECs)	(91)
Keratinocyte growth factor (KGF) and Epidermal growth factor (EGF)	Hormone	Skin of C57/B61 mice treated with EGF and KGF	(92)
Ultraviolet (UV) B rays	-	Human epidermal keratinocyte	(48)
p53	Transcription factor	Overexpression of p53 in human DLD-1 and CRC colorectal cancer cells	(28)
H/Ras	Signaling pathway	H/Ras-induced genes dependent on p65 and/or c-Rel in immortalized mouse embryo fibroblasts (MEFs)	(93)

Table 3. Agents that suppress galectin-7 expression

Compound	Specificity	Model system	References
Estrogen	Hormone	Human mammary MCF-7 tumor cells	(94)
GATA-3	Transcription factor	Human mammary MCF-10A tumor cells	(95)
Glucocorticoid receptor	Hormone	Human mammary MCF-10A tumor cells	(96)
Epigallocatechin gallate (EGCG)	NA	NF639 breast cancer cell	(97)
Lutein hormone	Hormone	Blotransgenic mice overexpressing ERB2/Neu and LH	(98)
Parthenolide	NF- κ B inhibitor	Human keratinocytes	
miRNA-34	miRNA	Human HCT116 colorectal cancer cells	(99)
Retinoic acid	Hormone	Human epidermal keratinocytes	(100)

7,202 induced in DLD-1 colorectal cancer cells following *de novo* expression of p53. *In silico* analysis of its promoter does indeed reveal the presence of p53 consensus sites proximal to the initiation sites. *Galectin-7* may also be a target gene of p63 during early epidermal morphogenesis (29). The p63 isoforms are homologs of p53 and are capable of activating gene expression by binding to degenerate p53 response elements. The ability of p53 alone to induce galectin-7 may, however, be cell type-dependent, because induction of p53 by doxorubicin in lymphoma cells is insufficient to induce galectin-7 expression (18). Computational analysis of the human and mouse *galectin-7* promoters reveals the presence of several conserved consensus sites, including those for NF- κ B subunits and GATA-3. These transcription factors are among the prime candidates for regulation of *galectin-7* expression. We have identified an inverse relationship between GATA-3 and galectin-7 expressions in mammary tumor cells (15). A relationship between NF- κ B, which is a major anti-apoptotic factor (31), and galectin-7 was also reported recently, in a series of gene pathway profiling experiments aimed at identifying networks of molecular interactions of genes expressed in highly metastatic variants of 4T1-derived breast tumors (32). Whether these transcription factors play a role in galectin-7 expression in specific cell types and/or cancer remains, however, to be established.

3.3. Cellular localization of galectin-7

Historically, the cellular localization of galectins has been a subject of intense scrutiny, given the multiple roles of these proteins. A general assumption is that galectins exist in extracellular and intracellular compartments. Although they do not harbor a signal sequence, the members of galectin family can be secreted through a non-classical secretory pathway, sometimes in galectin-rich vesicles or cell-derived exosomes following exocytic fusion with plasma membranes (33-35). Consequently, they have often been found in the sera of normal subjects and cancer patients. For example, normal

individuals have detectable levels of galectin-3 in their serum, while patients with metastatic disease have significantly higher levels of galectin-3 compared to normal individuals or patients with localized tumors (36-38). ELISAs have also been used to demonstrate secretion of galectin-1 into the culture medium by a number of different cell types, including specific subsets of B and T cells, endothelial cells, and multipotent mesenchymal stromal cells (39-42). Accordingly, recombinant galectins have been extensively used to study various carbohydrate-dependent extracellular functions in various *in vitro* model systems. These studies have shown that secreted forms of galectins bind and crosslink widely expressed cell surface receptors harboring the appropriate oligosaccharides. Such oligomeric interactions create lattices or microdomains that regulate glycoprotein mobility in the plane of the membrane (43). For example, the binding of galectin-3, -8, or -9 to β 1,6GlcNAc-branched N-glycans on the extracellular surface of the EGFR induces the formation of a transient dynamic lattice that opposes receptor loss through endocytosis, thus maintaining its sensitivity to ligand binding (44). To our knowledge, however, there is no indication that galectin-7 participates in the formation of such structures. This may be due to the fact that galectin-7 is preferentially found in intracellular compartments. Although cell binding studies using recombinant galectin-7 has revealed that galectin-7 binds to the cell surface in a carbohydrate-dependent manner (12) and can stimulate MMP-9 expression (19), most studies have reported that galectin-7 expression is restricted to the cytoplasm and the nucleus (Table 1). Our group and others have also failed to detect significant levels of galectin-7 in sera from both healthy individuals and cancer patients (45). Analyses of supernatants from HaCaT or mammary epithelial cells lines using either ELISAs or western blots have also failed to provide evidence for a secreted form of galectin-7 in these cells, even when galectin-7 is expressed at high levels into the cytoplasm following transfection with an expression vector encoding human or mouse galectin-7 (15). Similarly,

no immunoreactivity could be detected in COS-1 or HeLa cells transfected with a cDNA encoding galectin-7 (10, 46). Galectin-7 seems to be preferentially found in intracellular compartments, possibly interacting with the cytoskeleton (10). Although the reason why galectin-7 (in contrast to other galectins) cannot be detected in the serum is currently unclear, we believe that investigation of the role of galectin-7 in normal and pathological processes should focus on intracellular compartments rather than extracellular spaces.

4. GALECTIN-7 IN CANCER

4.1. The pro-apoptotic function of galectin-7: a logical role in suppressing tumor growth

Members of the galectin family are well known for their ability to promote apoptosis, and a large number of reviews have documented the role of galectins in apoptosis. Based on the idea that galectin-7 shares functions with its family, most of the investigations concerning galectin-7 have thus focused on its implication in apoptosis. This link between apoptosis and galectin-7 was initially proposed in the study linking induction of its expression to that of p53 in colon cancer cells (28). Given its preferential distribution in epithelial cells, the ability of galectin-7 to modulate apoptosis was believed to play an important role in epidermal homeostasis, since apoptosis is an essential mechanism for maintaining epidermal integrity (13, 47). This role was further supported by a study by Bernerd et al., (48) who reported that both mRNA and protein levels of galectin-7 were increased in cultured keratinocytes after UVB radiation. They also found that sunburned/apoptotic keratinocytes expressed higher levels of galectin-7 than other keratinocytes and that galectin-7 overexpression induces a significant increase in terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated UTP end labeling (TUNEL)-positive keratinocytes. It is thus not surprising that galectin-7 plays a role in epithelial cell migration and in the re-epithelization of corneal and/or epidermal wounds (49-51). Such a role for galectin-7 in the homeostatic control of epithelia is supported by recent studies using galectin-7-deficient mice. Using these mice, Gendronneau et al. (52) showed that galectin-7 helps to maintain epidermal homeostasis in response to UVB irradiation and wounding. Ectopic expression of galectin-7 in DLD-1 cells also made them more sensitive to a number of different apoptotic stimuli (53). Moreover, DLD-1 transfectants overexpressing galectin-7 grew significantly slower than control transfectants, most notably following injection into severe combined immunodeficient (SCID) mice. This anti-proliferative effect of galectin-7 does not seem to be restricted to colorectal cancer cells, because galectin-7 also renders HeLa cells more sensitive to apoptotic stimuli (46). These studies also showed that galectin-7's pro-apoptotic function was most likely performed by its intracellular form, because it was found to localize in the nuclei and cytoplasm in various cell types, including HeLa and HaCaT cells. Galectin-7 is thus distinct from other members of the galectin family with regards to the mechanisms by which they modulate apoptosis. Galectin-1 and galectin-9, for example, induce tumor cell apoptosis when added to the extracellular space, whereas galectin-7, galectin-3, and

galectin-12 seem to promote apoptosis through intracellular mechanisms (54).

This ability of galectin-7 to inhibit cell proliferation may not always be linked to its pro-apoptotic function. Galectin-7-mediated inhibition of proliferation in neuroblastoma cells, for instance, can be achieved without any signs of apoptosis (12). In this case, the anti-proliferative effect seem to be mediated through extracellular binding of recombinant galectin-7 to specific cell surface receptors and could be blocked by addition of extracellular galectin-3, supporting the idea that galectin-7 and galectin-3 may have distinct functions. The specific identity of these surface receptors involved remains unclear, however. Because recombinant galectin-7 can bind non-reducing terminal LacNac residues on cell surface receptors as well as internal LacNac oligosaccharide residues (55), the number of receptors that could potentially bind extracellular galectin-7 is relatively large.

4.2. Unexpected roles of galectin-7 in cancer

At first glance, it seems that, given its link with apoptosis and its anti-proliferative effects, galectin-7 should have a negative role in tumor progression. Observations made in several experimental model systems suggest, however, that galectin-7 expression is increased in tumors and may thus favor tumor progression (Table 4). The first hint that galectin-7 may be associated with tumor progression was found in a study reported by Lu et al. (56). Using an experimental rat model of chemically induced mammary carcinoma, Lu and colleagues found that galectin-7 was overexpressed in mammary tumors as compared to normal mammary tissues. Our work in lymphoma and breast cancer also support the possibility that galectin-7 may promote tumorigenesis. In lymphoma, we have shown that galectin-7 expression was induced in aggressive T lymphoma cells generated upon in vivo passages on non-aggressive lymphoma cells in syngenic immunocompetent mice (18). Such a strategy for generating highly metastatic tumor cell lines has been successfully used in the past to identify genes that are involved in tumor progression (for examples, see (57) and (58)). Similar increases in the level of galectin-7 were found in a significant proportion of mature human B-cell lymphoid neoplasms but not in normal B lymphocytes (59). This abnormal expression of galectin-7 is believed to favor dissemination of lymphoma cells; mice injected with T lymphoma transfectants expressing high levels of galectin-7 developed large metastatic tumors in the liver and kidneys with massive infiltration of tumor cells in the parenchyma as compared to mice injected with control lymphoma cells (19). In contrast, only a few scattered tumor foci with limited infiltration were observed when galectin-7 expression was suppressed in highly aggressive lymphoma cells (59). The ability of galectin-7 to induce expression of *MMP-9*, a gene known to confer clinical aggressiveness upon lymphoma cells, may in part explain this capacity of galectin-7 to increase metastasis. This hypothesis is supported by a number of experiments in human cancer (Table 5). Additionally, galectin-7 may confer resistance to apoptosis (15). Indeed, galectins do not always induce or promote apoptosis. For example, it is

Galectin-7 in cancer

Table 4. Galectin-7 in experimental cancer model systems

Tissue/cells	Model systems	Treatment	Observations	References
Mammary tumor tissues	Rat	NMU-induced mammary tumors	Increased expression of galectin-7 in mammary tumors	(56, 101)
Lymphoma	Mouse	5-AZA-deoxycytidine	Increased expression of galectin-7	(24)
Immune-resistant cancer cells	Mouse	Tumor vaccine	Increased galectin-7 expression in immune-resistant cancer cells	(102)
Lymphoma	Mouse	<i>In vivo</i> selection	Increased galectin-7 expression in aggressive variant	(18)
Fibrosis	Hepatic stellate cells (HSC) and transgenic mice harboring alpha2(I) collagen gene (COL1A2) promoter	Hepatocyte growth factor	HGF accelerated nuclear export of Smad3 by enhancing its interaction with galectin-7	(76)
Urothelial cancer	Bladder cancer cell lines with various p53 statuses	Chemotherapeutic cis-diaminedichloroplatinum (CDDP)	Exposure to CDDP induced galectin-7 expression in cell lines with wild-type p53 but not in those with mutated p53	(103)
Acute myeloid leukemia	Cytarabine (Ara-C)-resistant cell lines	Cytarabine (Ara-C), a chemotherapeutic agent for acute myeloid leukemia	Increased expression of galectin-7 in cell lines that were resistant to Ara-C	GDS1907II
Retinoblastoma	Retinoblastoma cell lines	Cisplatin	Decreased expression of galectin-7 in the presence of cisplatin	(104)
Breast cancer	Breast cancer lines ME16C and HME-CC	Doxorubicin or 5-fluorouracil	Increased expression of galectin-7 following treatment	(105, 106)
Kidney	Male Syrian hamster kidney (SHKT) (animal model for the study of estrogen-dependent renal malignancies)	Diethylstilbestrol (DES)	Increased expression of galectin-7 in large renal tumors induced by DES	(107)
Skin tumors	Transgenic mouse	Overexpression of Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in transgenic mice	Overexpression of galectin-7	(108)
Colorectal cancer	Human colon carcinoma cells DLD-1	Overexpression of galectin-7	Suppression of tumor growth and angiogenesis	(53)

Table 5. Modulation of galectin-7 expression in human cancers

Cancer	Normal tissue	Tumor	Role	References
Hematological malignancies	Undetected in B and T lymphocytes	High levels in several hematological disorders, including CLL and follicular lymphoma	Galectin-7 increases the metastatic behavior of lymphoma cells and induces expression of MMP-9	(18, 19, 109, 110)
Breast Cancer	Specifically expressed in myoepithelial cells	Expressed in bami-like and HER-2 positive breast cancers	Increases metastasis to bones and lungs; induces resistance to EGCG-induced apoptosis	(15, 63, 111)
Skin cancer	Expressed in all layers of the epidermis, more intensively in the basal layer	Expressed in benign nevi and melanoma <i>in situ</i> ; undetected in basal cell carcinomas and malignant melanoma	Decreased in metastatic melanoma	(10, 112-115)
Esophageal cancer	Expressed in normal esophageal epithelial tissues	Highly expressed in esophageal squamous cell carcinomas	Associated with well-differentiated tumors	(86)
Cervical cancer	Moderately expressed in squamous epithelial cells	Expressed in cervical cancer tissue	Associated with concurrent chemoradiotherapy sensitivity; increases activation of p38 MAPK, expression of MMP-9 and invasion; decreased expression in cervical intraepithelial neoplasia compared to normal tissue	(80)(116-119)
Thyroid cancer	Undetected in glandular cells	Expressed in multinodular goiters and adenomas and at significantly higher levels in carcinomas	Distinguishes microfollicular adenomas from the encapsulated follicular variant of papillary thyroid carcinomas (high galectin-7 expression)	(80, 120, 121)
Hypopharyngeal and laryngeal cancer	Expressed in epithelial cells	Expressed in hypopharyngeal and laryngeal squamous cell carcinomas	High levels of galectin-7 associated with rapid recurrence rates and dismal prognosis; associated with tumor progression; positive correlation with differentiation and keratinization; positive correlation between MMP-9 and galectin-7 expression in laryngeal tumors	(45, 112, 122, 123)
Lung cancer	Undetected in alveolar cells	Expressed in xenografts of small cell lung cancer cells and in squamous cell carcinoma (non-small cell lung cancer)	Increases in derived cell lines and in secondary xenografts derived from those cell lines	(80, 124-126)
Colon	Undetected in glandular cells	Undetected in colorectal cancer	Galectin-7 induces sensitivity to apoptotic stimuli, negatively regulates cell growth, and retards tumor growth <i>in vivo</i>	(80, 127)
Buccal cancer	Moderately expressed in squamous epithelial cells	Expressed in buccal squamous cell carcinoma (SCC)	Increases in buccal SCC compared to normal tissue	(80, 128)
Neuroblastoma	No data	No data	Reduces cancer cell proliferation by acting on the cell surface	(12)
Bladder cancer	Weakly expressed in urothelial cells	Expressed in bladder squamous cell carcinomas at variable levels	Associated with well-differentiated tumors; induces sensitivity to cisplatin by accumulation of ROS and activation of JNK and BAX; correlates with muscle-infiltrating growth	(84, 129, 130)
Kaposi's Sarcoma	Expressed in epithelial cells of the skin	Expressed in epithelial cells of the AIDS-related Kaposi's sarcoma	No data	(131)

well-known that galectin-3 is associated with resistance to apoptosis in a large number of cell types and diseases, including cancer, and in response to various pro-apoptotic stimuli (reviewed in (60)). Such mechanisms may also explain the ability of galectin-7 to promote metastasis of breast cancer cells to the bone and lung. Using well-characterized breast cancer models, we have found that *de novo* expression of galectin-7 in 4T1 and 66c14 mammary epithelial cells increases their metastatic potential when injected into syngenic Balb/c mice (15). Again, as we observed in lymphoma, aggressive variants of 4T1 mammary cells that metastasize to the bone express higher levels of galectin-7 than their non-aggressive counterparts.

4.3. Galectin-7: a marker for mammary myoepithelial cells and aggressive breast cancer?

In humans, invasive breast carcinomas can be categorized into the following distinct subtypes: luminal A, luminal B, HER2-positive, and basal-like (61)(62). While luminal A and luminal B breast cancer subtypes express the estrogen receptor (ER) and/or progesterone receptor (PR), HER2-positive and basal-like subtypes are hormone receptor negative and have a more aggressive phenotype and a worse prognosis than luminal-type breast carcinomas (61-64). Immunohistochemical experiments using anti-galectin-7 specific antibodies on tissue microarrays (TMAs) constructed from samples obtained from normal breast tissues and breast carcinomas revealed that galectin-7 is exclusively expressed in HER2-positive and ER/PR-negative basal-like breast cancer (15). Not surprisingly, many human basal-like breast cancer cells, such as MDA-MB-468, express galectin-7 constitutively (Y. St-Pierre, *unpublished*). In contrast, most human or mouse breast cancer cell lines with luminal characteristics do not express galectin-7. Interestingly, we also have found that galectin-7 was specifically expressed in mammary myoepithelial (or basal) cells but not in mammary luminal epithelial cells (15). Overall, it is clear that this expression pattern is different from that of other galectins, such as galectin-3, which is specifically expressed in normal luminal epithelial cells (65). Moreover, in contrast to galectin-7, galectin-3 is downregulated during breast cancer progression (66). Thus, if we consider galectin-7 a specific marker of myoepithelial cells (as opposed to luminal cells), this pattern of expression would be consistent with the hypothesis that basal-like breast cancer originates from myoepithelial cells (67). This hypothesis remains controversial, however, because several other markers that are specifically expressed in myoepithelial cells are not expressed in basal-like breast cancers (68). How the luminal and myoepithelial lineages are maintained is currently unclear, although recent work indicates that expression of GATA-3 is essential for luminal differentiation (69). Interestingly, we found that overexpression of galectin-7 is related to absence of GATA-3 (15). These observations, which concerned the protein level, are corroborated by results obtained at the mRNA level in several microarray analyses aimed at defining specific markers for myoepithelial cells or basal-like breast cancers. Microarray studies on normal breast luminal and myoepithelial cells from Jones et al. identified *galectin-7* as a myoepithelial-specific gene (70).

In fact, *galectin-7* ranked first on the list among the 42 most predictive genes that distinguish luminal from myoepithelial cells. A close examination of the genomic profiling data reported by Perou et al., (63), who provided a molecular portrait of 65 surgical specimens of human breast tumors from 42 individuals, reveals that galectin-7 transcripts are highly expressed in cell lines with a basal-like phenotype. Whether the association between galectin-7 and aggressive breast cancer and the ability of galectin-7 to promote metastasis are linked to MMP-9, as is the case in lymphoma, remains to be tested. Interestingly, in breast cancer, suppression of *MMP-9* expression using RNAi technology resulted in complete regression of orthotopic breast tumors in nude mice (71). Similarly, ablation of MMP-9 expression by RNAi inhibits tumor invasion in human breast cancer cells (72). Such a possibility is reminiscent of another major role played by galectins – that of promoting cancer cell migration and 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 contacts during migration to promote integrin-mediated cell adhesion and migration of tumor cells and leukocytes at different stages of metastasis (54, 73-75).

