

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

EXPRESSION ET FONCTIONS DES GALECTINES DANS LE CANCER DU SEIN

Par

Andrée-Anne Grosset, M.Sc.

Thèse présentée pour l'obtention du grade de
Philosophiae doctor (Ph.D.)
en virologie et immunologie

Jury d'évaluation

Président du jury et examineur interne	Cathy Vaillancourt, Ph.D. INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Sylvie Mader, Ph.D. Institut de recherche en Immunologie et en Cancérologie
Examineur externe	Gilles Gouspillou, Ph.D. UQÀM, Complexe des sciences
Directeur de recherche	Yves St-Pierre, Ph.D. INRS-Institut Armand-Frappier
Codirecteur de recherche	Louis Gaboury, M.D., Ph.D., FRCP(C) Institut de recherche en Immunologie et en Cancérologie

*À toutes ces femmes qui doivent se battre contre le cancer du sein.
Je ne pourrai jamais vous remercier suffisamment pour votre générosité
envers la recherche.*

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier tout spécialement mes directeurs de thèse, le professeur Yves St-Pierre et le Dr Louis Gaboury. Je leur dois mon dépassement professionnel, ma passion pour la recherche sur le cancer, ainsi que le désir de comprendre les principes de la biologie. Je ne pourrai jamais assez les remercier de m'avoir transmis toutes leurs connaissances, en recherche clinique et fondamentale, en m'accordant de leur temps. Bien entendu, je n'aurais jamais pu concilier mes études graduées et ma vie familiale sans leur support. Je voudrais aussi exprimer toute ma gratitude, spécialement à Yves, pour m'avoir permis d'assister et de présenter au congrès annuel 2014 de l'*American Association for Cancer Research* (AACR), ce qui m'a grandement inspiré pour l'écriture de mes articles scientifiques et de ma thèse.

Cette aventure qu'est le doctorat se partage avec une équipe de laboratoire qui devient peu à peu des amis. Le support de mes collègues de l'INRS-Institut Armand-Frappier, ainsi que de l'IRIC, a été sans contredit essentiel à mon parcours. L'avancement des connaissances sur la galectine-7 dans le cancer n'aurait jamais pu être aussi impressionnant, au cours de ces dernières années, sans l'équipe