5. OTHER FUNCTIONS FOR GALECTIN-7

Given its specific cellular distribution, it is logical to believe that while galectin-7 shares some functional characteristics with other members of the galectin family, it may fulfill different specific functions in specific cell types (notably in epithelial cells, where it is highly expressed). For instance, galectin-7 is believed to counteract TGF β -mediated effects (76). During their investigations aimed at elucidating how hepatocyte growth factor (HGF) antagonizes TGF β in hepatocytes, Inagaki and colleagues (76) showed that galectin-7 physically interacts with activated forms of Smad2/3, modulating their nuclear export. In the absence of HGF, Smad2 and 3 are responsible for the induction of COL1A2 following TGF β stimulation. Such a role for galectin-7 may not be entirely specific; at least one another member of the galectin family, galectin-1, has been shown to interfere with the TGF β pathway, possibly by preventing Smad2/3 from binding to its specific binding site on the COL1A2 promoter (77). Physical interaction between galectin-1 and Smad proteins in the nucleus has not, however, been confirmed. On the other hand, the ability of galectin-7 to interfere with the TGF β /Smad pathway clearly differs from that of galectin-3, which is elevated in human liver fibrosis and which has been shown to be essential for TGF β -mediated myofibroblast activation and matrix production (78). Thus, while induction of galectin-7 (or galectin-1) expression may prevent hepatic injury, galectin-3 expression must be repressed in order to develop a galectin-based therapeutic approach to the prevention and treatment of liver fibrosis. In cancer, however, this ability of galectin-7 to interfere with Smad2/3-mediated functions may explain, at least in part, its ability to promote cancer progression, because inhibition of Smad3 in mice promotes tumorigenesis (79)

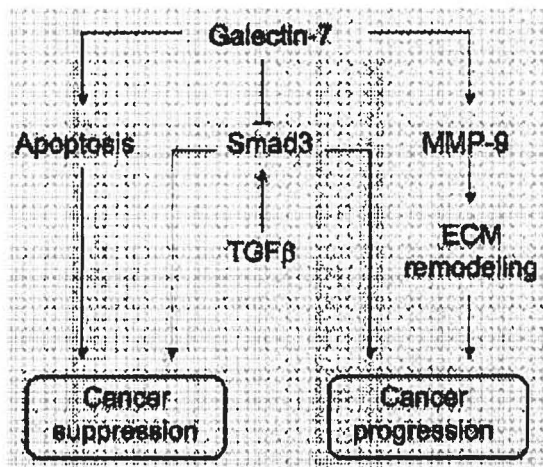


Figure 1. Dual roles of galectin-7 in suppressing and promoting tumor growth. In cancer, the effect of galectin-7 response is highly contextual. *De novo* expression of galectin-7 by p53 is associated with apoptosis, thereby inhibiting tumor growth. Alternatively, galectin-7 may modulate cancer progression by interfering with Smad3. Smad3 is a key regulatory protein in the TGF β signaling pathway, which is known to exert both tumor-suppressive and tumor promoting effects. Paradoxically, galectin-7 may also induce expression of genes that promote cancer progression, including MMP-9, thereby modulating microenvironment modification that cancer cells may exploit to their advantage. In this case, galectin-7 expression could be induced by NF- κ B, a gene known to be expressed in highly aggressive tumor cells and a positive regulator of MMP-9. Such link between NF- κ B and galectin-7 in cancer progression has been suggested by recent gene pathway profiling of a murine breast cancer model. Consequently, therapeutic applications that target galectin-7 needs to be refined by minimizing its protumor functions.

6. CONCLUDING REMARKS

In addition to sharing several structural features with other members of the galectin family, galectin-7 shares several common functional characteristics. For example, like other members of the galectin family, galectin-7 is characterized by the following: 1) it is found in both the cytoplasm and the nucleus of several cell types; 2) its expression is regulated by DNA methylation, 3) it can positively and negatively modulate apoptosis; and 4) it can favor or suppress cancer cell growth. However, beyond these commonly shared properties, there are an increasing number of indications that galectin-7 may have unique properties, most notably regarding its cellular distribution in specific tissues and its apparent preference for intracellular compartments. If galectin-7 expression is indeed restricted to the cytoplasm and the nucleus, its biological functions may be different from what we originally thought. Although glycosylated proteins are present intracellularly, functional roles by galectin-7 that are independent of its CRD should also be investigated, especially after recent reports on the associations between

galectin-7 and specific transcription factors. It is likely that galectin-7 may, in turn, induce the expression of genes essential for tumor invasion and resistance to apoptosis, given its role in inducing MMP genes and its physical interactions with transcription factors (Figure 1). Future structure-function studies with mutated forms of galectin-7 will help clarify this issue. At the same time, a better characterization of the molecular mechanisms regulating its expression in normal and cancer cells is needed to better understand how galectin-7, originally identified as a p53-induced gene, is highly expressed in some cancer cells, promoting their survival, while promoting cell death in other cell types.

7. ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank members of our laboratories for their contributions to the work cited in this review. This work was supported by the Canadian Institutes for Health Research. C.G.C. is supported by the CIHR. A.A.G. is supported by the Fondation Sybilla Hesse.

8. REFERENCES

1. Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, et al: Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell* 76, 597-8 (1994)
2. Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H: Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem* 269, 20807-10 (1994)
3. Yang RY, Rabinovich GA, Liu FT: Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med* 10:e17 (2008)
4. Lobsanov YD, Gitt MA, Leffler H, Barondes SH, Rini JM: X-ray crystal structure of the human dimeric S-Lac lectin, L-14-II, in complex with lactose at 2.9-Å resolution. *J Biol Chem* 268, 27034-8 (1993)
5. Seetharaman J, Kanigsberg A, Slaaby R, Leffler H, Barondes SH, Rini JM: X-ray crystal structure of the human galectin-3 carbohydrate recognition domain at 2.1-Å resolution. *J Biol Chem* 273, 13047-52 (1998)
6. Barboni EA, Bawumia S, Hennick K, Hughes RC: 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* 10, 1201-8 (2000)
7. Ochieng J, Furtak V, Lukyanov P: Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconj J* 19, 527-35 (2004)
8. Ackerman SJ, Liu L, Kwatia MA, Savage MP, Leonidas DD, Swaminathan GJ, et al: Charcot-Leyden crystal protein (galectin-10) is not a dual function galectin with lysophospholipase activity but binds a lysophospholipase inhibitor in a novel structural fashion. *J Biol Chem* 277, 14859-68 (2002)

9. Kubach J, Lutter P, Bopp T, Stoll S, Becker C, Huter E, et al: Human CD41CD251 regulatory T cells: proteome analysis identifies galectin-10 as a novel marker essential for their anergy and suppressive function. *Blood* 110, 1550-8 (2007)
10. Madsen P, Rasmussen HH, Flint T, Gromov P, Kruse TA, Honore B, et al: Cloning, expression, and chromosome mapping of human galectin-7. *J Biol Chem* 270, 5823-9 (1995)
11. Leonidas DD, Vatzaki EH, Vorum H, Celis JE, Madsen P, Acharya KR: Structural basis for the recognition of carbohydrates by human galectin-7. *Biochemistry* 37, 13930-40 (1998)
12. Kopitz J, Andre S, von Reitzenstein C, Versluis K, Kaltner H, Pieters RJ, et al: Homodimeric galectin-7 (p53-induced gene 1) is a negative growth regulator for human neuroblastoma cells. *Oncogene* 22, 6277-88 (2003)
13. Magnaldo T, Fowles D, Darmon M: Galectin-7, a marker of all types of stratified epithelia. *Differentiation* 63, 159-68 (1998)
14. Sato M, Nishi N, Shoji H, Kumagai M, Imaizumi T, Hata Y, et al: Quantification of galectin-7 and its localization in adult mouse tissues. *J Biochem* 131, 255-60 (2002)
15. Demers M, Rose AA, Grosset AA, Biron-Pain K, Gaboury L, Siegel PM, et al: Overexpression of galectin-7, a myoepithelial cell marker, enhances spontaneous metastasis of breast cancer cells. *Am J Pathol* 176, 3023-31 (2010)
16. Nio J, Takahashi-Iwanaga H, Morimatsu M, Kon Y, Iwanaga T: Immunohistochemical and in situ hybridization analysis of galectin-3, a beta-galactoside binding lectin, in the urinary system of adult mice. *Histochem Cell Biol* 126, 45-56 (2006)
17. Nio-Kobayashi J, Takahashi-Iwanaga H, Iwanaga T: Immunohistochemical localization of six galectin subtypes in the mouse digestive tract. *J Histochem Cytochem* ;57, 41-50 (2009)
18. Moisan S, Demers M, Mercier J, Magnaldo T, Potworowski EF, St-Pierre Y: Upregulation of galectin-7 in murine lymphoma cells is associated with progression toward an aggressive phenotype. *Leukemia* 17:751-9 (2003)
19. Demers M, Magnaldo T, St-Pierre Y: A novel function for galectin-7: promoting tumorigenesis by up-regulating MMP-9 gene expression. *Cancer Res* 65, 5205-10 (2005)
20. Salvatore P, Benvenuto G, Caporaso M, Bruni CB, Chiariotti L: High resolution methylation analysis of the galectin-1 gene promoter region in expressing and nonexpressing tissues. *FEBS Lett* 421, 152-8 (1998)
21. Benvenuto G, Carpentieri ML, Salvatore P, Cindolo L, Bruni CB, Chiariotti L: Cell-specific transcriptional regulation and reactivation of galectin-1 gene expression are controlled by DNA methylation of the promoter region. *Mol Cell Biol* 16, 2736-43 (1996)
22. Salvatore P, Benvenuto G, Pero R, Lembo F, Bruni CB, Chiariotti L: Galectin-1 gene expression and methylation state in human T leukemia cell lines. *Int J Oncol* ;17, 1015-8 (2000)
23. Ruebel KH, Jin L, Qian X, Scheithauer BW, Kovacs K, Nakamura N, et al: Effects of DNA methylation on galectin-3 expression in pituitary tumors. *Cancer Res* 65, 1136-40 (2005)
24. Demers M, Couillard J, Giglia-Mari G, Magnaldo T, St-Pierre Y: Increased galectin-7 gene expression in lymphoma cells is under the control of DNA methylation. *Biochem Biophys Res Commun* 387, 425-9 (2009)
25. Dannenberg LO, Edenberg HJ: Epigenetics of gene expression in human hepatoma cells: expression profiling the response to inhibition of DNA methylation and histone deacetylation. *BMC Genomics* 7:181 (2006)
26. Vallender TW, Lahn BT: Localized methylation in the key regulator gene endothelin-1 is associated with cell type-specific transcriptional silencing. *FEBS Lett* 580, 4560-6 (2006)
27. Mueller W, Nutt CL, Ehrlich M, Riemenschneider MJ, von Deimling A, van den Boom D, et al: Downregulation of RUNX3 and TES by hypermethylation in glioblastoma. *Oncogene* 26, 583-93 (2007)
28. Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B: A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 389, 300-5 (1997)
29. Koster MI, Kim S, Roop DR: p63 deficiency: a failure of lineage commitment or stem cell maintenance? *J Invest Dermatol Symp Proc* 10, 118-23 (2005)
30. Demers M, Rose AA, Grosset AA, Biron-Pain K, Gaboury L, Siegel PM, et al: Overexpression of galectin-7, a myoepithelial cell marker, enhances spontaneous metastasis of breast cancer cells. *Am J Pathol* 176, 3023-31 (2010)
31. Karin M: NF-kappaB and cancer: mechanisms and targets. *Mol Carcinog* 45, 355-61 (2006)
32. Bemmo A, Dias C, Rose AA, Russo C, Siegel P, Majewski J: Exon-level transcriptome profiling in murine breast cancer reveals splicing changes specific to tumors with different metastatic abilities. *PLoS One* 5, e11981 (2010)
33. Harrison FL, Wilson TJ: The 14 kDa beta-galactoside binding lectin in myoblast and myotube cultures: localization by confocal microscopy. *J Cell Sci* 101, 635-46 (1992)

34. Thery C, Boussac M, Veron P, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Garin J, et al: Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol* 166, 7309-18 (2001)
35. Keryer-Bibens C, Pioche-Durieu C, Villemant C, Souquere S, Nishi N, Hirashima M, et al: Exosomes released by EBV-infected nasopharyngeal carcinoma cells convey the viral latent membrane protein 1 and the immunomodulatory protein galectin 9. *BMC Cancer* 6:283 (2006)
36. Iurisci I, Tinari N, Natoli C, Angelucci D, Cianchetti E, Iacobelli S: Concentrations of galectin-3 in the sera of normal controls and cancer patients. *Clin Cancer Res* 6, 1389-93 (2000)
37. Saussez S, Glinoeur D, Chantrain G, Pattou F, Carnaille B, Andre S, et al: Serum galectin-1 and galectin-3 levels in benign and malignant nodular thyroid disease. *Thyroid* 18, 705-12 (2008)
38. Saussez S, Lorfèvre F, Lequeux T, Laurent G, Chantrain G, Vertongen F, et al: The determination of the levels of circulating galectin-1 and -3 in HNSCC patients could be used to monitor tumor progression and/or responses to therapy. *Oral Oncol* 44, 86-93 (2008)
39. He J, Baum LG: Endothelial cell expression of galectin-1 induced by prostate cancer cells inhibits T-cell transendothelial migration. *Lab Invest* 86, 578-90 (2006)
40. Tsai CM, Chiu YK, Hsu TL, Lin IY, Hsieh SL, Lin KI: Galectin-1 promotes immunoglobulin production during plasma cell differentiation. *J Immunol* 181, 4570-9 (2008)
41. Motran CC, Molinder KM, Liu SD, Poirier F, Miceli MC: Galectin-1 functions as a Th2 cytokine that selectively induces Th1 apoptosis and promotes Th2 function. *Eur J Immunol* 38, 3015-27 (2008)
42. Gieseke F, Bohringer J, Bussolari R, Dominici M, Handgretinger R, Muller I: Human multipotent mesenchymal stromal cells use galectin-1 to inhibit immune effector cells. *Blood* 116, 3770-9 (2010)
43. Garner OB, Baum LG: Galectin-glycan lattices regulate cell-surface glycoprotein organization and signalling. *Biochem Soc Trans* 36, 1472-7 (2008)
44. Partridge EA, Le Roy C, Di Guglielmo GM, Pawling J, Cheung P, Granovsky M, et al: Regulation of cytokine receptors by Golgi N-glycan processing and endocytosis. *Science* 306, 120-4 (2004)
45. Saussez S, Decaestecker C, Lorfèvre F, Chevalier D, Mortuaire G, Kaltner H, 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* 52, 483-93 (2008)
46. Kuwabara I, Kuwabara Y, Yang RY, Schuler M, Green DR, Zuraw BL, et al: Galectin-7 (PIG1) exhibits pro-apoptotic function through JNK activation and mitochondrial cytochrome c release. *J Biol Chem* 277, 3487-97 (2002)
47. Timmons PM, Colnot C, Cail I, Poirier F, Magnaldo T: Expression of galectin-7 during epithelial development coincides with the onset of stratification. *Int J Dev Biol* 43, 229-35 (1999)
48. Bernerd F, Sarasin A, Magnaldo T: Galectin-7 overexpression is associated with the apoptotic process in UVB-induced sunburn keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11329-34 (1999)
49. Cao Z, Said N, Amin S, Wu HK, Bruce A, Garate M, et al: Galectins-3 and -7, but not galectin-1, play a role in re-epithelialization of wounds. *J Biol Chem* 277, 42299-305 (2002)
50. Cao Z, Wu HK, Bruce A, Wollenberg K, Panjwani N: Detection of differentially expressed genes in healing mouse corneas, using cDNA microarrays. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 2897-904 (2002)
51. Cao Z, Said N, Wu HK, Kuwabara I, Liu FT, Panjwani N: Galectin-7 as a potential mediator of corneal epithelial cell migration. *Arch Ophthalmol* 121, 82-6 (2003)
52. Gendronneau G, Sidhu SS, Delacour D, Dang T, Calonne C, Houzelstein D, et al: Galectin-7 in the control of epidermal homeostasis after injury. *Mol Biol Cell* 19, 5541-9 (2008)
53. Ueda S, Kuwabara I, Liu FT: Suppression of tumor growth by galectin-7 gene transfer. *Cancer Res* 64, 5672-6 (2004)
54. Liu FT, Rabinovich GA: Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer* 5, 29-41 (2005)
55. Brewer CF: Thermodynamic binding studies of galectin-1, -3 and -7. *Glycoconj J* 19, 459-65 (2004)
56. Lu J, Pei H, Kaeck M, Thompson HJ: Gene expression changes associated with chemically induced rat mammary carcinogenesis. *Mol Carcinog* 20, 204-15 (1997)
57. Antoine E, Pauwels C, Verrelle P, Lascaux V, Poupon MF: In vivo emergence of a highly metastatic tumour cell line from a rat rhabdomyosarcoma after treatment with an alkylating agent. *Br J Cancer* 57, 469-74 (1988)
58. McElroy MK, Kaushal S, Tran Cao HS, Moossa AR, Talamini MA, Hoffman RM, et al: Upregulation of thrombospondin-1 and angiogenesis in an aggressive human pancreatic cancer cell line selected for high metastasis. *Mol Cancer Ther* 8, 1779-86 (2009)

59. Demers M, Biron-Pain K, Hebert J, Lamarre A, Magnaldo T, St-Pierre Y: Galectin-7 in lymphoma: elevated expression in human lymphoid malignancies and decreased lymphoma dissemination by antisense strategies in experimental model. *Cancer Res* 67, 2824-9 (2007)
60. Nakahara S, Oka N, Raz A: On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. *Apoptosis* 10, 267-75 (2005)
61. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al: Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10869-74 (2001)
62. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al: Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8418-23 (2003)
63. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al: Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747-52 (2000)
64. Fan C, Oh DS, Wessels L, Weigelt B, Nuyten DS, Nobel AB, et al: Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med* 355, 560-9 (2006)
65. Mackay A, Jones C, Dexter T, Silva RL, Bulmer K, Jones A, et al: cDNA microarray analysis of genes associated with ERBB2 (HER2/neu) overexpression in human mammary luminal epithelial cells. *Oncogene* 22, 2680-8 (2003)
66. Castronovo V, Van Den Brule FA, Jackers P, Clausse N, Liu FT, Gillet C, et al: Decreased expression of galectin-3 is associated with progression of human breast cancer. *J Pathol* 179, 43-8 (1996)
67. Rakha EA, El-Sayed ME, Reis-Filho J, Ellis IO: Pathobiological aspects of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 113, 411-22 (2009)
68. Gusterson B: Do 'basal-like' breast cancers really exist? *Nat Rev Cancer* 9, 128-34 (2009)
69. Asselin-Labat ML, Sutherland KD, Barker H, Thomas R, Shackleton M, Forrest NC, et al: Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation. *Nat Cell Biol* 9, 201-9 (2007)
70. Jones C, Mackay A, Grigoriadis A, Cossu A, Reis-Filho JS, Fulford L, et al: Expression profiling of purified normal human luminal and myoepithelial breast cells: identification of novel prognostic markers for breast cancer. *Cancer Res* 64, 3037-45 (2004)
71. Kunigal S, Lakka SS, Gondi CS, Estes N, Rao JS: RNAi-mediated downregulation of urokinase plasminogen activator receptor and matrix metalloproteinase-9 in human breast cancer cells results in decreased tumor invasion, angiogenesis and growth. *Int J Cancer* 121, 2307-16 (2007)
72. Safina A, Vandette E, Bakin AV: ALK5 promotes tumor angiogenesis by upregulating matrix metalloproteinase-9 in tumor cells. *Oncogene* 26, 2407-22 (2007)
73. Hikita C, Vijayakumar S, Takito J, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Al-Awqati Q: Induction of terminal differentiation in epithelial cells requires polymerization of hensin by galectin 3. *J Cell Biol* 151, 1235-46 (2000)
74. Hittel A, Legendre H, Nagy N, Bronckart Y, Pector JC, Salmon I, et al: Upregulation of galectins-1 and -3 in human colon cancer and their role in regulating cell migration. *Int J Cancer* 103, 370-9 (2003)
75. Moiseeva EP, Williams B, Goodall AH, Samani NJ: Galectin-1 interacts with beta-1 subunit of integrin. *Biochem Biophys Res Commun* 310, 1010-6 (2003)
76. Inagaki Y, Higashi K, Kushida M, Hong YY, Nakao S, Higashiyama R, et al: Hepatocyte growth factor suppresses profibrogenic signal transduction via nuclear export of Smad3 with galectin-7. *Gastroenterology* 134, 1180-90 (2008)
77. Okano K, Uchida K, Nitta K, Hayashida T: Galectin-1 suppresses alpha2(I) collagen through Smad3 in renal epithelial cells. *Cell Mol Life Sci* 65, 3304-11 (2008)
78. Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Poirier F, Russo FP, Iredale JP, et al: Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5060-5 (2006)
79. Zhu Y, Richardson JA, Parada LF, Graff JM: Smad3 mutant mice develop metastatic colorectal cancer. *Cell* 94, 703-14 (1998)
80. www.proteinatlas.org.
81. Rendl M, Lewis L, Fuchs E: Molecular dissection of mesenchymal-epithelial interactions in the hair follicle. *PLoS Biol* 3, e331 (2005)
82. Marra M, Hillier L, Allen M, Bowles M, Dietrich N, Dubuque T, Geisel S, Kucaba T, Lacy M, Le M, Martin J, Morris M, Schellenberg K, Steptoe M, Tan F, Underwood K, Moore B, Theising B, Wylie T, Lennon G, Soares B, Wilson R, Waterston R: The WashU-HHMI Mouse EST Project. GDS868 record. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/profile/>
83. Lohr M, Lensch M, Andre S, Kaltner H, Siebert HC, Smetana K, Jr., et al: Murine homodimeric adhesion/growth-regulatory galectins-1, -2 and -7: comparative profiling of gene/ promoter sequences by database mining, of expression by RT-PCR/immunohistochemistry and of contact sites for carbohydrate ligands by computational chemistry. *Folia Biol (Praha)* 53, 109-28 (2007)

84. Langbein S, Brade J, Badawi JK, Hatzinger M, Kaltner H, Lensch M, et al: Gene-expression signature of adhesion/growth-regulatory tissue lectins (galectins) in transitional cell cancer and its prognostic relevance. *Histopathology* 51, 681-90 (2007)
85. Klattig J, Sierig R, Kruspe D, Besenbeck B, Englert C: Wilms' Tumor Protein Wt1 Is an Activator of the Anti-Müllerian Hormone Receptor Gene *Ahr2*. *Mol Cell Biol* 27, 4355-64 (2007)
86. Zhu X, Ding M, Yu ML, Feng MX, Tan LJ, Zhao FK: Identification of galectin-7 as a potential biomarker for esophageal squamous cell carcinoma by proteomic analysis. *BMC Cancer* 10, 290 (2010)
87. Nio J, Kon Y, Iwanaga T: Differential Cellular Expression of Galectin Family mRNAs in the Epithelial Cells of the Mouse Digestive Tract. *J Histochem Cytochem* 53, 1323-34 (2005)
88. Young PP, Modur V, Teleron AA, Ladenson JH: Enrichment of Genes in the Aortic Intima That Are Associated With Stratified Epithelium: Implications of Underlying Biomechanical and Barrier Properties of the Arterial Intima. *Circulation* 111, 2382-90 (2005)
89. Elvidge GP, Glenny L, Appelhoff RJ, Ratcliffe PJ, Ragoussis J, Gleadle JM: Concordant regulation of gene expression by hypoxia and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase inhibition: the role of HIF-1alpha, HIF-2alpha, and other pathways. *J Biol Chem* 281, 15215-26 (2006)
90. Koster MI, Kim S, Huang J, Williams T, Roop DR: TAp63alpha induces AP-2gamma as an early event in epidermal morphogenesis. *Dev Biol* 289, 253-61 (2006)
91. Lucerna M, Pomyje J, Mechtcheriakova D, Kadl A, Gruber F, Bilban M, et al: Sustained expression of early growth response protein-1 blocks angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res* 66, 6708-13 (2006)
92. Richardson GD, Bazzi H, Fantauzzo KA, Waters JM, Crawford H, Hynd P, et al: KGF and EGF signalling block hair follicle induction and promote interfollicular epidermal fate in developing mouse skin. *Development* 136, 2153-64 (2009)
93. Hanson JL, Hawke NA, Kashatus D, Baldwin AS: The nuclear factor kappaB subunits RelA/p65 and c-Rel potentiate but are not required for Ras-induced cellular transformation. *Cancer Res* 64, 7248-55 (2004)
94. Carroll JS, Meyer CA, Song J, Li W, Geistlinger TR, Eeckhoutte J, et al: Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. *Nat Genet* 38, 1289-97 (2006)
95. Zhang J, Smolen GA, Haber DA: Negative regulation of YAP by LATS1 underscores evolutionary conservation of the Drosophila Hippo pathway. *Cancer Res* 68, 2789-94 (2008)
96. Wu W, Zou M, Brickley DR, Pew T, Conzen SD: Glucocorticoid receptor activation signals through forkhead transcription factor 3a in breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 20, 2304-14 (2006)
97. Guo S, Lu J, Subramanian A, Sonenshein GE: Microarray-assisted pathway analysis identifies mitogen-activated protein kinase signaling as a mediator of resistance to the green tea polyphenol epigallocatechin 3-gallate in her-2/neu-overexpressing breast cancer cells. *Cancer Res* 66, 5322-9 (2006)
98. Landis MD, Seachrist DD, Abdul-Karim FW, Keri RA: Sustained trophism of the mammary gland is sufficient to accelerate and synchronize development of ErbB2/Neu-induced tumors. *Oncogene* 25, 3325-34 (2006)
99. Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, Ramachandran K, Mullendore M, Lee KH, et al: Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell* 26, 745-52 (2007)
100. Magnaldo T, Bernerd F, Darmon M: Galectin-7, a human 14-kDa S-lectin, specifically expressed in keratinocytes and sensitive to retinoic acid. *Dev Biol* 168, 259-71 (1995)
101. Chan MM, Lu X, Merchant FM, Iglehart JD, Miron PL: Gene expression profiling of NMU-induced rat mammary tumors: cross species comparison with human breast cancer. *Carcinogenesis* 26, 1343-53 (2005)
102. Lin KY, Lu D, Hung CF, Peng S, Huang L, Jie C, et al: Ectopic expression of vascular cell adhesion molecule-1 as a new mechanism for tumor immune evasion. *Cancer Res* 67, 1832-41 (2007)
103. Matsui Y, Ueda S, Watanabe J, Kuwabara I, Ogawa O, Nishiyama H: Sensitizing effect of galectin-7 in urothelial cancer to cisplatin through the accumulation of intracellular reactive oxygen species. *Cancer Res* 67, 1212-20 (2007)
104. Liu H, Knabb JR, Spike BT, Macleod KF: Elevated poly-(ADP-ribose)-polymerase activity sensitizes retinoblastoma-deficient cells to DNA damage-induced necrosis. *Mol Cancer Res* 7, 1099-109 (2009)
105. Troester MA, Hoadley KA, Sorlie T, Herbert BS, Borresen-Dale AL, Lonning PE, et al: Cell-type-specific responses to chemotherapeutics in breast cancer. *Cancer Res* 64, 4218-26 (2004)
106. Troester MA, Hoadley KA, Parker JS, Perou CM: Prediction of toxicant-specific gene expression signatures after chemotherapeutic treatment of breast cell lines. *Environ Health Perspect* 112, 1607-13 (2004)
107. Saussez S, Nonclercq D, Laurent G, Wattiez R, Andre S, Kaltner H, et al: Toward functional glycomics by localization of tissue lectins: immunohistochemical galectin fingerprinting during diethylstilbestrol-induced kidney tumorigenesis in male Syrian hamster. *Histochem Cell Biol* 123, 29-41 (2005)

108. Shen J, Riggs PK, Hensley SC, Schroeder LJ, Traner AR, Kochan KJ, et al: Differential expression of multiple anti-apoptotic proteins in epidermis of IGF-1 transgenic mice as revealed by 2-dimensional gel electrophoresis/mass spectrometry analysis. *Mol Carcinog* 46, 331-40 (2007)
109. Demers MI, Biron-Pain K, HÃ©bert Je, Lamarre A, Magnaldo T, St-Pierre Y: Galectin-7 in Lymphoma: Elevated Expression in Human Lymphoid Malignancies and Decreased Lymphoma Dissemination by Antisense Strategies in Experimental Model. *Cancer Research* 67, 2824-9 (2007)
110. Critchley-Thorne RJ, Yan N, Nacu S, Weber J, Holmes SP, Lee PP: Down-regulation of the interferon signaling pathway in T lymphocytes from patients with metastatic melanoma. *PLoS Med* 4, e176 (2007)
111. Lu J, Pei H, Kaeck M, Thompson HJ: Gene expression changes associated with chemically induced rat mammary carcinogenesis. *Molecular Carcinogenesis* 20, 204-15 (1997)
112. Cada Z, Chovanec M, Smetana K, Betka J, Lacina L, Plzak J, et al: Galectin-7: will the lectin's activity establish clinical correlations in head and neck squamous cell and basal cell carcinomas? *Histol Histopathol* 24, 41-8 (2009)
113. Riker AI, Enkemann SA, Fodstad O, Liu S, Ren S, Morris C, et al: The gene expression profiles of primary and metastatic melanoma yields a transition point of tumor progression and metastasis. *BMC Med Genomics* 1, 13 (2008)
114. Smith AP, Hoek K, Becker D: Whole-genome expression profiling of the melanoma progression pathway reveals marked molecular differences between nevi/melanoma in situ and advanced-stage melanomas. *Cancer Biol Ther* 4, 1018-29 (2005)
115. Talantov D, Mazumder A, Yu JX, Briggs T, Jiang Y, Backus J, et al: Novel Genes Associated with Malignant Melanoma but not Benign Melanocytic Lesions. *Clinical Cancer Research* 11, 7234-42 (2005)
116. Zhu H, Pei H-p, Zeng S, Chen J, Shen L-f, Zhong M-z, et al: Profiling Protein Markers Associated with the Sensitivity to Concurrent Chemoradiotherapy in Human Cervical Carcinoma. *Journal of Proteome Research* 8, 3969-76 (2009)
117. Park JE, Chang WY, Cho M: Induction of matrix metalloproteinase-9 by galectin-7 through p38 MAPK signaling in HeLa human cervical epithelial adenocarcinoma cells. *Oncol Rep* 22, 1373-9 (2009)
118. Shadeo A, Chari R, Vatcher G, Campbell J, Lonergan KM, Maticic J, et al: Comprehensive serial analysis of gene expression of the cervical transcriptome. *BMC Genomics* 8, 142 (2007)
119. Scotto L, Narayan G, Nandula SV, Arias-Pulido H, Subramaniyam S, Schneider A, et al: Identification of copy number gain and overexpressed genes on chromosome arm 20q by an integrative genomic approach in cervical cancer: Potential role in progression. *Genes, Chromosomes and Cancer* 47, 755-65 (2008)
120. Rorive S, Edlafali B, Fernandez S, Decaestecker C, Andre S, Kaltner H, et al: Changes in galectin-7 and cytokeratin-19 expression during the progression of malignancy in thyroid tumors: diagnostic and biological implications. *Mod Pathol* 15, 1294-301 (2002)
121. Than TH, Swelthadri GK, Wong J, Ahmad T, Jamil D, Maganlal RK, et al: Expression of Galectin-3 and Galectin-7 in thyroid malignancy as potential diagnostic indicators. *Singapore Med J* 49, 333-8 (2008)
122. Saussez S, Cludts S, Capouillez A, Mortuaire G, Smetana K, Jr., Kaltner H, 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* 34, 433-9 (2009)
123. Saussez S, Cucu D-R, Decaestecker C, Chevalier D, Kaltner H, AndrÃ© S, et al: Galectin 7 (p53-Induced Gene 1): A New Prognostic Predictor of Recurrence and Survival in Stage IV Hypopharyngeal Cancer. *Annals of Surgical Oncology* 13, 999-1009 (2006)
124. Wachi S, Yoneda K, Wu R: Interactome-transcriptome analysis reveals the high centrality of genes differentially expressed in lung cancer tissues. *Bioinformatics* 21, 4205-8 (2005)
125. Kuner R, Muley T, Meister M, Ruschhaupt M, Bunes A, Xu EC, et al: Global gene expression analysis reveals specific patterns of cell junctions in non-small cell lung cancer subtypes. *Lung Cancer* 63, 32-8 (2009)
126. Daniel VC, Marchionni L, Hierman JS, Rhodes JT, Devereaux WL, Rudin CM, et al: A Primary Xenograft Model of Small-Cell Lung Cancer Reveals Irreversible Changes in Gene Expression Imposed by Culture In vitro. *Cancer Research* 69, 3364-73 (2009)
127. Ueda S, Kuwabara I, Liu F-T: Suppression of Tumor Growth by Galectin-7 Gene Transfer. *Cancer Research* 64, 5672-6 (2004)
128. Chen J, He Q-Y, Yuen AP-W, Chiu J-F: Proteomics of buccal squamous cell carcinoma: The involvement of multiple pathways in tumorigenesis. *PROTEOMICS* 4, 2465-75 (2004)
129. Matsui Y, Ueda S, Watanabe J, Kuwabara I, Ogawa O, Nishiyama H: Sensitizing Effect of Galectin-7 in Urothelial Cancer to Cisplatin through the Accumulation of Intracellular Reactive Oxygen Species. *Cancer Research* 67, 1212-20 (2007)
130. Ostergaard M, Rasmussen HH, Nielsen HV, Vorum H, Omtoft TF, Wolf H, et al: Proteome profiling of bladder squamous cell carcinomas: identification of markers that define their degree of differentiation. *Cancer Res* 57, 4111-7 (1997)

Galectin-7 in cancer

131. Cornelissen M, van der Kuyf AC, van den Burg R, Zorgdrager F, van Noesel CJ, Goudsmit J. Gene expression profile of AIDS-related Kaposi's sarcoma. *BMC Cancer* 3, 7 (2003)

Key Words: Galectins, Apoptosis, Mammary Cancer, Mammary Myoepithelial Cells, p53, Review

Send correspondence to: Yves St-Pierre, INRS-Institut Armand-Frappier, 531 Boul. des Prairies, Laval, Quebec, Canada H7V1B7, Tel: 450-686-5354, Fax: 450-686-5501, E-mail: yves.st-pierre@iaf.inrs.ca

<http://www.bioscience.org/current/vol17.htm>

RÉFÉRENCES

1. Watson, C.J. and W.T. Khaled, *Mammary development in the embryo and adult: a journey of morphogenesis and commitment*. *Development*, 2008. **135**(6): p. 995-1003.
2. Visvader, J.E., *Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis*. *Genes Dev*, 2009. **23**(22): p. 2563-77.
3. Adriance, M.C., J.L. Inman, O.W. Petersen, and M.J. Bissell, *Myoepithelial cells: good fences make good neighbors*. *Breast Cancer Res*, 2005. **7**(5): p. 190-7.
4. Tiede, B. and Y. Kang, *From milk to malignancy: the role of mammary stem cells in development, pregnancy and breast cancer*. *Cell Res*, 2011. **21**(2): p. 245-57.
5. Vafaizadeh, V., P.A. Klemmt, and B. Groner, *Stat5 assumes distinct functions in mammary gland development and mammary tumor formation*. *Front Biosci*, 2012. **17**: p. 1232-50.
6. Mannello, F., G.A. Tonti, and F. Canestrari, *Nutrients and nipple aspirate fluid composition: the breast microenvironment regulates protein expression and cancer aetiology*. *Genes Nutr*, 2008. **3**(2): p. 77-85.
7. Petersen, O.W. and K. Polyak, *Stem cells in the human breast*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010. **2**(5): p. a003160.
8. Booth, B.W. and G.H. Smith, *Estrogen receptor-alpha and progesterone receptor are expressed in label-retaining mammary epithelial cells that divide asymmetrically and retain their template DNA strands*. *Breast Cancer Res*, 2006. **8**(4): p. R49.
9. Stingl, J., P. Eirew, I. Ricketson, M. Shackleton, F. Vaillant, D. Choi, H.I. Li, and C.J. Eaves, *Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells*. *Nature*, 2006. **439**(7079): p. 993-7.
10. Tiede, B.J., L.A. Owens, F. Li, C. DeCoste, and Y. Kang, *A novel mouse model for non-invasive single marker tracking of mammary stem cells in vivo reveals stem cell dynamics throughout pregnancy*. *PLoS One*, 2009. **4**(11): p. e8035.
11. Vaillant, F., M.L. Asselin-Labat, M. Shackleton, N.C. Forrest, G.J. Lindeman, and J.E. Visvader, *The mammary progenitor marker CD61/beta3 integrin identifies cancer stem cells in mouse models of mammary tumorigenesis*. *Cancer Res*, 2008. **68**(19): p. 7711-7.
12. Jones, C., A. Mackay, A. Grigoriadis, A. Cossu, J.S. Reis-Filho, L. Fulford, T. Dexter, S. Davies, K. Bulmer, E. Ford, S. Parry, M. Budroni, G. Palmieri, A.M. Neville, M.J. O'Hare, and S.R. Lakhani, *Expression profiling of purified normal human luminal and myoepithelial breast cells: identification of novel prognostic markers for breast cancer*. *Cancer Res*, 2004. **64**(9): p. 3037-45.
13. Tsubura, A., H. Okada, H. Senzaki, T. Hatano, and S. Morii, *Keratin expression in the normal breast and in breast carcinoma*. *Histopathology*, 1991. **18**(6): p. 517-22.
14. Shehata, M., A. Teschendorff, G. Sharp, N. Novcic, I.A. Russell, S. Avril, M. Prater, P. Eirew, C. Caldas, and C.J. Watson, *Phenotypic and functional characterisation of the luminal cell hierarchy of the mammary gland*. *Breast Cancer Res*, 2012. **14**(5): p. R134.
15. Nagle, R.B., W. Bocker, J.R. Davis, H.W. Heid, M. Kaufmann, D.O. Lucas, and E.D. Jarasch, *Characterization of breast carcinomas by two monoclonal antibodies distinguishing myoepithelial from luminal epithelial cells*. *J Histochem Cytochem*, 1986. **34**(7): p. 869-81.
16. Gudjonsson, T., M.C. Adriance, M.D. Sternlicht, O.W. Petersen, and M.J. Bissell, *Myoepithelial cells: their origin and function in breast morphogenesis and neoplasia*. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2005. **10**(3): p. 261-72.
17. Barbareschi, M., L. Pecciarini, M.G. Cangì, E. Macri, A. Rizzo, G. Viale, and C. Doglioni, *p63, a p53 homologue, is a selective nuclear marker of myoepithelial cells of the human breast*. *Am J Surg Pathol*, 2001. **25**(8): p. 1054-60.

18. Gudjonsson, T., L. Ronnov-Jessen, R. Villadsen, F. Rank, M.J. Bissell, and O.W. Petersen, *Normal and tumor-derived myoepithelial cells differ in their ability to interact with luminal breast epithelial cells for polarity and basement membrane deposition*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 1): p. 39-50.
19. Li, S., D. Edgar, R. Fassler, W. Wadsworth, and P.D. Yurchenco, *The role of laminin in embryonic cell polarization and tissue organization*. Dev Cell, 2003. **4**(5): p. 613-24.
20. Sternlicht, M.D. and S.H. Barsky, *The myoepithelial defense: a host defense against cancer*. Med Hypotheses, 1997. **48**(1): p. 37-46.
21. Sternlicht, M.D., P. Kedeshian, Z.M. Shao, S. Safarians, and S.H. Barsky, *The human myoepithelial cell is a natural tumor suppressor*. Clin Cancer Res, 1997. **3**(11): p. 1949-58.
22. Perou, C.M., T. Sorlie, M.B. Eisen, M. van de Rijn, S.S. Jeffrey, C.A. Rees, J.R. Pollack, D.T. Ross, H. Johnsen, L.A. Akslen, O. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S.X. Zhu, P.E. Lonning, A.L. Borresen-Dale, P.O. Brown, and D. Botstein, *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 747-52.
23. Callagy, G., E. Cattaneo, Y. Daigo, L. Happerfield, L.G. Bobrow, P.D. Pharoah, and C. Caldas, *Molecular classification of breast carcinomas using tissue microarrays*. Diagn Mol Pathol, 2003. **12**(1): p. 27-34.
24. Calza, S., P. Hall, G. Auer, J. Bjohle, S. Klaar, U. Kronenwett, E.T. Liu, L. Miller, A. Ploner, J. Smeds, J. Bergh, and Y. Pawitan, *Intrinsic molecular signature of breast cancer in a population-based cohort of 412 patients*. Breast Cancer Res, 2006. **8**(4): p. R34.
25. Weigelt, B., Z. Hu, X. He, C. Livasy, L.A. Carey, M.G. Ewend, A.M. Glas, C.M. Perou, and L.J. Van't Veer, *Molecular portraits and 70-gene prognosis signature are preserved throughout the metastatic process of breast cancer*. Cancer Res, 2005. **65**(20): p. 9155-8.
26. Sorlie, T., C.M. Perou, R. Tibshirani, T. Aas, S. Geisler, H. Johnsen, T. Hastie, M.B. Eisen, M. van de Rijn, S.S. Jeffrey, T. Thorsen, H. Quist, J.C. Matese, P.O. Brown, D. Botstein, P.E. Lonning, and A.L. Borresen-Dale, *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(19): p. 10869-74.
27. Nevins, J.R., E.S. Huang, H. Dressman, J. Pittman, A.T. Huang, and M. West, *Towards integrated clinico-genomic models for personalized medicine: combining gene expression signatures and clinical factors in breast cancer outcomes prediction*. Hum Mol Genet, 2003. **12 Spec No 2**: p. R153-7.
28. Beaton, G., *On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment with illustrative cases*. Lancet, 1896. **148**: p. 162-165.
29. Korach, K.S., J.F. Couse, S.W. Curtis, T.F. Washburn, J. Lindzey, K.S. Kimbro, E.M. Eddy, S. Migliaccio, S.M. Snedeker, D.B. Lubahn, D.W. Schomberg, and E.P. Smith, *Estrogen receptor gene disruption: molecular characterization and experimental and clinical phenotypes*. Recent Prog Horm Res, 1996. **51**: p. 159-86; discussion 186-8.
30. Humphreys, R.C., J.P. Lydon, B.W. O'Malley, and J.M. Rosen, *Use of PRKO mice to study the role of progesterone in mammary gland development*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 1997. **2**(4): p. 343-54.
31. Clarke, R.B., A. Howell, C.S. Potten, and E. Anderson, *Dissociation between steroid receptor expression and cell proliferation in the human breast*. Cancer Res, 1997. **57**(22): p. 4987-91.

32. Grimm, S.L. and J.M. Rosen, *Stop! In the name of transforming growth factor-beta: keeping estrogen receptor-alpha-positive mammary epithelial cells from proliferating*. Breast Cancer Res, 2006. **8**(4): p. 106.
33. Fernandez-Valdivia, R. and J.P. Lydon, *From the ranks of mammary progesterone mediators, RANKL takes the spotlight*. Mol Cell Endocrinol, 2012. **357**(1-2): p. 91-100.
34. Derynck, R., R.J. Akhurst, and A. Balmain, *TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression*. Nat Genet, 2001. **29**(2): p. 117-29.
35. Joshi, P.A., H.W. Jackson, A.G. Beristain, M.A. Di Grappa, P.A. Mote, C.L. Clarke, J. Stingl, P.D. Waterhouse, and R. Khokha, *Progesterone induces adult mammary stem cell expansion*. Nature, 2010. **465**(7299): p. 803-7.
36. Kouros-Mehr, H., J.W. Kim, S.K. Bechis, and Z. Werb, *GATA-3 and the regulation of the mammary luminal cell fate*. Curr Opin Cell Biol, 2008. **20**(2): p. 164-70.
37. Kouros-Mehr, H., E.M. Slorach, M.D. Sternlicht, and Z. Werb, *GATA-3 maintains the differentiation of the luminal cell fate in the mammary gland*. Cell, 2006. **127**(5): p. 1041-55.
38. Kouros-Mehr, H., S.K. Bechis, E.M. Slorach, L.E. Littlepage, M. Egeblad, A.J. Ewald, S.Y. Pai, I.C. Ho, and Z. Werb, *GATA-3 links tumor differentiation and dissemination in a luminal breast cancer model*. Cancer Cell, 2008. **13**(2): p. 141-52.
39. Voduc, D., M. Cheang, and T. Nielsen, *GATA-3 expression in breast cancer has a strong association with estrogen receptor but lacks independent prognostic value*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008. **17**(2): p. 365-73.
40. Mehra, R., S. Varambally, L. Ding, R. Shen, M.S. Sabel, D. Ghosh, A.M. Chinnaiyan, and C.G. Klee, *Identification of GATA3 as a breast cancer prognostic marker by global gene expression meta-analysis*. Cancer Res, 2005. **65**(24): p. 11259-64.
41. Burgess, A.W., H.S. Cho, C. Eigenbrot, K.M. Ferguson, T.P. Garrett, D.J. Leahy, M.A. Lemmon, M.X. Sliwkowski, C.W. Ward, and S. Yokoyama, *An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors*. Mol Cell, 2003. **12**(3): p. 541-52.
42. Cho, H.S., K. Mason, K.X. Ramyar, A.M. Stanley, S.B. Gabelli, D.W. Denney, Jr., and D.J. Leahy, *Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab*. Nature, 2003. **421**(6924): p. 756-60.
43. Slamon, D.J., G.M. Clark, S.G. Wong, W.J. Levin, A. Ullrich, and W.L. McGuire, *Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene*. Science, 1987. **235**(4785): p. 177-82.
44. Roskoski, R., Jr., *The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **319**(1): p. 1-11.
45. Arteaga, C.L., M.X. Sliwkowski, C.K. Osborne, E.A. Perez, F. Puglisi, and L. Gianni, *Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives*. Nat Rev Clin Oncol, 2012. **9**(1): p. 16-32.
46. Ross, J.S. and J.A. Fletcher, *HER-2/neu (c-erb-B2) gene and protein in breast cancer*. Am J Clin Pathol, 1999. **112**(1 Suppl 1): p. S53-67.
47. Ross, J.S. and J.A. Fletcher, *The HER-2/neu oncogene: prognostic factor, predictive factor and target for therapy*. Semin Cancer Biol, 1999. **9**(2): p. 125-38.
48. Gudmundsdottir, K. and A. Ashworth, *The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability*. Oncogene, 2006. **25**(43): p. 5864-74.
49. Levine, A.J., J. Momand, and C.A. Finlay, *The p53 tumour suppressor gene*. Nature, 1991. **351**(6326): p. 453-6.
50. Lane, D.P., *Cancer. p53, guardian of the genome*. Nature, 1992. **358**(6381): p. 15-6.

51. Easton, D.F., J.L. Hopper, D.C. Thomas, A. Antoniou, P.D. Pharoah, A.S. Whittemore, and R.W. Haile, *Breast cancer risks for BRCA1/2 carriers*. *Science*, 2004. **306**(5705): p. 2187-91; author reply 2187-91.
52. Elledge, R.M. and D.C. Allred, *The p53 tumor suppressor gene in breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 1994. **32**(1): p. 39-47.
53. Zhang, H., K. Somasundaram, Y. Peng, H. Tian, H. Zhang, D. Bi, B.L. Weber, and W.S. El-Deiry, *BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity*. *Oncogene*, 1998. **16**(13): p. 1713-21.
54. Ouchi, T., A.N. Monteiro, A. August, S.A. Aaronson, and H. Hanafusa, *BRCA1 regulates p53-dependent gene expression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(5): p. 2302-6.
55. Arizti, P., L. Fang, I. Park, Y. Yin, E. Solomon, T. Ouchi, S.A. Aaronson, and S.W. Lee, *Tumor suppressor p53 is required to modulate BRCA1 expression*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(20): p. 7450-9.
56. Foulkes, W.D., *BRCA1--sowing the seeds crooked in the furrow*. *Nat Genet*, 2008. **40**(1): p. 8-9.
57. Guberghin, D.C. and C. Wilson, *PTEN: tumour suppressor, multifunctional growth regulator and more*. *Hum Mol Genet*, 2003. **12 Spec No 2**: p. R239-48.
58. Turner, N.C. and J.S. Reis-Filho, *Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype*. *Oncogene*, 2006. **25**(43): p. 5846-53.
59. Foulkes, W.D., I.M. Stefansson, P.O. Chappuis, L.R. Begin, J.R. Goffin, N. Wong, M. Trudel, and L.A. Akslen, *Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer*. *J Natl Cancer Inst*, 2003. **95**(19): p. 1482-5.
60. Meyer, P., K. Landgraf, B. Hogel, W. Eiermann, and B. Ataseven, *BRCA2 mutations and triple-negative breast cancer*. *PLoS One*, 2012. **7**(5): p. e38361.
61. Brosh, R. and V. Rotter, *When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field*. *Nat Rev Cancer*, 2009. **9**(10): p. 701-13.
62. Prat, A. and C.M. Perou, *Deconstructing the molecular portraits of breast cancer*. *Mol Oncol*, 2011. **5**(1): p. 5-23.
63. Hu, Z., C. Fan, D.S. Oh, J.S. Marron, X. He, B.F. Qaqish, C. Livasy, L.A. Carey, E. Reynolds, L. Dressler, A. Nobel, J. Parker, M.G. Ewend, L.R. Sawyer, J. Wu, Y. Liu, R. Nanda, M. Tretiakova, A. Ruiz Orrico, D. Dreher, J.P. Palazzo, L. Perreard, E. Nelson, M. Mone, H. Hansen, M. Mullins, J.F. Quackenbush, M.J. Ellis, O.I. Olopade, P.S. Bernard, and C.M. Perou, *The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms*. *BMC Genomics*, 2006. **7**: p. 96.
64. Herschkowitz, J.I., K. Simin, V.J. Weigman, I. Mikaelian, J. Usary, Z. Hu, K.E. Rasmussen, L.P. Jones, S. Assefnia, S. Chandrasekharan, M.G. Backlund, Y. Yin, A.I. Khramtsov, R. Bastein, J. Quackenbush, R.I. Glazer, P.H. Brown, J.E. Green, L. Kopelovich, P.A. Furth, J.P. Palazzo, O.I. Olopade, P.S. Bernard, G.A. Churchill, T. Van Dyke, and C.M. Perou, *Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors*. *Genome Biol*, 2007. **8**(5): p. R76.
65. Eroles, P., A. Bosch, J.A. Perez-Fidalgo, and A. Lluch, *Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways*. *Cancer Treat Rev*, 2012. **38**(6): p. 698-707.
66. Heel, R.C., R.N. Brogden, T.M. Speight, and G.S. Avery, *Tamoxifen: a review of its pharmacological properties and therapeutic use in the treatment of breast cancer*. *Drugs*, 1978. **16**(1): p. 1-24.
67. Jordan, V.C., *Tamoxifen: a most unlikely pioneering medicine*. *Nat Rev Drug Discov*, 2003. **2**(3): p. 205-13.

68. Smollich, M., M. Gotte, J. Fischgrabe, I. Radke, L. Kiesel, and P. Wulfing, *Differential effects of aromatase inhibitors and antiestrogens on estrogen receptor expression in breast cancer cells*. *Anticancer Res*, 2009. **29**(6): p. 2167-71.
69. Creighton, C.J., *The molecular profile of luminal B breast cancer*. *Biologics*, 2012. **6**: p. 289-97.
70. Wirapati, P., C. Sotiriou, S. Kunkel, P. Farmer, S. Pradervand, B. Haibe-Kains, C. Desmedt, M. Ignatiadis, T. Sengstag, F. Schutz, D.R. Goldstein, M. Piccart, and M. Delorenzi, *Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis signatures*. *Breast Cancer Res*, 2008. **10**(4): p. R65.
71. Cheang, M.C., S.K. Chia, D. Voduc, D. Gao, S. Leung, J. Snider, M. Watson, S. Davies, P.S. Bernard, J.S. Parker, C.M. Perou, M.J. Ellis, and T.O. Nielsen, *Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer*. *J Natl Cancer Inst*, 2009. **101**(10): p. 736-50.
72. Tran, B. and P.L. Bedard, *Luminal-B breast cancer and novel therapeutic targets*. *Breast Cancer Res*, 2011. **13**(6): p. 221.
73. Ross, J.S., J.A. Fletcher, K.J. Bloom, G.P. Linette, J. Stec, W.F. Symmans, L. Pusztai, and G.N. Hortobagyi, *Targeted therapy in breast cancer: the HER-2/neu gene and protein*. *Mol Cell Proteomics*, 2004. **3**(4): p. 379-98.
74. Hudis, C.A., *Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice*. *N Engl J Med*, 2007. **357**(1): p. 39-51.
75. Higa, G.M. and J. Abraham, *Lapatinib in the treatment of breast cancer*. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2007. **7**(9): p. 1183-92.
76. Baselga, J., I. Bradbury, H. Eidtmann, S. Di Cosimo, E. de Azambuja, C. Aura, H. Gomez, P. Dinh, K. Fauria, V. Van Dooren, G. Aktan, A. Goldhirsch, T.W. Chang, Z. Horvath, M. Coccia-Portugal, J. Domont, L.M. Tseng, G. Kunz, J.H. Sohn, V. Semiglazov, G. Lerzo, M. Palacova, V. Probachai, L. Pusztai, M. Untch, R.D. Gelber, and M. Piccart-Gebhart, *Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial*. *Lancet*, 2012. **379**(9816): p. 633-40.
77. Rakha, E.A., J.S. Reis-Filho, and I.O. Ellis, *Basal-like breast cancer: a critical review*. *J Clin Oncol*, 2008. **26**(15): p. 2568-81.
78. Collett, K., I.M. Stefansson, J. Eide, A. Braaten, H. Wang, G.E. Eide, S.O. Thoresen, W.D. Foulkes, and L.A. Akslen, *A basal epithelial phenotype is more frequent in interval breast cancers compared with screen detected tumors*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005. **14**(5): p. 1108-12.
79. Fulford, L.G., J.S. Reis-Filho, K. Ryder, C. Jones, C.E. Gillett, A. Hanby, D. Easton, and S.R. Lakhani, *Basal-like grade III invasive ductal carcinoma of the breast: patterns of metastasis and long-term survival*. *Breast Cancer Res*, 2007. **9**(1): p. R4.
80. Tsuda, H., T. Takarabe, F. Hasegawa, T. Fukutomi, and S. Hirohashi, *Large, central acellular zones indicating myoepithelial tumor differentiation in high-grade invasive ductal carcinomas as markers of predisposition to lung and brain metastases*. *Am J Surg Pathol*, 2000. **24**(2): p. 197-202.
81. Fong, P.C., D.S. Boss, T.A. Yap, A. Tutt, P. Wu, M. Mergui-Roelvink, P. Mortimer, H. Swaisland, A. Lau, M.J. O'Connor, A. Ashworth, J. Carmichael, S.B. Kaye, J.H. Schellens, and J.S. de Bono, *Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers*. *N Engl J Med*, 2009. **361**(2): p. 123-34.
82. Thike, A.A., J. Iqbal, P.Y. Cheok, A.P. Chong, G.M. Tse, B. Tan, P. Tan, N.S. Wong, and P.H. Tan, *Triple negative breast cancer: outcome correlation with*

- immunohistochemical detection of basal markers*. Am J Surg Pathol, 2010. **34**(7): p. 956-64.
83. Thike, A.A., P.Y. Cheok, A.R. Jara-Lazaro, B. Tan, P. Tan, and P.H. Tan, *Triple-negative breast cancer: clinicopathological characteristics and relationship with basal-like breast cancer*. Mod Pathol, 2010. **23**(1): p. 123-33.
 84. Cheang, M.C., D. Voduc, C. Bajdik, S. Leung, S. McKinney, S.K. Chia, C.M. Perou, and T.O. Nielsen, *Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(5): p. 1368-76.
 85. Nielsen, T.O., F.D. Hsu, K. Jensen, M. Cheang, G. Karaca, Z. Hu, T. Hernandez-Boussard, C. Livasy, D. Cowan, L. Dressler, L.A. Akslen, J. Ragaz, A.M. Gown, C.B. Gilks, M. van de Rijn, and C.M. Perou, *Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(16): p. 5367-74.
 86. Carey, L., E. Winer, G. Viale, D. Cameron, and L. Gianni, *Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience?* Nat Rev Clin Oncol, 2010. **7**(12): p. 683-92.
 87. Prat, A. and C.M. Perou, *Mammary development meets cancer genomics*. Nat Med, 2009. **15**(8): p. 842-4.
 88. Prat, A., J.S. Parker, O. Karginova, C. Fan, C. Livasy, J.I. Herschkowitz, X. He, and C.M. Perou, *Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer*. Breast Cancer Res, 2010. **12**(5): p. R68.
 89. Dennis, G., Jr., B.T. Sherman, D.A. Hosack, J. Yang, W. Gao, H.C. Lane, and R.A. Lempicki, *DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery*. Genome Biol, 2003. **4**(5): p. P3.
 90. Perou, C.M., *Molecular stratification of triple-negative breast cancers*. Oncologist, 2010. **15** Suppl 5: p. 39-48.
 91. Creighton, C.J., J.C. Chang, and J.M. Rosen, *Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in tumor-initiating cells and its clinical implications in breast cancer*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010. **15**(2): p. 253-60.
 92. Thiery, J.P., *Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(6): p. 442-54.
 93. Yilmaz, M. and G. Christofori, *EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion*. Cancer Metastasis Rev, 2009. **28**(1-2): p. 15-33.
 94. Creighton, C.J., X. Li, M. Landis, J.M. Dixon, V.M. Neumeister, A. Sjolund, D.L. Rimm, H. Wong, A. Rodriguez, J.I. Herschkowitz, C. Fan, X. Zhang, X. He, A. Pavlick, M.C. Gutierrez, L. Renshaw, A.A. Larionov, D. Faratian, S.G. Hilsenbeck, C.M. Perou, M.T. Lewis, J.M. Rosen, and J.C. Chang, *Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(33): p. 13820-5.
 95. Lu, S., K. Singh, S. Mangray, R. Tavares, L. Noble, M.B. Resnick, and E. Yakirevich, *Claudin expression in high-grade invasive ductal carcinoma of the breast: correlation with the molecular subtype*. Mod Pathol, 2013. **26**(4): p. 485-95.
 96. Feizi, T., *Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens*. Nature, 1985. **314**(6006): p. 53-7.
 97. Kim, Y.J. and A. Varki, *Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer*. Glycoconj J, 1997. **14**(5): p. 569-76.
 98. Dall'olio, F., *Protein glycosylation in cancer biology: an overview*. Clin Mol Pathol, 1996. **49**(3): p. M126-35.

99. Perillo, N.L., M.E. Marcus, and L.G. Baum, *Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death*. J Mol Med (Berl), 1998. **76**(6): p. 402-12.
100. Barondes, S.H., V. Castronovo, D.N. Cooper, R.D. Cummings, K. Drickamer, T. Feizi, M.A. Gitt, J. Hirabayashi, C. Hughes, K. Kasai, and et al., *Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins*. Cell, 1994. **76**(4): p. 597-8.
101. Leffler, H., S. Carlsson, M. Hedlund, Y. Qian, and F. Poirier, *Introduction to galectins*. Glycoconj J, 2004. **19**(7-9): p. 433-40.
102. Lobsanov, Y.D., M.A. Gitt, H. Leffler, S. Barondes, and J.M. Rini, *Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the human dimeric S-Lac lectin (L-14-II)*. J Mol Biol, 1993. **233**(3): p. 553-5.
103. Abbott, W.M. and T. Feizi, *Soluble 14-kDa beta-galactoside-specific bovine lectin. Evidence from mutagenesis and proteolysis that almost the complete polypeptide chain is necessary for integrity of the carbohydrate recognition domain*. J Biol Chem, 1991. **266**(9): p. 5552-7.
104. Varki, A., *Essentials of glycobiology*. 2nd ed 2009, Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. xxix, 784 p.
105. Tracey, B.M., T. Feizi, W.M. Abbott, R.A. Carruthers, B.N. Green, and A.M. Lawson, *Subunit molecular mass assignment of 14,654 Da to the soluble beta-galactoside-binding lectin from bovine heart muscle and demonstration of intramolecular disulfide bonding associated with oxidative inactivation*. J Biol Chem, 1992. **267**(15): p. 10342-7.
106. Elola, M.T., C. Wolfenstein-Todel, M.F. Troncoso, G.R. Vasta, and G.A. Rabinovich, *Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(13): p. 1679-700.
107. Yang, R.Y., G.A. Rabinovich, and F.T. Liu, *Galectins: structure, function and therapeutic potential*. Expert Rev Mol Med, 2008. **10**: p. e17.
108. Rosa, P., S. Mantovani, R. Rosboch, and W.B. Huttner, *Monensin and brefeldin A differentially affect the phosphorylation and sulfation of secretory proteins*. J Biol Chem, 1992. **267**(17): p. 12227-32.
109. Lindstedt, R., G. Apodaca, S.H. Barondes, K.E. Mostov, and H. Leffler, *Apical secretion of a cytosolic protein by Madin-Darby canine kidney cells. Evidence for polarized release of an endogenous lectin by a nonclassical secretory pathway*. J Biol Chem, 1993. **268**(16): p. 11750-7.
110. Rini, J.M. and Y.D. Lobsanov, *New animal lectin structures*. Curr Opin Struct Biol, 1999. **9**(5): p. 578-84.
111. Lopez-Lucendo, M.F., D. Solis, S. Andre, J. Hirabayashi, K. Kasai, H. Kaltner, H.J. Gabius, and A. Romero, *Growth-regulatory human galectin-1: crystallographic characterisation of the structural changes induced by single-site mutations and their impact on the thermodynamics of ligand binding*. J Mol Biol, 2004. **343**(4): p. 957-70.
112. Cho, M. and R.D. Cummings, *Galectin-1, a beta-galactoside-binding lectin in Chinese hamster ovary cells. II. Localization and biosynthesis*. J Biol Chem, 1995. **270**(10): p. 5207-12.
113. Rabinovich, G.A. and M.A. Toscano, *Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(5): p. 338-52.
114. Oda, Y., J. Herrmann, M.A. Gitt, C.W. Turck, A.L. Burlingame, S.H. Barondes, and H. Leffler, *Soluble lactose-binding lectin from rat intestine with two different carbohydrate-binding domains in the same peptide chain*. J Biol Chem, 1993. **268**(8): p. 5929-39.

115. Ochieng, J., R. Fridman, P. Nangia-Makker, D.E. Kleiner, L.A. Liotta, W.G. Stetler-Stevenson, and A. Raz, *Galectin-3 is a novel substrate for human matrix metalloproteinases-2 and -9*. *Biochemistry*, 1994. **33**(47): p. 14109-14.
116. Vasta, G.R., *Galectins as pattern recognition receptors: structure, function, and evolution*. *Adv Exp Med Biol*, 2012. **946**: p. 21-36.
117. Vasta, G.R., H. Ahmed, M.A. Bianchet, J.A. Fernandez-Robledo, and L.M. Amzel, *Diversity in recognition of glycans by F-type lectins and galectins: molecular, structural, and biophysical aspects*. *Ann N Y Acad Sci*, 2012. **1253**: p. E14-26.
118. Patnaik, S.K., B. Potvin, S. Carlsson, D. Sturm, H. Leffler, and P. Stanley, *Complex N-glycans are the major ligands for galectin-1, -3, and -8 on Chinese hamster ovary cells*. *Glycobiology*, 2006. **16**(4): p. 305-17.
119. Hughes, R.C., *Galectins as modulators of cell adhesion*. *Biochimie*, 2001. **83**(7): p. 667-76.
120. Boscher, C., Y.Z. Zheng, R. Lakshminarayan, L. Johannes, J.W. Dennis, L.J. Foster, and I.R. Nabi, *Galectin-3 protein regulates mobility of N-cadherin and GM1 ganglioside at cell-cell junctions of mammary carcinoma cells*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(39): p. 32940-52.
121. Rabinovich, G.A., M.A. Toscano, S.S. Jackson, and G.R. Vasta, *Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices*. *Curr Opin Struct Biol*, 2007. **17**(5): p. 513-20.
122. Vasta, G.R., *Roles of galectins in infection*. *Nat Rev Microbiol*, 2009. **7**(6): p. 424-38.
123. Paz, A., R. Haklai, G. Elad-Sfadia, E. Ballan, and Y. Kloog, *Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation*. *Oncogene*, 2001. **20**(51): p. 7486-93.
124. Elad-Sfadia, G., R. Haklai, E. Balan, and Y. Kloog, *Galectin-3 augments K-Ras activation and triggers a Ras signal that attenuates ERK but not phosphoinositide 3-kinase activity*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(33): p. 34922-30.
125. Villeneuve, C., L. Baricault, L. Canelle, N. Barboule, C. Racca, B. Monsarrat, T. Magnaldo, and F. Larminat, *Mitochondrial proteomic approach reveals galectin-7 as a novel BCL-2 binding protein in human cells*. *Mol Biol Cell*, 2011. **22**(7): p. 999-1013.
126. Liu, F.T., R.J. Patterson, and J.L. Wang, *Intracellular functions of galectins*. *Biochim Biophys Acta*, 2002. **1572**(2-3): p. 263-73.
127. Klesov, A.A. and P.G. Traber, *Galectins and disease implications for targeted therapeutics*. ACS symposium series 2012. pages cm.
128. Gu, M., W. Wang, W.K. Song, D.N. Cooper, and S.J. Kaufman, *Selective modulation of the interaction of alpha 7 beta 1 integrin with fibronectin and laminin by L-14 lectin during skeletal muscle differentiation*. *J Cell Sci*, 1994. **107** (Pt 1): p. 175-81.
129. Ochieng, J., M.L. Leite-Browning, and P. Warfield, *Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. **246**(3): p. 788-91.
130. Levy, Y., R. Arbel-Goren, Y.R. Hadari, S. Eshhar, D. Ronen, E. Elhanany, B. Geiger, and Y. Zick, *Galectin-8 functions as a matricellular modulator of cell adhesion*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(33): p. 31285-95.
131. Nishi, N., H. Shoji, M. Seki, A. Itoh, H. Miyanaka, K. Yuube, M. Hirashima, and T. Nakamura, *Galectin-8 modulates neutrophil function via interaction with integrin alphaM*. *Glycobiology*, 2003. **13**(11): p. 755-63.
132. Pace, K.E., C. Lee, P.L. Stewart, and L.G. Baum, *Restricted receptor segregation into membrane microdomains occurs on human T cells during apoptosis induced by galectin-1*. *J Immunol*, 1999. **163**(7): p. 3801-11.

133. Rabinovich, G.A., A. Ariel, R. Hershkovich, J. Hirabayashi, K.I. Kasai, and O. Lider, *Specific inhibition of T-cell adhesion to extracellular matrix and proinflammatory cytokine secretion by human recombinant galectin-1*. Immunology, 1999. **97**(1): p. 100-6.
134. van den Brule, F.A., C. Buicu, M. Baldet, M.E. Sobel, D.N. Cooper, P. Marschal, and V. Castronovo, *Galectin-1 modulates human melanoma cell adhesion to laminin*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **209**(2): p. 760-7.
135. van den Brule, F., S. Califice, F. Garnier, P.L. Fernandez, A. Berchuck, and V. Castronovo, *Galectin-1 accumulation in the ovary carcinoma peritumoral stroma is induced by ovary carcinoma cells and affects both cancer cell proliferation and adhesion to laminin-1 and fibronectin*. Lab Invest, 2003. **83**(3): p. 377-86.
136. Warfield, P.R., P.N. Makker, A. Raz, and J. Ochieng, *Adhesion of human breast carcinoma to extracellular matrix proteins is modulated by galectin-3*. Invasion Metastasis, 1997. **17**(2): p. 101-12.
137. Fulcher, J.A., S.T. Hashimi, E.L. Levroney, M. Pang, K.B. Gurney, L.G. Baum, and B. Lee, *Galectin-1-matured human monocyte-derived dendritic cells have enhanced migration through extracellular matrix*. J Immunol, 2006. **177**(1): p. 216-26.
138. He, J. and L.G. Baum, *Endothelial cell expression of galectin-1 induced by prostate cancer cells inhibits T-cell transendothelial migration*. Lab Invest, 2006. **86**(6): p. 578-90.
139. Delbrouck, C., I. Doyen, N. Belot, C. Decaestecker, R. Ghanooni, A. de Lavareille, H. Kaltner, G. Choufani, A. Danguy, G. Vandenhoven, H.J. Gabius, S. Hassid, and R. Kiss, *Galectin-1 is overexpressed in nasal polyps under budesonide and inhibits eosinophil migration*. Lab Invest, 2002. **82**(2): p. 147-58.
140. Sano, H., D.K. Hsu, L. Yu, J.R. Apgar, I. Kuwabara, T. Yamanaka, M. Hirashima, and F.T. Liu, *Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages*. J Immunol, 2000. **165**(4): p. 2156-64.
141. Hsu, D.K., R.Y. Yang, and F.T. Liu, *Galectins in apoptosis*. Methods Enzymol, 2006. **417**: p. 256-73.
142. Rabinovich, G.A., R.E. Ramhorst, N. Rubinstein, A. Corigliano, M.C. Daroqui, E.B. Kier-Joffe, and L. Fainboim, *Induction of allogenic T-cell hyporesponsiveness by galectin-1-mediated apoptotic and non-apoptotic mechanisms*. Cell Death Differ, 2002. **9**(6): p. 661-70.
143. Califice, S., V. Castronovo, M. Bracke, and F. van den Brule, *Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer: tumor suppression of nuclear galectin-3 vs tumor promotion of cytoplasmic galectin-3*. Oncogene, 2004. **23**(45): p. 7527-36.
144. Yang, R.Y., D.K. Hsu, and F.T. Liu, *Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(13): p. 6737-42.
145. Akahani, S., P. Nangia-Makker, H. Inohara, H.R. Kim, and A. Raz, *Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family*. Cancer Res, 1997. **57**(23): p. 5272-6.
146. Danguy, A., I. Camby, and R. Kiss, *Galectins and cancer*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1572**(2-3): p. 285-93.
147. Fukumori, T., Y. Takenaka, T. Yoshii, H.R. Kim, V. Hogan, H. Inohara, S. Kagawa, and A. Raz, *CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis*. Cancer Res, 2003. **63**(23): p. 8302-11.
148. Honjo, Y., P. Nangia-Makker, H. Inohara, and A. Raz, *Down-regulation of galectin-3 suppresses tumorigenicity of human breast carcinoma cells*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(3): p. 661-8.

149. Yoshii, T., H. Inohara, Y. Takenaka, Y. Honjo, S. Akahani, T. Nomura, A. Raz, and T. Kubo, *Galectin-3 maintains the transformed phenotype of thyroid papillary carcinoma cells*. *Int J Oncol*, 2001. **18**(4): p. 787-92.
150. Grigorian, A., S. Torossian, and M. Demetriou, *T-cell growth, cell surface organization, and the galectin-glycoprotein lattice*. *Immunol Rev*, 2009. **230**(1): p. 232-46.
151. Rabinovich, G.A., M.A. Toscano, J.M. Ilarregui, and N. Rubinstein, *Shedding light on the immunomodulatory properties of galectins: novel regulators of innate and adaptive immune responses*. *Glycoconj J*, 2004. **19**(7-9): p. 565-73.
152. Rabinovich, G.A., C.E. Sotomayor, C.M. Riera, I. Bianco, and S.G. Correa, *Evidence of a role for galectin-1 in acute inflammation*. *Eur J Immunol*, 2000. **30**(5): p. 1331-9.
153. La, M., T.V. Cao, G. Cerchiaro, K. Chilton, J. Hirabayashi, K. Kasai, S.M. Olini, Y. Chernajovsky, and M. Perretti, *A novel biological activity for galectin-1: inhibition of leukocyte-endothelial cell interactions in experimental inflammation*. *Am J Pathol*, 2003. **163**(4): p. 1505-15.
154. Takenaka, Y., T. Fukumori, and A. Raz, *Galectin-3 and metastasis*. *Glycoconj J*, 2004. **19**(7-9): p. 543-9.
155. Nangia-Makker, P., Y. Honjo, and A. Raz, *Galectin-3 binding and metastasis*. *Methods Mol Med*, 2001. **58**: p. 149-57.
156. Cooper, D.N. and S.H. Barondes, *God must love galectins; he made so many of them*. *Glycobiology*, 1999. **9**(10): p. 979-84.
157. Liu, F.T., *Galectins: novel anti-inflammatory drug targets*. *Expert Opin Ther Targets*, 2002. **6**(4): p. 461-8.
158. Vyakarnam, A., S.F. Dagher, J.L. Wang, and R.J. Patterson, *Evidence for a role for galectin-1 in pre-mRNA splicing*. *Mol Cell Biol*, 1997. **17**(8): p. 4730-7.
159. Patterson, R.J., W. Wang, and J.L. Wang, *Understanding the biochemical activities of galectin-1 and galectin-3 in the nucleus*. *Glycoconj J*, 2004. **19**(7-9): p. 499-506.
160. Wang, W., J.W. Park, J.L. Wang, and R.J. Patterson, *Immunoprecipitation of spliceosomal RNAs by antisera to galectin-1 and galectin-3*. *Nucleic Acids Res*, 2006. **34**(18): p. 5166-74.
161. Sakaguchi, M., T. Shingo, T. Shimazaki, H.J. Okano, M. Shiwa, S. Ishibashi, H. Oguro, M. Ninomiya, T. Kadoya, H. Horie, A. Shibuya, H. Mizusawa, F. Poirier, H. Nakauchi, K. Sawamoto, and H. Okano, *A carbohydrate-binding protein, Galectin-1, promotes proliferation of adult neural stem cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(18): p. 7112-7.
162. Plachta, N., C. Annaheim, S. Bissiere, S. Lin, M. Ruegg, S. Hoving, D. Muller, F. Poirier, M. Bibel, and Y.A. Barde, *Identification of a lectin causing the degeneration of neuronal processes using engineered embryonic stem cells*. *Nat Neurosci*, 2007. **10**(6): p. 712-9.
163. Correa, S.G., C.E. Sotomayor, M.P. Aoki, C.A. Maldonado, and G.A. Rabinovich, *Opposite effects of galectin-1 on alternative metabolic pathways of L-arginine in resident, inflammatory, and activated macrophages*. *Glycobiology*, 2003. **13**(2): p. 119-28.
164. Rossi, B., M. Espeli, C. Schiff, and L. Gauthier, *Clustering of pre-B cell integrins induces galectin-1-dependent pre-B cell receptor relocalization and activation*. *J Immunol*, 2006. **177**(2): p. 796-803.
165. Chung, C.D., V.P. Patel, M. Moran, L.A. Lewis, and M.C. Miceli, *Galectin-1 induces partial TCR zeta-chain phosphorylation and antagonizes processive TCR signal transduction*. *J Immunol*, 2000. **165**(7): p. 3722-9.

166. Perillo, N.L., K.E. Pace, J.J. Seilhamer, and L.G. Baum, *Apoptosis of T cells mediated by galectin-1*. Nature, 1995. **378**(6558): p. 736-9.
167. Ozaki, K., K. Inoue, H. Sato, A. Iida, Y. Ohnishi, A. Sekine, K. Odashiro, M. Nobuyoshi, M. Hori, Y. Nakamura, and T. Tanaka, *Functional variation in LGALS2 confers risk of myocardial infarction and regulates lymphotoxin-alpha secretion in vitro*. Nature, 2004. **429**(6987): p. 72-5.
168. Sturm, A., M. Lensch, S. Andre, H. Kaltner, B. Wiedenmann, S. Rosewicz, A.U. Dignass, and H.J. Gabius, *Human galectin-2: novel inducer of T cell apoptosis with distinct profile of caspase activation*. J Immunol, 2004. **173**(6): p. 3825-37.
169. Cao, Z., N. Said, H.K. Wu, I. Kuwabara, F.T. Liu, and N. Panjwani, *Galectin-7 as a potential mediator of corneal epithelial cell migration*. Arch Ophthalmol, 2003. **121**(1): p. 82-6.
170. Cao, Z., N. Said, S. Amin, H.K. Wu, A. Bruce, M. Garate, D.K. Hsu, I. Kuwabara, F.T. Liu, and N. Panjwani, *Galectins-3 and -7, but not galectin-1, play a role in re-epithelialization of wounds*. J Biol Chem, 2002. **277**(44): p. 42299-305.
171. Dagher, S.F., J.L. Wang, and R.J. Patterson, *Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(4): p. 1213-7.
172. Joo, H.G., P.S. Goedegebuure, N. Sadanaga, M. Nagoshi, W. von Bernstorff, and T.J. Eberlein, *Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding protein in activated T lymphocytes*. J Leukoc Biol, 2001. **69**(4): p. 555-64.
173. Liu, F.T., *Galectins: a new family of regulators of inflammation*. Clin Immunol, 2000. **97**(2): p. 79-88.
174. Filer, A., M. Bik, G.N. Parsonage, J. Fitton, E. Trebilcock, K. Howlett, M. Cook, K. Raza, D.L. Simmons, A.M. Thomas, M. Salmon, D. Scheel-Toellner, J.M. Lord, G.A. Rabinovich, and C.D. Buckley, *Galectin 3 induces a distinctive pattern of cytokine and chemokine production in rheumatoid synovial fibroblasts via selective signaling pathways*. Arthritis Rheum, 2009. **60**(6): p. 1604-14.
175. Jeng, K.C., L.G. Frigeri, and F.T. Liu, *An endogenous lectin, galectin-3 (epsilon BP/Mac-2), potentiates IL-1 production by human monocytes*. Immunol Lett, 1994. **42**(3): p. 113-6.
176. Sano, H., D.K. Hsu, J.R. Apgar, L. Yu, B.B. Sharma, I. Kuwabara, S. Izui, and F.T. Liu, *Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages*. J Clin Invest, 2003. **112**(3): p. 389-97.
177. Partridge, E.A., C. Le Roy, G.M. Di Guglielmo, J. Pawling, P. Cheung, M. Granovsky, I.R. Nabi, J.L. Wrana, and J.W. Dennis, *Regulation of cytokine receptors by Golgi N-glycan processing and endocytosis*. Science, 2004. **306**(5693): p. 120-4.
178. Muller, S., T. Schaffer, B. Flogerzi, A. Fleetwood, R. Weimann, A.M. Schoepfer, and F. Seibold, *Galectin-3 modulates T cell activity and is reduced in the inflamed intestinal epithelium in IBD*. Inflamm Bowel Dis, 2006. **12**(7): p. 588-97.
179. Yoshii, T., T. Fukumori, Y. Honjo, H. Inohara, H.R. Kim, and A. Raz, *Galectin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest*. J Biol Chem, 2002. **277**(9): p. 6852-7.
180. Nangia-Makker, P., Y. Honjo, R. Sarvis, S. Akahani, V. Hogan, K.J. Pienta, and A. Raz, *Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis*. Am J Pathol, 2000. **156**(3): p. 899-909.
181. Fukushi, J., I.T. Makagiarsar, and W.B. Stallcup, *NG2 proteoglycan promotes endothelial cell motility and angiogenesis via engagement of galectin-3 and alpha3beta1 integrin*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(8): p. 3580-90.
182. Hokama, A., E. Mizoguchi, K. Sugimoto, Y. Shimomura, Y. Tanaka, M. Yoshida, S.T. Rietdijk, Y.P. de Jong, S.B. Snapper, C. Terhorst, R.S. Blumberg, and A.

- Mizoguchi, *Induced reactivity of intestinal CD4(+) T cells with an epithelial cell lectin, galectin-4, contributes to exacerbation of intestinal inflammation*. *Immunity*, 2004. **20**(6): p. 681-93.
183. Gendronneau, G., S.S. Sidhu, D. Delacour, T. Dang, C. Calonne, D. Houzelstein, T. Magnaldo, and F. Poirier, *Galectin-7 in the control of epidermal homeostasis after injury*. *Mol Biol Cell*, 2008. **19**(12): p. 5541-9.
184. Bernerd, F., A. Sarasin, and T. Magnaldo, *Galectin-7 overexpression is associated with the apoptotic process in UVB-induced sunburn keratinocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(20): p. 11329-34.
185. Kuwabara, I., Y. Kuwabara, R.Y. Yang, M. Schuler, D.R. Green, B.L. Zuraw, D.K. Hsu, and F.T. Liu, *Galectin-7 (PIG1) exhibits pro-apoptotic function through JNK activation and mitochondrial cytochrome c release*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(5): p. 3487-97.
186. Demers, M., A.A. Rose, A.A. Grosset, K. Biron-Pain, L. Gaboury, P.M. Siegel, and Y. St-Pierre, *Overexpression of galectin-7, a myoepithelial cell marker, enhances spontaneous metastasis of breast cancer cells*. *Am J Pathol*, 2010. **176**(6): p. 3023-31.
187. Demers, M., T. Magnaldo, and Y. St-Pierre, *A novel function for galectin-7: promoting tumorigenesis by up-regulating MMP-9 gene expression*. *Cancer Res*, 2005. **65**(12): p. 5205-10.
188. Gao, Y., K. Wu, Y. Xu, H. Zhou, W. He, W. Zhang, L. Cai, X. Lin, Z. Fang, Z. Luo, H. Guo, and Z. Chen, *Characterization of acute renal allograft rejection by human serum proteomic analysis*. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2009. **29**(5): p. 585-91.
189. Luo, Z., Y. Ji, H. Zhou, X. Huang, J. Fang, H. Guo, T. Pan, and Z.K. Chen, *Galectin-7 in cardiac allografts in mice: increased expression compared with isografts and localization in infiltrating lymphocytes and vascular endothelial cells*. *Transplant Proc*, 2013. **45**(2): p. 630-4.
190. Rossi, N.E., J. Reine, M. Pineda-Lezamid, M. Pulgar, N.W. Meza, M. Swamy, R. Risueno, W.W. Schamel, P. Bonay, E. Fernandez-Malave, and J.R. Regueiro, *Differential antibody binding to the surface alphabetaTCR.CD3 complex of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is conserved in mammals and associated with differential glycosylation*. *Int Immunol*, 2008. **20**(10): p. 1247-58.
191. Inagaki, Y., K. Higashi, M. Kushida, Y.Y. Hong, S. Nakao, R. Higashiyama, T. Moro, J. Itoh, T. Mikami, T. Kimura, G. Shiota, I. Kuwabara, and I. Okazaki, *Hepatocyte growth factor suppresses profibrogenic signal transduction via nuclear export of Smad3 with galectin-7*. *Gastroenterology*, 2008. **134**(4): p. 1180-90.
192. Ueda, S., I. Kuwabara, and F.T. Liu, *Suppression of tumor growth by galectin-7 gene transfer*. *Cancer Res*, 2004. **64**(16): p. 5672-6.
193. Kopitz, J., S. Andre, C. von Reitzenstein, K. Versluis, H. Kaltner, R.J. Pieters, K. Wasano, I. Kuwabara, F.T. Liu, M. Cantz, A.J. Heck, and H.J. Gabius, *Homodimeric galectin-7 (p53-induced gene 1) is a negative growth regulator for human neuroblastoma cells*. *Oncogene*, 2003. **22**(40): p. 6277-88.
194. Rorive, S., B. Eddafali, S. Fernandez, C. Decaestecker, S. Andre, H. Kaltner, I. Kuwabara, F.T. Liu, H.J. Gabius, R. Kiss, and I. Salmon, *Changes in galectin-7 and cytokeratin-19 expression during the progression of malignancy in thyroid tumors: diagnostic and biological implications*. *Mod Pathol*, 2002. **15**(12): p. 1294-301.
195. Saussez, S. and R. Kiss, *Galectin-7*. *Cell Mol Life Sci*, 2006. **63**(6): p. 686-97.
196. Saussez, S., C. Decaestecker, F. Lorfèvre, D. Chevalier, G. Mortuaire, H. Kaltner, S. Andre, G. Toubeau, H.J. Gabius, and X. Leroy, *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**(4): p. 483-93.
197. Zhu, X., M. Ding, M.L. Yu, M.X. Feng, L.J. Tan, and F.K. Zhao, *Identification of galectin-7 as a potential biomarker for esophageal squamous cell carcinoma by proteomic analysis*. *BMC Cancer*, 2010. **10**: p. 290.
 198. Takata, T., Y. Ishigaki, T. Shimasaki, H. Tsuchida, Y. Motoo, A. Hayashi, and N. Tomosugi, *Characterization of proteins secreted by pancreatic cancer cells with anticancer drug treatment in vitro*. *Oncol Rep*, 2012. **28**(6): p. 1968-76.
 199. Moisan, S., M. Demers, J. Mercier, T. Magnaldo, E.F. Potworowski, and Y. St-Pierre, *Upregulation of galectin-7 in murine lymphoma cells is associated with progression toward an aggressive phenotype*. *Leukemia*, 2003. **17**(4): p. 751-9.
 200. Demers, M., K. Biron-Pain, J. Hebert, A. Lamarre, T. Magnaldo, and Y. St-Pierre, *Galectin-7 in lymphoma: elevated expression in human lymphoid malignancies and decreased lymphoma dissemination by antisense strategies in experimental model*. *Cancer Res*, 2007. **67**(6): p. 2824-9.
 201. Spies, T., V. Cerundolo, M. Colonna, P. Cresswell, A. Townsend, and R. DeMars, *Presentation of viral antigen by MHC class I molecules is dependent on a putative peptide transporter heterodimer*. *Nature*, 1992. **355**(6361): p. 644-6.
 202. Nagy, N., H. Legendre, O. Engels, S. Andre, H. Kaltner, K. Wasano, Y. Zick, J.C. Pector, C. Decaestecker, H.J. Gabius, I. Salmon, and R. Kiss, *Refined prognostic evaluation in colon carcinoma using immunohistochemical galectin fingerprinting*. *Cancer*, 2003. **97**(8): p. 1849-58.
 203. Boura-Halfon, S., H. Voliovitch, R. Feinstein, K. Paz, and Y. Zick, *Extracellular matrix proteins modulate endocytosis of the insulin receptor*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(18): p. 16397-404.
 204. Dai, S.Y., R. Nakagawa, A. Itoh, H. Murakami, Y. Kashio, H. Abe, S. Katoh, K. Kontani, M. Kihara, S.L. Zhang, T. Hata, T. Nakamura, A. Yamauchi, and M. Hirashima, *Galectin-9 induces maturation of human monocyte-derived dendritic cells*. *J Immunol*, 2005. **175**(5): p. 2974-81.
 205. van de Weyer, P.S., M. Muehlfeit, C. Klose, J.V. Bonventre, G. Walz, and E.W. Kuehn, *A highly conserved tyrosine of Tim-3 is phosphorylated upon stimulation by its ligand galectin-9*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **351**(2): p. 571-6.
 206. Zhu, C., A.C. Anderson, A. Schubart, H. Xiong, J. Imitola, S.J. Khoury, X.X. Zheng, T.B. Strom, and V.K. Kuchroo, *The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity*. *Nat Immunol*, 2005. **6**(12): p. 1245-52.
 207. Ohtsubo, K., S. Takamatsu, M.T. Minowa, A. Yoshida, M. Takeuchi, and J.D. Marth, *Dietary and genetic control of glucose transporter 2 glycosylation promotes insulin secretion in suppressing diabetes*. *Cell*, 2005. **123**(7): p. 1307-21.
 208. Kubach, J., P. Lutter, T. Bopp, S. Stoll, C. Becker, E. Huter, C. Richter, P. Weingarten, T. Warger, J. Knop, S. Mullner, J. Wijdenes, H. Schild, E. Schmitt, and H. Jonuleit, *Human CD4+CD25+ regulatory T cells: proteome analysis identifies galectin-10 as a novel marker essential for their anergy and suppressive function*. *Blood*, 2007. **110**(5): p. 1550-8.
 209. Hotta, K., T. Funahashi, Y. Matsukawa, M. Takahashi, H. Nishizawa, K. Kishida, M. Matsuda, H. Kuriyama, S. Kihara, T. Nakamura, Y. Tochino, N.L. Bodkin, B.C. Hansen, and Y. Matsuzawa, *Galectin-12, an Adipose-expressed Galectin-like Molecule Possessing Apoptosis-inducing Activity*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(36): p. 34089-97.

210. Yang, R.Y., D.K. Hsu, L. Yu, H.Y. Chen, and F.T. Liu, *Galectin-12 is required for adipogenic signaling and adipocyte differentiation*. J Biol Chem, 2004. **279**(28): p. 29761-6.
211. Yang, R.Y., D.K. Hsu, L. Yu, J. Ni, and F.T. Liu, *Cell cycle regulation by galectin-12, a new member of the galectin superfamily*. J Biol Chem, 2001. **276**(23): p. 20252-60.
212. Balan, V., P. Nangia-Makker, and A. Raz, *Galectins as Cancer Biomarkers*. Cancers (Basel), 2010. **2**(2): p. 592-610.
213. Nangia-Makker, P., J. Conklin, V. Hogan, and A. Raz, *Carbohydrate-binding proteins in cancer, and their ligands as therapeutic agents*. Trends Mol Med, 2002. **8**(4): p. 187-92.
214. St-Pierre, Y., K. Biron-Pain, C. Champion, G. Lavoie, F. Bouchard, and J. Couillard, *Potential directions for drug development against galectin-7 in cancer*. Expert Opin Drug Discov, 2009. **4**(6): p. 611-20.
215. Iurisci, I., A. Cumashi, A.A. Sherman, Y.E. Tsvetkov, N. Tinari, E. Piccolo, M. D'Egidio, V. Adamo, C. Natoli, G.A. Rabinovich, S. Iacobelli, and N.E. Nifantiev, *Synthetic inhibitors of galectin-1 and -3 selectively modulate homotypic cell aggregation and tumor cell apoptosis*. Anticancer Res, 2009. **29**(1): p. 403-10.
216. Masuyer, G., T. Jabeen, C.T. Oberg, H. Leffler, U.J. Nilsson, and K.R. Acharya, *Inhibition mechanism of human galectin-7 by a novel galactose-benzylphosphate inhibitor*. Febs J, 2012. **279**(2): p. 193-202.
217. Cumpste, I., S. Carlsson, H. Leffler, and U.J. Nilsson, *Synthesis of a phenyl thio-beta-D-galactopyranoside library from 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene: discovery of efficient and selective monosaccharide inhibitors of galectin-7*. Org Biomol Chem, 2005. **3**(10): p. 1922-32.
218. Chauhan, D., G. Li, K. Podar, T. Hideshima, P. Neri, D. He, N. Mitsiades, P. Richardson, Y. Chang, J. Schindler, B. Carver, and K.C. Anderson, *A novel carbohydrate-based therapeutic GCS-100 overcomes bortezomib resistance and enhances dexamethasone-induced apoptosis in multiple myeloma cells*. Cancer Res, 2005. **65**(18): p. 8350-8.
219. Streetly, M.J., L. Maharaj, S. Joel, S.A. Schey, J.G. Gribben, and F.E. Cotter, *GCS-100, a novel galectin-3 antagonist, modulates MCL-1, NOXA, and cell cycle to induce myeloma cell death*. Blood, 2010. **115**(19): p. 3939-48.
220. Lu, Y., D. Lotan, and R. Lotan, *Differential regulation of constitutive and retinoic acid-induced galectin-1 gene transcription in murine embryonal carcinoma and myoblastic cells*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1491**(1-3): p. 13-9.
221. Rabinovich, G.A., N. Rubinstein, P. Matar, V. Rozados, S. Gervasoni, and G.O. Scharovsky, *The antimetastatic effect of a single low dose of cyclophosphamide involves modulation of galectin-1 and Bcl-2 expression*. Cancer Immunol Immunother, 2002. **50**(11): p. 597-603.
222. Lahm, H., S. Andre, A. Hoefflich, J.R. Fischer, B. Sordat, H. Kaltner, E. Wolf, and H.J. Gabius, *Comprehensive galectin fingerprinting in a panel of 61 human tumor cell lines by RT-PCR and its implications for diagnostic and therapeutic procedures*. J Cancer Res Clin Oncol, 2001. **127**(6): p. 375-86.
223. van den Brule, F., S. Califice, and V. Castronovo, *Expression of galectins in cancer: a critical review*. Glycoconj J, 2004. **19**(7-9): p. 537-42.
224. Pacis, R.A., M.J. Pilat, K.J. Pienta, K. Wojno, A. Raz, V. Hogan, and C.R. Cooper, *Decreased galectin-3 expression in prostate cancer*. Prostate, 2000. **44**(2): p. 118-23.
225. Wang, Y., P. Nangia-Makker, L. Tait, V. Balan, V. Hogan, K.J. Pienta, and A. Raz, *Regulation of prostate cancer progression by galectin-3*. Am J Pathol, 2009. **174**(4): p. 1515-23.

226. Kim, S.J., S.J. Lee, H.J. Sung, I.K. Choi, C.W. Choi, B.S. Kim, J.S. Kim, W. Yu, H.S. Hwang, and I.S. Kim, *Increased serum 90K and Galectin-3 expression are associated with advanced stage and a worse prognosis in diffuse large B-cell lymphomas*. *Acta Haematol*, 2008. **120**(4): p. 211-6.
227. St-Pierre, Y., C.G. Campion, and A.A. Grosset, *A distinctive role for galectin-7 in cancer ?* *Front Biosci*, 2012. **17**: p. 438-50.
228. Madsen, P., H.H. Rasmussen, T. Flint, P. Gromov, T.A. Kruse, B. Honore, H. Vorum, and J.E. Celis, *Cloning, expression, and chromosome mapping of human galectin-7*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(11): p. 5823-9.
229. Magnaldo, T., F. Bernerd, and M. Darmon, *Galectin-7, a human 14-kDa S-lectin, specifically expressed in keratinocytes and sensitive to retinoic acid*. *Dev Biol*, 1995. **168**(2): p. 259-71.
230. Magnaldo, T., D. Fowllis, and M. Darmon, *Galectin-7, a marker of all types of stratified epithelia*. *Differentiation*, 1998. **63**(3): p. 159-68.
231. Fuchs, E., *Epidermal differentiation: the bare essentials*. *J Cell Biol*, 1990. **111**(6 Pt 2): p. 2807-14.
232. Timmons, P.M., C. Colnot, I. Cail, F. Poirier, and T. Magnaldo, *Expression of galectin-7 during epithelial development coincides with the onset of stratification*. *Int J Dev Biol*, 1999. **43**(3): p. 229-35.
233. Sato, M., N. Nishi, H. Shoji, M. Kumagai, T. Imaizumi, Y. Hata, M. Hirashima, S. Suzuki, and T. Nakamura, *Quantification of galectin-7 and its localization in adult mouse tissues*. *J Biochem*, 2002. **131**(2): p. 255-60.
234. Rondanino, C., P.A. Poland, C.L. Kinlough, H. Li, Y. Rbaibi, M.M. Myerburg, M.M. Al-bataineh, O.B. Kashlan, N.M. Pastor-Soler, K.R. Hallows, O.A. Weisz, G. Apodaca, and R.P. Hughey, *Galectin-7 modulates the length of the primary cilia and wound repair in polarized kidney epithelial cells*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011. **301**(3): p. F622-33.
235. Polyak, K., Y. Xia, J.L. Zweier, K.W. Kinzler, and B. Vogelstein, *A model for p53-induced apoptosis*. *Nature*, 1997. **389**(6648): p. 300-5.
236. Chen, J., Q.Y. He, A.P. Yuen, and J.F. Chiu, *Proteomics of buccal squamous cell carcinoma: the involvement of multiple pathways in tumorigenesis*. *Proteomics*, 2004. **4**(8): p. 2465-75.
237. Kossakowska, A.E., S.J. Urbanski, S.A. Huchcroft, and D.R. Edwards, *Relationship between the clinical aggressiveness of large cell immunoblastic lymphomas and expression of 92 kDa gelatinase (type IV collagenase) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) RNAs*. *Oncol Res*, 1992. **4**(6): p. 233-40.
238. Kossakowska, A.E., S.A. Huchcroft, S.J. Urbanski, and D.R. Edwards, *Comparative analysis of the expression patterns of metalloproteinases and their inhibitors in breast neoplasia, sporadic colorectal neoplasia, pulmonary carcinomas and malignant non-Hodgkin's lymphomas in humans*. *Br J Cancer*, 1996. **73**(11): p. 1401-8.
239. Kim, H.J., H.K. Jeon, J.K. Lee, C.O. Sung, I.G. Do, C.H. Choi, T.J. Kim, B.G. Kim, D.S. Bae, and J.W. Lee, *Clinical significance of galectin-7 in epithelial ovarian cancer*. *Anticancer Res*, 2013. **33**(4): p. 1555-61.
240. Chung, C.H., P.S. Bernard, and C.M. Perou, *Molecular portraits and the family tree of cancer*. *Nat Genet*, 2002. **32** **Suppl**: p. 533-40.
241. Grigoriadis, A., A. Mackay, J.S. Reis-Filho, D. Steele, C. Iseli, B.J. Stevenson, C.V. Jongeneel, H. Valgeirsson, K. Fenwick, M. Irvani, M. Leao, A.J. Simpson, R.L. Strausberg, P.S. Jat, A. Ashworth, A.M. Neville, and M.J. O'Hare, *Establishment of the epithelial-specific transcriptome of normal and malignant human breast cells based on MPSS and array expression data*. *Breast Cancer Res*, 2006. **8**(5): p. R56.

242. Lu, J., H. Pei, M. Kaeck, and H.J. Thompson, *Gene expression changes associated with chemically induced rat mammary carcinogenesis*. *Mol Carcinog*, 1997. **20**(2): p. 204-15.
243. Camby, I., M. Le Mercier, F. Lefranc, and R. Kiss, *Galectin-1: a small protein with major functions*. *Glycobiology*, 2006. **16**(11): p. 137R-157R.
244. Chiariotti, L., P. Salvatore, R. Frunzio, and C.B. Bruni, *Galectin genes: regulation of expression*. *Glycoconj J*, 2004. **19**(7-9): p. 441-9.
245. Salvatore, P., C. Contursi, G. Benvenuto, C.B. Bruni, and L. Chiariotti, *Characterization and functional dissection of the galectin-1 gene promoter*. *FEBS Lett*, 1995. **373**(2): p. 159-63.
246. Zhao, X.Y., K.W. Zhao, Y. Jiang, M. Zhao, and G.Q. Chen, *Synergistic induction of galectin-1 by CCAAT/enhancer binding protein alpha and hypoxia-inducible factor 1alpha and its role in differentiation of acute myeloid leukemic cells*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(42): p. 36808-19.
247. Toscano, M.A., L. Campagna, L.L. Molinero, J.P. Cerliani, D.O. Croci, J.M. Iñarregui, M.B. Fuertes, I.M. Nojek, J.P. Fededa, N.W. Zwirner, M.A. Costas, and G.A. Rabinovich, *Nuclear factor (NF)-kappaB controls expression of the immunoregulatory glycan-binding protein galectin-1*. *Mol Immunol*, 2011. **48**(15-16): p. 1940-9.
248. Satelli, A. and U.S. Rao, *Galectin-1 is silenced by promoter hypermethylation and its re-expression induces apoptosis in human colorectal cancer cells*. *Cancer Lett*, 2011. **301**(1): p. 38-46.
249. Salvatore, P., G. Benvenuto, M. Caporaso, C.B. Bruni, and L. Chiariotti, *High resolution methylation analysis of the galectin-1 gene promoter region in expressing and nonexpressing tissues*. *FEBS Lett*, 1998. **421**(2): p. 152-8.
250. Benvenuto, G., M.L. Carpentieri, P. Salvatore, L. Cindolo, C.B. Bruni, and L. Chiariotti, *Cell-specific transcriptional regulation and reactivation of galectin-1 gene expression are controlled by DNA methylation of the promoter region*. *Mol Cell Biol*, 1996. **16**(6): p. 2736-43.
251. Salvatore, P., G. Benvenuto, R. Pero, F. Lembo, C.B. Bruni, and L. Chiariotti, *Galectin-1 gene expression and methylation state in human T leukemia cell lines*. *Int J Oncol*, 2000. **17**(5): p. 1015-8.
252. Kadrofske, M.M., K.P. Openo, and J.L. Wang, *The human LGALS3 (galectin-3) gene: determination of the gene structure and functional characterization of the promoter*. *Arch Biochem Biophys*, 1998. **349**(1): p. 7-20.
253. Dumic, J., G. Lauc, and M. Flogel, *Expression of galectin-3 in cells exposed to stress-roles of jun and NF-kappaB*. *Cell Physiol Biochem*, 2000. **10**(3): p. 149-58.
254. Zuberi, R.I., D.K. Hsu, O. Kalayci, H.Y. Chen, H.K. Sheldon, L. Yu, J.R. Apgar, T. Kawakami, C.M. Lilly, and F.T. Liu, *Critical role for galectin-3 in airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in a murine model of asthma*. *Am J Pathol*, 2004. **165**(6): p. 2045-53.
255. Raimond, J., F. Rouleux, M. Monsigny, and A. Legrand, *The second intron of the human galectin-3 gene has a strong promoter activity down-regulated by p53*. *FEBS Lett*, 1995. **363**(1-2): p. 165-9.
256. Lavra, L., A. Ulivieri, C. Rinaldo, R. Dominici, M. Volante, E. Luciani, A. Bartolazzi, F. Frasca, S. Soddu, and S. Sciacchitano, *Gal-3 is stimulated by gain-of-function p53 mutations and modulates chemoresistance in anaplastic thyroid carcinomas*. *J Pathol*, 2009. **218**(1): p. 66-75.
257. Hanson, J.L., N.A. Hawke, D. Kashatus, and A.S. Baldwin, *The nuclear factor kappaB subunits RelA/p65 and c-Rel potentiate but are not required for Ras-induced cellular transformation*. *Cancer Res*, 2004. **64**(20): p. 7248-55.

258. Lu, X., D.P. Liu, and Y. Xu, *The gain of function of p53 cancer mutant in promoting mammary tumorigenesis*. *Oncogene*, 2013. **32**(23): p. 2900-6.
259. Lim, L.Y., N. Vidnovic, L.W. Ellisen, and C.O. Leong, *Mutant p53 mediates survival of breast cancer cells*. *Br J Cancer*, 2009. **101**(9): p. 1606-12.
260. Lewis, D.A., S.F. Hengeltraub, F.C. Gao, M.A. Leivant, and D.F. Spandau, *Aberrant NF-kappaB activity in HaCaT cells alters their response to UVB signaling*. *J Invest Dermatol*, 2006. **126**(8): p. 1885-92.
261. Yamaguchi, N., T. Ito, S. Azuma, E. Ito, R. Honma, Y. Yanagisawa, A. Nishikawa, M. Kawamura, J. Imai, S. Watanabe, K. Semba, and J. Inoue, *Constitutive activation of nuclear factor-kappaB is preferentially involved in the proliferation of basal-like subtype breast cancer cell lines*. *Cancer Sci*, 2009. **100**(9): p. 1668-74.
262. Zhu, S., H.S. Oh, M. Shim, E. Sterneck, P.F. Johnson, and R.C. Smart, *C/EBPbeta modulates the early events of keratinocyte differentiation involving growth arrest and keratin 1 and keratin 10 expression*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(10): p. 7181-90.
263. Schwarz, E.J., M.J. Reginato, D. Shao, S.L. Krakow, and M.A. Lazar, *Retinoic acid blocks adipogenesis by inhibiting C/EBPbeta-mediated transcription*. *Mol Cell Biol*, 1997. **17**(3): p. 1552-61.
264. Wiper-Bergeron, N., C. St-Louis, and J.M. Lee, *CCAAT/Enhancer binding protein beta abrogates retinoic acid-induced osteoblast differentiation via repression of Runx2 transcription*. *Mol Endocrinol*, 2007. **21**(9): p. 2124-35.
265. Cesi, V., M.L. Giuffrida, R. Vitali, B. Tanno, C. Mancini, B. Calabretta, and G. Raschella, *C/EBP alpha and beta mimic retinoic acid activation of IGFBP-5 in neuroblastoma cells by a mechanism independent from binding to their site*. *Exp Cell Res*, 2005. **305**(1): p. 179-89.
266. Grimm, S.L. and J.M. Rosen, *The role of C/EBPbeta in mammary gland development and breast cancer*. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2003. **8**(2): p. 191-204.
267. Robinson, G.W., P.F. Johnson, L. Hennighausen, and E. Sterneck, *The C/EBPbeta transcription factor regulates epithelial cell proliferation and differentiation in the mammary gland*. *Genes Dev*, 1998. **12**(12): p. 1907-16.
268. Bundy, L.M. and L. Sealy, *CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBPbeta)-2 transforms normal mammary epithelial cells and induces epithelial to mesenchymal transition in culture*. *Oncogene*, 2003. **22**(6): p. 869-83.
269. Dippold, W.G., G. Jay, A.B. DeLeo, G. Khoury, and L.J. Old, *p53 transformation-related protein: detection by monoclonal antibody in mouse and human cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981. **78**(3): p. 1695-9.
270. Levine, A.J., *The common mechanisms of transformation by the small DNA tumor viruses: The inactivation of tumor suppressor gene products: p53*. *Virology*, 2009. **384**(2): p. 285-93.
271. Finlay, C.A., P.W. Hinds, and A.J. Levine, *The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation*. *Cell*, 1989. **57**(7): p. 1083-93.
272. Oren, M., *Regulation of the p53 tumor suppressor protein*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(51): p. 36031-4.
273. Oren, M. and V. Rotter, *Introduction: p53--the first twenty years*. *Cell Mol Life Sci*, 1999. **55**(1): p. 9-11.
274. Levrero, M., V. De Laurenzi, A. Costanzo, J. Gong, J.Y. Wang, and G. Melino, *The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions*. *J Cell Sci*, 2000. **113** (Pt 10): p. 1661-70.
275. Di Como, C.J., C. Gaiddon, and C. Prives, *p73 function is inhibited by tumor-derived p53 mutants in mammalian cells*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(2): p. 1438-49.

276. Davison, T.S., C. Vagner, M. Kaghad, A. Ayed, D. Caput, and C.H. Arrowsmith, *p73 and p63 are homotetramers capable of weak heterotypic interactions with each other but not with p53*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(26): p. 18709-14.
277. Pozniak, C.D., S. Radinovic, A. Yang, F. McKeon, D.R. Kaplan, and F.D. Miller, *An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death*. *Science*, 2000. **289**(5477): p. 304-6.
278. Chen, C.L., S.M. Ip, D. Cheng, L.C. Wong, and H.Y. Ngan, *P73 gene expression in ovarian cancer tissues and cell lines*. *Clin Cancer Res*, 2000. **6**(10): p. 3910-5.
279. Dominguez, G., J.M. Silva, J. Silva, J.M. Garcia, A. Sanchez, A. Navarro, I. Gallego, M. Provencio, P. Espana, and F. Bonilla, *Wild type p73 overexpression and high-grade malignancy in breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 2001. **66**(3): p. 183-90.
280. Carroll, D.K., J.S. Carroll, C.O. Leong, F. Cheng, M. Brown, A.A. Mills, J.S. Brugge, and L.W. Ellisen, *p63 regulates an adhesion programme and cell survival in epithelial cells*. *Nat Cell Biol*, 2006. **8**(6): p. 551-61.
281. Wang, X., I. Mori, W. Tang, M. Nakamura, Y. Nakamura, M. Sato, T. Sakurai, and K. Kakudo, *p63 expression in normal, hyperplastic and malignant breast tissues*. *Breast Cancer*, 2002. **9**(3): p. 216-9.
282. Joerger, A.C. and A.R. Fersht, *Structure-function-rescue: the diverse nature of common p53 cancer mutants*. *Oncogene*, 2007. **26**(15): p. 2226-42.
283. Riley, T., E. Sontag, P. Chen, and A. Levine, *Transcriptional control of human p53-regulated genes*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. **9**(5): p. 402-12.
284. Toledo, F. and G.M. Wahl, *Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas*. *Nat Rev Cancer*, 2006. **6**(12): p. 909-23.
285. Vousden, K.H., *Activation of the p53 tumor suppressor protein*. *Biochim Biophys Acta*, 2002. **1602**(1): p. 47-59.
286. Kubbutat, M.H., S.N. Jones, and K.H. Vousden, *Regulation of p53 stability by Mdm2*. *Nature*, 1997. **387**(6630): p. 299-303.
287. Ho, J. and S. Benchimol, *Transcriptional repression mediated by the p53 tumour suppressor*. *Cell Death Differ*, 2003. **10**(4): p. 404-8.
288. Ewen, M.E. and S.J. Miller, *p53 and translational control*. *Biochim Biophys Acta*, 1996. **1242**(3): p. 181-4.
289. Bertrand, P., Y. Saintigny, and B.S. Lopez, *p53's double life: transactivation-independent repression of homologous recombination*. *Trends Genet*, 2004. **20**(6): p. 235-43.
290. McLure, K.G. and P.W. Lee, *How p53 binds DNA as a tetramer*. *Embo J*, 1998. **17**(12): p. 3342-50.
291. Kitayner, M., H. Rozenberg, N. Kessler, D. Rabinovich, L. Shaulov, T.E. Haran, and Z. Shakked, *Structural basis of DNA recognition by p53 tetramers*. *Mol Cell*, 2006. **22**(6): p. 741-53.
292. el-Deiry, W.S., S.E. Kern, J.A. Pietenpol, K.W. Kinzler, and B. Vogelstein, *Definition of a consensus binding site for p53*. *Nat Genet*, 1992. **1**(1): p. 45-9.
293. Funk, W.D., D.T. Pak, R.H. Karas, W.E. Wright, and J.W. Shay, *A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes*. *Mol Cell Biol*, 1992. **12**(6): p. 2866-71.
294. Joerger, A.C. and A.R. Fersht, *Structural biology of the tumor suppressor p53*. *Annu Rev Biochem*, 2008. **77**: p. 557-82.
295. Bullock, A.N. and A.R. Fersht, *Rescuing the function of mutant p53*. *Nat Rev Cancer*, 2001. **1**(1): p. 68-76.

296. Joerger, A.C., H.C. Ang, D.B. Veprintsev, C.M. Blair, and A.R. Fersht, *Structures of p53 cancer mutants and mechanism of rescue by second-site suppressor mutations*. J Biol Chem, 2005. **280**(16): p. 16030-7.
297. Muller, P.A. and K.H. Vousden, *p53 mutations in cancer*. Nat Cell Biol, 2013. **15**(1): p. 2-8.
298. Strano, S., S. Dell'Orso, S. Di Agostino, G. Fontemaggi, A. Sacchi, and G. Blandino, *Mutant p53: an oncogenic transcription factor*. Oncogene, 2007. **26**(15): p. 2212-9.
299. Sigal, A. and V. Rotter, *Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome*. Cancer Res, 2000. **60**(24): p. 6788-93.
300. Haupt, Y., R. Maya, A. Kazaz, and M. Oren, *Mdm2 promotes the rapid degradation of p53*. Nature, 1997. **387**(6630): p. 296-9.
301. Soussi, T., *The p53 pathway and human cancer*. Br J Surg, 2005. **92**(11): p. 1331-2.
302. Aas, T., A.L. Borresen, S. Geisler, B. Smith-Sorensen, H. Johnsen, J.E. Varhaug, L.A. Akslen, and P.E. Lonning, *Specific P53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients*. Nat Med, 1996. **2**(7): p. 811-4.
303. Berns, E.M., J.A. Foekens, R. Vossen, M.P. Look, P. Devilee, S.C. Henzen-Logmans, I.L. van Staveren, W.L. van Putten, M. Inganas, M.E. Meijer-van Gelder, C. Cornelisse, C.J. Claassen, H. Portengen, B. Bakker, and J.G. Klijn, *Complete sequencing of TP53 predicts poor response to systemic therapy of advanced breast cancer*. Cancer Res, 2000. **60**(8): p. 2155-62.
304. Geisler, S., A.L. Borresen-Dale, H. Johnsen, T. Aas, J. Geisler, L.A. Akslen, G. Anker, and P.E. Lonning, *TP53 gene mutations predict the response to neoadjuvant treatment with 5-fluorouracil and mitomycin in locally advanced breast cancer*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(15): p. 5582-8.
305. Weisz, L., A. Zalcenstein, P. Stambolsky, Y. Cohen, N. Goldfinger, M. Oren, and V. Rotter, *Transactivation of the EGR1 gene contributes to mutant p53 gain of function*. Cancer Res, 2004. **64**(22): p. 8318-27.
306. Di Agostino, S., S. Strano, V. Emiliozzi, V. Zerbini, M. Mottolese, A. Sacchi, G. Blandino, and G. Piaggio, *Gain of function of mutant p53: the mutant p53/NF-Y protein complex reveals an aberrant transcriptional mechanism of cell cycle regulation*. Cancer Cell, 2006. **10**(3): p. 191-202.
307. Zalcenstein, A., L. Weisz, P. Stambolsky, J. Bar, V. Rotter, and M. Oren, *Repression of the MSP/MST-1 gene contributes to the antiapoptotic gain of function of mutant p53*. Oncogene, 2006. **25**(3): p. 359-69.
308. Zalcenstein, A., P. Stambolsky, L. Weisz, M. Muller, D. Wallach, T.M. Goncharov, P.H. Krammer, V. Rotter, and M. Oren, *Mutant p53 gain of function: repression of CD95(Fas/APO-1) gene expression by tumor-associated p53 mutants*. Oncogene, 2003. **22**(36): p. 5667-76.
309. Walerych, D., M. Napoli, L. Collavin, and G. Del Sal, *The rebel angel: mutant p53 as the driving oncogene in breast cancer*. Carcinogenesis, 2012. **33**(11): p. 2007-17.
310. Dell'Orso, S., G. Fontemaggi, P. Stambolsky, F. Goeman, C. Voellenkle, M. Levrero, S. Strano, V. Rotter, M. Oren, and G. Blandino, *ChIP-on-chip analysis of in vivo mutant p53 binding to selected gene promoters*. OMICS, 2011. **15**(5): p. 305-12.
311. Girardini, J.E., M. Napoli, S. Piazza, A. Rustighi, C. Marotta, E. Radaelli, V. Capaci, L. Jordan, P. Quinlan, A. Thompson, M. Mano, A. Rosato, T. Crook, E. Scanziani, A.R. Means, G. Lozano, C. Schneider, and G. Del Sal, *A Pin1/mutant p53 axis promotes aggressiveness in breast cancer*. Cancer Cell, 2011. **20**(1): p. 79-91.
312. Ludes-Meyers, J.H., M.A. Subler, C.V. Shivakumar, R.M. Munoz, P. Jiang, J.E. Bigger, D.R. Brown, S.P. Deb, and S. Deb, *Transcriptional activation of the human*

- epidermal growth factor receptor promoter by human p53*. Mol Cell Biol, 1996. 16(11): p. 6009-19.
313. Weisz, L., A. Damalas, M. Lontos, P. Karakaidos, G. Fontemaggi, R. Maor-Aloni, M. Kalis, M. Levrero, S. Strano, V.G. Gorgoulis, V. Rotter, G. Blandino, and M. Oren, *Mutant p53 enhances nuclear factor kappaB activation by tumor necrosis factor alpha in cancer cells*. Cancer Res, 2007. 67(6): p. 2396-401.
 314. Webster, G.A. and N.D. Perkins, *Transcriptional cross talk between NF-kappaB and p53*. Mol Cell Biol, 1999. 19(5): p. 3485-95.
 315. Neilsen, P.M., J.E. Noll, R.J. Suetani, R.B. Schulz, F. Al-Ejeh, A. Evdokiou, D.P. Lane, and D.F. Callen, *Mutant p53 uses p63 as a molecular chaperone to alter gene expression and induce a pro-invasive secretome*. Oncotarget, 2011. 2(12): p. 1203-17.
 316. Martynova, E., S. Pozzi, V. Basile, D. Dolfini, F. Zambelli, C. Imbriano, G. Pavesi, and R. Mantovani, *Gain-of-function p53 mutants have widespread genomic locations partially overlapping with p63*. Oncotarget, 2012. 3(2): p. 132-43.
 317. Xu, J., J. Reumers, J.R. Couceiro, F. De Smet, R. Gallardo, S. Rudyak, A. Cornelis, J. Rozenski, A. Zwolinska, J.C. Marine, D. Lambrechts, Y.A. Suh, F. Rousseau, and J. Schymkowitz, *Gain of function of mutant p53 by coaggregation with multiple tumor suppressors*. Nat Chem Biol, 2011. 7(5): p. 285-95.
 318. Dearth, L.R., H. Qian, T. Wang, T.E. Baroni, J. Zeng, S.W. Chen, S.Y. Yi, and R.K. Brachmann, *Inactive full-length p53 mutants lacking dominant wild-type p53 inhibition highlight loss of heterozygosity as an important aspect of p53 status in human cancers*. Carcinogenesis, 2007. 28(2): p. 289-98.
 319. Milner, J., E.A. Medcalf, and A.C. Cook, *Tumor suppressor p53: analysis of wild-type and mutant p53 complexes*. Mol Cell Biol, 1991. 11(1): p. 12-9.
 320. Blagosklonny, M.V., *p53 from complexity to simplicity: mutant p53 stabilization, gain-of-function, and dominant-negative effect*. FASEB J, 2000. 14(13): p. 1901-7.
 321. Frebourg, T., M. Sadelain, Y.S. Ng, J. Kassel, and S.H. Friend, *Equal transcription of wild-type and mutant p53 using bicistronic vectors results in the wild-type phenotype*. Cancer Res, 1994. 54(4): p. 878-81.
 322. Hollstein, M., D. Sidransky, B. Vogelstein, and C.C. Harris, *p53 mutations in human cancers*. Science, 1991. 253(5015): p. 49-53.
 323. Petitjean, A., E. Mathe, S. Kato, C. Ishioka, S.V. Tavtigian, P. Hainaut, and M. Olivier, *Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the LARC TP53 database*. Hum Mutat, 2007. 28(6): p. 622-9.
 324. Wasielewski, M., F. Elstrodt, J.G. Klijn, E.M. Berns, and M. Schutte, *Thirteen new p53 gene mutants identified among 41 human breast cancer cell lines*. Breast Cancer Res Treat, 2006. 99(1): p. 97-101.
 325. Murphy, K.L., A.P. Dennis, and J.M. Rosen, *A gain of function p53 mutant promotes both genomic instability and cell survival in a novel p53-null mammary epithelial cell model*. FASEB J, 2000. 14(14): p. 2291-302.
 326. Vegran, F., R. Boidot, C. Oudin, C. Defrain, M. Rebucci, and S. Lizard-Nacol, *Association of p53 gene alterations with the expression of antiapoptotic survivin splice variants in breast cancer*. Oncogene, 2007. 26(2): p. 290-7.
 327. Pratt, M.A., D. White, N. Kushwaha, E. Tibbo, and M.Y. Niu, *Cytoplasmic mutant p53 increases Bcl-2 expression in estrogen receptor-positive breast cancer cells*. Apoptosis, 2007. 12(4): p. 657-69.
 328. Freed-Pastor, W.A., H. Mizuno, X. Zhao, A. Langerod, S.H. Moon, R. Rodriguez-Barrueco, A. Barsotti, A. Chicas, W. Li, A. Polotskaia, M.J. Bissell, T.F. Osborne, B. Tian, S.W. Lowe, J.M. Silva, A.L. Borresen-Dale, A.J. Levine, J. Bargonetti, and C.

- Prives, *Mutant p53 disrupts mammary tissue architecture via the mevalonate pathway*. Cell, 2012. **148**(1-2): p. 244-58.
329. Kieser, A., H.A. Weich, G. Brandner, D. Marme, and W. Kolch, *Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression*. Oncogene, 1994. **9**(3): p. 963-9.
330. Roger, L., L. Jullien, V. Gire, and P. Roux, *Gain of oncogenic function of p53 mutants regulates E-cadherin expression uncoupled from cell invasion in colon cancer cells*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 8): p. 1295-305.
331. Kogan-Sakin, I., Y. Tabach, Y. Buganim, A. Molchadsky, H. Solomon, S. Madar, I. Kamer, P. Stambolsky, A. Shelly, N. Goldfinger, S. Valsesia-Wittmann, A. Puisieux, A. Zundevich, E.N. Gal-Yam, C. Avivi, I. Barshack, M. Brait, D. Sidransky, E. Domany, and V. Rotter, *Mutant p53(R175H) upregulates Twist1 expression and promotes epithelial-mesenchymal transition in immortalized prostate cells*. Cell Death Differ, 2011. **18**(2): p. 271-81.
332. Ohashi, S., M. Natsuzaka, G.S. Wong, C.Z. Michaylira, K.D. Grugan, D.B. Stairs, J. Kalabis, M.E. Vega, R.A. Kalman, M. Nakagawa, A.J. Klein-Szanto, M. Herlyn, J.A. Diehl, A.K. Rustgi, and H. Nakagawa, *Epidermal growth factor receptor and mutant p53 expand an esophageal cellular subpopulation capable of epithelial-to-mesenchymal transition through ZEB transcription factors*. Cancer Res, 2010. **70**(10): p. 4174-84.
333. Aziz, S.A., S. Pervez, S. Khan, N. Kayani, S.I. Azam, and M.H. Rahbar, *Case control study of prognostic markers and disease outcome in inflammatory carcinoma breast: a unique clinical experience*. Breast J, 2001. **7**(6): p. 398-404.
334. Dawood, S. and M. Cristofanilli, *Inflammatory breast cancer: what progress have we made?* Oncology (Williston Park), 2011. **25**(3): p. 264-70, 273.
335. Bombonati, A. and D.C. Sgroi, *The molecular pathology of breast cancer progression*. J Pathol, 2011. **223**(2): p. 307-17.
336. Olivier, M., A. Langerod, P. Carrieri, J. Bergh, S. Klaar, J. Eyfjord, C. Theillet, C. Rodriguez, R. Lidereau, I. Bieche, J. Varley, Y. Bignon, N. Uhrhammer, R. Winqvist, A. Jukkola-Vuorinen, D. Niederacher, S. Kato, C. Ishioka, P. Hainaut, and A.L. Borresen-Dale, *The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(4): p. 1157-67.
337. Curtis, C., S.P. Shah, S.F. Chin, G. Turashvili, O.M. Rueda, M.J. Dunning, D. Speed, A.G. Lynch, S. Samarajiwa, Y. Yuan, S. Graf, G. Ha, G. Haffari, A. Bashashati, R. Russell, S. McKinney, A. Langerod, A. Green, E. Provenzano, G. Wishart, S. Pinder, P. Watson, F. Markowitz, L. Murphy, I. Ellis, A. Purushotham, A.L. Borresen-Dale, J.D. Brenton, S. Tavare, C. Caldas, and S. Aparicio, *The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups*. Nature, 2012. **486**(7403): p. 346-52.
338. Schneider, G. and O.H. Kramer, *NFkappaB/p53 crosstalk-a promising new therapeutic target*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1815**(1): p. 90-103.
339. Karin, M. and L. Staudt, *NF-[kappa] B : a network hub controlling immunity, inflammation, and cancer : a subject collection from Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2010, Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. viii, 271 p.
340. Pahl, H.L., *Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors*. Oncogene, 1999. **18**(49): p. 6853-66.
341. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *Signaling to NF-kappaB*. Genes Dev, 2004. **18**(18): p. 2195-224.

342. Kiernan, R., V. Bres, R.W. Ng, M.P. Coudart, S. El Messaoudi, C. Sardet, D.Y. Jin, S. Emiliani, and M. Benkirane, *Post-activation turn-off of NF-kappa B-dependent transcription is regulated by acetylation of p65*. J Biol Chem, 2003. **278**(4): p. 2758-66.
343. Baldwin, A.S., Jr., *The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights*. Annu Rev Immunol, 1996. **14**: p. 649-83.
344. Ryseck, R.P., P. Bull, M. Takamiya, V. Bours, U. Siebenlist, P. Dobrzanski, and R. Bravo, *RelB, a new Rel family transcription activator that can interact with p50-NF-kappa B*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(2): p. 674-84.
345. Dobrzanski, P., R.P. Ryseck, and R. Bravo, *Differential interactions of Rel-NF-kappa B complexes with I kappa B alpha determine pools of constitutive and inducible NF-kappa B activity*. Embo J, 1994. **13**(19): p. 4608-16.
346. Grumont, R.J. and S. Gerondakis, *The subunit composition of NF-kappa B complexes changes during B-cell development*. Cell Growth Differ, 1994. **5**(12): p. 1321-31.
347. Miyamoto, S., M.J. Schmitt, and I.M. Verma, *Qualitative changes in the subunit composition of kappa B-binding complexes during murine B-cell differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(11): p. 5056-60.
348. Dobrzanski, P., R.P. Ryseck, and R. Bravo, *Both N- and C-terminal domains of RelB are required for full transactivation: role of the N-terminal leucine zipper-like motif*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(3): p. 1572-82.
349. Ghosh, G., G. van Duyne, S. Ghosh, and P.B. Sigler, *Structure of NF-kappa B p50 homodimer bound to a kappa B site*. Nature, 1995. **373**(6512): p. 303-10.
350. Oeckinghaus, A., M.S. Hayden, and S. Ghosh, *Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways*. Nat Immunol, 2011. **12**(8): p. 695-708.
351. Grimm, S. and P.A. Baeuerle, *The inducible transcription factor NF-kappa B: structure-function relationship of its protein subunits*. Biochem J, 1993. **290** (Pt 2): p. 297-308.
352. Chen, F., V. Castranova, X. Shi, and L.M. Demers, *New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases*. Clin Chem, 1999. **45**(1): p. 7-17.
353. Chen, F.E., D.B. Huang, Y.Q. Chen, and G. Ghosh, *Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF-kappaB bound to DNA*. Nature, 1998. **391**(6665): p. 410-3.
354. Natoli, G., S. Sacconi, D. Bosisio, and I. Marazzi, *Interactions of NF-kappaB with chromatin: the art of being at the right place at the right time*. Nat Immunol, 2005. **6**(5): p. 439-45.
355. Natoli, G., *Tuning up inflammation: how DNA sequence and chromatin organization control the induction of inflammatory genes by NF-kappaB*. FEBS Lett, 2006. **580**(12): p. 2843-9.
356. Cao, Y. and M. Karin, *NF-kappaB in mammary gland development and breast cancer*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2003. **8**(2): p. 215-23.
357. Brantley, D.M., C.L. Chen, R.S. Muraoka, P.B. Bushdid, J.L. Bradberry, F. Kittrell, D. Medina, L.M. Matrisian, L.D. Kerr, and F.E. Yull, *Nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) regulates proliferation and branching in mouse mammary epithelium*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(5): p. 1445-55.
358. Biswas, D.K., Q. Shi, S. Bailly, I. Strickland, S. Ghosh, A.B. Pardee, and J.D. Iglehart, *NF-kappa B activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(27): p. 10137-42.
359. Karin, M., Y. Cao, F.R. Greten, and Z.W. Li, *NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(4): p. 301-10.

360. Sovak, M.A., R.E. Bellas, D.W. Kim, G.J. Zanieski, A.E. Rogers, A.M. Traish, and G.E. Sonenshein, *Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer*. *J Clin Invest*, 1997. **100**(12): p. 2952-60.
361. Shin, S.R., N. Sanchez-Velazquez, D.H. Sherr, and G.E. Sonenshein, *7,12-dimethylbenz(a)anthracene treatment of a c-rel mouse mammary tumor cell line induces epithelial to mesenchymal transition via activation of nuclear factor-kappaB*. *Cancer Res*, 2006. **66**(5): p. 2570-5.
362. Huber, M.A., H. Beug, and T. Wirth, *Epithelial-mesenchymal transition: NF-kappaB takes center stage*. *Cell Cycle*, 2004. **3**(12): p. 1477-80.
363. Huber, M.A., N. Azoitei, B. Baumann, S. Grunert, A. Sommer, H. Pehamberger, N. Kraut, H. Beug, and T. Wirth, *NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression*. *J Clin Invest*, 2004. **114**(4): p. 569-81.
364. Romieu-Mourez, R., D.W. Kim, S.M. Shin, E.G. Demicco, E. Landesman-Bollag, D.C. Seldin, R.D. Cardiff, and G.E. Sonenshein, *Mouse mammary tumor virus c-rel transgenic mice develop mammary tumors*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(16): p. 5738-54.
365. Kim, D.W., M.A. Sovak, G. Zanieski, G. Nonet, R. Romieu-Mourez, A.W. Lau, L.J. Hafer, P. Yaswen, M. Stampfer, A.E. Rogers, J. Russo, and G.E. Sonenshein, *Activation of NF-kappaB/Rel occurs early during neoplastic transformation of mammary cells*. *Carcinogenesis*, 2000. **21**(5): p. 871-9.
366. Cogswell, P.C., D.C. Guttridge, W.K. Funkhouser, and A.S. Baldwin, Jr., *Selective activation of NF-kappa B subunits in human breast cancer: potential roles for NF-kappa B2/p52 and for Bcl-3*. *Oncogene*, 2000. **19**(9): p. 1123-31.
367. Dejardin, E., G. Bonizzi, A. Bellahcene, V. Castronovo, M.P. Merville, and V. Bours, *Highly-expressed p100/p52 (NFKB2) sequesters other NF-kappa B-related proteins in the cytoplasm of human breast cancer cells*. *Oncogene*, 1995. **11**(9): p. 1835-41.
368. Nakshatri, H., P. Bhat-Nakshatri, D.A. Martin, R.J. Goulet, Jr., and G.W. Sledge, Jr., *Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormone-independent growth*. *Mol Cell Biol*, 1997. **17**(7): p. 3629-39.
369. Scian, M.J., K.E. Stagliano, M.A. Anderson, S. Hassan, M. Bowman, M.F. Miles, S.P. Deb, and S. Deb, *Tumor-derived p53 mutants induce NF-kappaB2 gene expression*. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(22): p. 10097-110.
370. Armstrong, M.B., X. Bian, Y. Liu, C. Subramanian, A.B. Ratanaproeaksa, F. Shao, V.C. Yu, R.P. Kwok, A.W. Opipari, and V.P. Castle, *Signaling from p53 to NF-kappa B determines the chemotherapy responsiveness of neuroblastoma*. *Neoplasia*, 2006. **8**(11): p. 964-74.
371. Ryan, K.M., M.K. Ernst, N.R. Rice, and K.H. Vousden, *Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death*. *Nature*, 2000. **404**(6780): p. 892-7.
372. Schneider, G., A. Henrich, G. Greiner, V. Wolf, A. Lovas, M. Wiczorek, T. Wagner, S. Reichardt, A. von Werder, R.M. Schmid, F. Weih, T. Heinzel, D. Saur, and O.H. Kramer, *Cross talk between stimulated NF-kappaB and the tumor suppressor p53*. *Oncogene*, 2010. **29**(19): p. 2795-806.
373. Doohar, J.E., I. Paz-Priel, S. Houg, A.S. Baldwin, Jr., and A.D. Friedman, *C/EBPalpha, C/EBPalpha oncoproteins, or C/EBPbeta preferentially bind NF-kappaB p50 compared with p65, focusing therapeutic targeting on the C/EBP:p50 interaction*. *Mol Cancer Res*, 2011. **9**(10): p. 1395-405.
374. Ramji, D.P. and P. Foka, *CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation*. *Biochem J*, 2002. **365**(Pt 3): p. 561-75.

375. Nerlov, C. and E.B. Ziff, *CCAAT/enhancer binding protein-alpha amino acid motifs with dual TBP and TFIIB binding ability co-operate to activate transcription in both yeast and mammalian cells*. *Embo J*, 1995. **14**(17): p. 4318-28.
376. Mink, S., B. Haenig, and K.H. Klempnauer, *Interaction and functional collaboration of p300 and C/EBPbeta*. *Mol Cell Biol*, 1997. **17**(11): p. 6609-17.
377. Baer, M. and P.F. Johnson, *Generation of truncated C/EBPbeta isoforms by in vitro proteolysis*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(34): p. 26582-90.
378. Xiong, W., C.C. Hsieh, A.J. Kurtz, J.P. Rabek, and J. Papaconstantinou, *Regulation of CCAAT/enhancer-binding protein-beta isoform synthesis by alternative translational initiation at multiple AUG start sites*. *Nucleic Acids Res*, 2001. **29**(14): p. 3087-98.
379. Zahnow, C.A., *CCAAT/enhancer-binding protein beta: its role in breast cancer and associations with receptor tyrosine kinases*. *Expert Rev Mol Med*, 2009. **11**: p. e12.
380. Kowenz-Leutz, E., G. Twamley, S. Ansieau, and A. Leutz, *Novel mechanism of C/EBP beta (NF-M) transcriptional control: activation through derepression*. *Genes Dev*, 1994. **8**(22): p. 2781-91.
381. Williams, S.C., M. Baer, A.J. Dillner, and P.F. Johnson, *CRP2 (C/EBP beta) contains a bipartite regulatory domain that controls transcriptional activation, DNA binding and cell specificity*. *Embo J*, 1995. **14**(13): p. 3170-83.
382. Zhu, S., K. Yoon, E. Sterneck, P.F. Johnson, and R.C. Smart, *CCAAT/enhancer binding protein-beta is a mediator of keratinocyte survival and skin tumorigenesis involving oncogenic Ras signaling*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(1): p. 207-12.
383. Liao, J., G. Piwien-Pilipuk, S.E. Ross, C.L. Hodge, L. Sealy, O.A. MacDougald, and J. Schwartz, *CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBPbeta) and C/EBPdelta contribute to growth hormone-regulated transcription of c-fos*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(44): p. 31597-604.
384. Shuman, J.D., T. Sebastian, P. Kaldis, T.D. Copeland, S. Zhu, R.C. Smart, and P.F. Johnson, *Cell cycle-dependent phosphorylation of C/EBPbeta mediates oncogenic cooperativity between C/EBPbeta and H-RasV12*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(17): p. 7380-91.
385. Moll, J.R., A. Acharya, J. Gal, A.A. Mir, and C. Vinson, *Magnesium is required for specific DNA binding of the CREB B-ZIP domain*. *Nucleic Acids Res*, 2002. **30**(5): p. 1240-6.
386. Osada, S., H. Yamamoto, T. Nishihara, and M. Imagawa, *DNA binding specificity of the CCAAT/enhancer-binding protein transcription factor family*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(7): p. 3891-6.
387. Vegesna, V., S. Takeuchi, W.K. Hofmann, T. Ikezoe, S. Tavor, U. Krug, A.C. Fermin, A. Heaney, C.W. Miller, and H.P. Koeffler, *C/EBP-beta, C/EBP-delta, PU.1, AML1 genes: mutational analysis in 381 samples of hematopoietic and solid malignancies*. *Leuk Res*, 2002. **26**(5): p. 451-7.
388. Rhodes, D.R., J. Yu, K. Shanker, N. Deshpande, R. Varambally, D. Ghosh, T. Barrette, A. Pandey, and A.M. Chinnaiyan, *ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform*. *Neoplasia*, 2004. **6**(1): p. 1-6.
389. Alaoui-Jamali, M.A., D.J. Song, N. Benlimame, L. Yen, X. Deng, M. Hernandez-Perez, and T. Wang, *Regulation of multiple tumor microenvironment markers by overexpression of single or paired combinations of ErbB receptors*. *Cancer Res*, 2003. **63**(13): p. 3764-74.
390. van 't Veer, L.J., H. Dai, M.J. van de Vijver, Y.D. He, A.A. Hart, M. Mao, H.L. Peterse, K. van der Kooy, M.J. Marton, A.T. Witteveen, G.J. Schreiber, R.M. Kerkhoven, C. Roberts, P.S. Linsley, R. Bernards, and S.H. Friend, *Gene expression*

- profiling predicts clinical outcome of breast cancer.* Nature, 2002. 415(6871): p. 530-6.
391. Gruvberger, S., M. Ringner, Y. Chen, S. Panavally, L.H. Saal, A. Borg, M. Ferno, C. Peterson, and P.S. Meltzer, *Estrogen receptor status in breast cancer is associated with remarkably distinct gene expression patterns.* Cancer Res, 2001. 61(16): p. 5979-84.
 392. Finak, G., N. Bertos, F. Pepin, S. Sadekova, M. Souleimanova, H. Zhao, H. Chen, G. Omeroglu, S. Meterissian, A. Omeroglu, M. Hallett, and M. Park, *Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer.* Nat Med, 2008. 14(5): p. 518-27.
 393. van de Vijver, M.J., Y.D. He, L.J. van't Veer, H. Dai, A.A. Hart, D.W. Voskuil, G.J. Schreiber, J.L. Peterse, C. Roberts, M.J. Marton, M. Parrish, D. Atsma, A. Witteveen, A. Glas, L. Delahaye, T. van der Velde, H. Bartelink, S. Rodenhuis, E.T. Rutgers, S.H. Friend, and R. Bernards, *A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer.* N Engl J Med, 2002. 347(25): p. 1999-2009.
 394. Ma, X.J., Z. Wang, P.D. Ryan, S.J. Isakoff, A. Barnettler, A. Fuller, B. Muir, G. Mohapatra, R. Salunga, J.T. Tuggle, Y. Tran, D. Tran, A. Tassin, P. Amon, W. Wang, E. Enright, K. Stecker, E. Estepa-Sabal, B. Smith, J. Younger, U. Balis, J. Michaelson, A. Bhan, K. Habin, T.M. Baer, J. Brugge, D.A. Haber, M.G. Erlander, and D.C. Sgroi, *A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen.* Cancer Cell, 2004. 5(6): p. 607-16.
 395. Zahnow, C.A., P. Younes, R. Laucirica, and J.M. Rosen, *Overexpression of C/EBPbeta-LIP, a naturally occurring, dominant-negative transcription factor, in human breast cancer.* J Natl Cancer Inst, 1997. 89(24): p. 1887-91.
 396. Milde-Langosch, K., T. Loning, and A.M. Bamberger, *Expression of the CCAAT/enhancer-binding proteins C/EBPalpha, C/EBPbeta and C/EBPdelta in breast cancer: correlations with clinicopathologic parameters and cell-cycle regulatory proteins.* Breast Cancer Res Treat, 2003. 79(2): p. 175-85.
 397. Zahnow, C.A., R.D. Cardiff, R. Laucirica, D. Medina, and J.M. Rosen, *A role for CCAAT/enhancer binding protein beta-liver-enriched inhibitory protein in mammary epithelial cell proliferation.* Cancer Res, 2001. 61(1): p. 261-9.
 398. Baldwin, B.R., N.A. Timchenko, and C.A. Zahnow, *Epidermal growth factor receptor stimulation activates the RNA binding protein CUG-BP1 and increases expression of C/EBPbeta-LIP in mammary epithelial cells.* Mol Cell Biol, 2004. 24(9): p. 3682-91.
 399. Gomis, R.R., C. Alarcon, C. Nadal, C. Van Poznak, and J. Massague, *C/EBPbeta at the core of the TGFbeta cytosolic response and its evasion in metastatic breast cancer cells.* Cancer Cell, 2006. 10(3): p. 203-14.
 400. Eaton, E.M., M. Hanlon, L. Bundy, and L. Sealy, *Characterization of C/EBPbeta isoforms in normal versus neoplastic mammary epithelial cells.* J Cell Physiol, 2001. 189(1): p. 91-105.
 401. Ewing, S.J., S. Zhu, F. Zhu, J.S. House, and R.C. Smart, *C/EBPbeta represses p53 to promote cell survival downstream of DNA damage independent of oncogenic Ras and p19(Arf).* Cell Death Differ, 2008. 15(11): p. 1734-44.
 402. Yoon, K., S. Zhu, S.J. Ewing, and R.C. Smart, *Decreased survival of C/EBP beta-deficient keratinocytes is due to aberrant regulation of p53 levels and function.* Oncogene, 2007. 26(3): p. 360-7.
 403. Stein, B., P.C. Cogswell, and A.S. Baldwin, Jr., *Functional and physical associations between NF-kappa B and C/EBP family members: a Rel domain-bZIP interaction.* Mol Cell Biol, 1993. 13(7): p. 3964-74.

404. Akira, S., H. Isshiki, T. Sugita, O. Tanabe, S. Kinoshita, Y. Nishio, T. Nakajima, T. Hirano, and T. Kishimoto, *A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family*. *Embo J*, 1990. **9**(6): p. 1897-906.
405. Libermann, T.A. and D. Baltimore, *Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor*. *Mol Cell Biol*, 1990. **10**(5): p. 2327-34.
406. Zhang, Y.H., J.X. Lin, and J. Vilcek, *Interleukin-6 induction by tumor necrosis factor and interleukin-1 in human fibroblasts involves activation of a nuclear factor binding to a kappa B-like sequence*. *Mol Cell Biol*, 1990. **10**(7): p. 3818-23.
407. Matsusaka, T., K. Fujikawa, Y. Nishio, N. Mukaida, K. Matsushima, T. Kishimoto, and S. Akira, *Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(21): p. 10193-7.
408. Isshiki, H., S. Akira, O. Tanabe, T. Nakajima, T. Shimamoto, T. Hirano, and T. Kishimoto, *Constitutive and interleukin-1 (IL-1)-inducible factors interact with the IL-1-responsive element in the IL-6 gene*. *Mol Cell Biol*, 1990. **10**(6): p. 2757-64.
409. Ron, D., A.R. Brasier, K.A. Wright, J.E. Tate, and J.F. Habener, *An inducible 50-kilodalton NF kappa B-like protein and a constitutive protein both bind the acute-phase response element of the angiotensinogen gene*. *Mol Cell Biol*, 1990. **10**(3): p. 1023-32.
410. Mukaida, N., Y. Mahe, and K. Matsushima, *Cooperative interaction of nuclear factor-kappa B- and cis-regulatory enhancer binding protein-like factor binding elements in activating the interleukin-8 gene by pro-inflammatory cytokines*. *J Biol Chem*, 1990. **265**(34): p. 21128-33.
411. Stein, B. and A.S. Baldwin, Jr., *Distinct mechanisms for regulation of the interleukin-8 gene involve synergism and cooperativity between C/EBP and NF-kappa B*. *Mol Cell Biol*, 1993. **13**(11): p. 7191-8.
412. Kang, S.M., A.C. Tran, M. Grilli, and M.J. Lenardo, *NF-kappa B subunit regulation in nontransformed CD4+ T lymphocytes*. *Science*, 1992. **256**(5062): p. 1452-6.
413. Zhong, H., M.J. May, E. Jimi, and S. Ghosh, *The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1*. *Mol Cell*, 2002. **9**(3): p. 625-36.
414. Paz-Priel, I., S. Houg, J. Doohar, and A.D. Friedman, *C/EBPalpha and C/EBPalpha oncoproteins regulate nfkbl and displace histone deacetylases from NF-kappaB p50 homodimers to induce NF-kappaB target genes*. *Blood*, 2011. **117**(15): p. 4085-94.
415. Cappello, C., A. Zwergal, S. Kanclerski, S.C. Haas, J.D. Kandemir, R. Huber, S. Page, and K. Brand, *C/EBPbeta enhances NF-kappaB-associated signalling by reducing the level of IkappaB-alpha*. *Cell Signal*, 2009. **21**(12): p. 1918-24.
416. Pal, R., M. Janz, D.L. Galson, M. Gries, S. Li, K. Johrens, I. Anagnostopoulos, B. Dorken, M.Y. Mapara, L. Borghesi, L. Kardava, G.D. Roodman, C. Milcarek, and S. Lentzsch, *C/EBPbeta regulates transcription factors critical for proliferation and survival of multiple myeloma cells*. *Blood*, 2009. **114**(18): p. 3890-8.
417. Kim, M.H., A.Z. Minton, and V. Agrawal, *C/EBPbeta regulates metastatic gene expression and confers TNF-alpha resistance to prostate cancer cells*. *Prostate*, 2009. **69**(13): p. 1435-47.
418. Ho, W.C., K.M. Dickson, and P.A. Barker, *Nuclear factor-kappaB induced by doxorubicin is deficient in phosphorylation and acetylation and represses nuclear factor-kappaB-dependent transcription in cancer cells*. *Cancer Res*, 2005. **65**(10): p. 4273-81.
419. Chan, H.M. and N.B. La Thangue, *p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds*. *J Cell Sci*, 2001. **114**(Pt 13): p. 2363-73.

420. Koster, M.I., S. Kim, A.A. Mills, F.J. DeMayo, and D.R. Roop, *p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program*. Genes Dev, 2004. **18**(2): p. 126-31.
421. Siegfried, Z., S. Eden, M. Mendelsohn, X. Feng, B.Z. Tsuberi, and H. Cedar, *DNA methylation represses transcription in vivo*. Nat Genet, 1999. **22**(2): p. 203-6.
422. Demers, M., J. Couillard, G. Giglia-Mari, T. Magnaldo, and Y. St-Pierre, *Increased galectin-7 gene expression in lymphoma cells is under the control of DNA methylation*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **387**(3): p. 425-9.
423. Asselin-Labat, M.L., K.D. Sutherland, H. Barker, R. Thomas, M. Shackleton, N.C. Forrest, L. Hartley, L. Robb, F.G. Grosveld, J. van der Wees, G.J. Lindeman, and J.E. Visvader, *Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(2): p. 201-9.
424. Zhou, M. and W. Ouyang, *The function role of GATA-3 in Th1 and Th2 differentiation*. Immunol Res, 2003. **28**(1): p. 25-37.
425. Wang, Z. and Y. Sun, *Targeting p53 for Novel Anticancer Therapy*. Transl Oncol, 2010. **3**(1): p. 1-12.
426. Chuthapisith, S., J.M. Eremin, M. El-Sheemy, and O. Eremin, *Neoadjuvant chemotherapy in women with large and locally advanced breast cancer: chemoresistance and prediction of response to drug therapy*. Surgeon, 2006. **4**(4): p. 211-9.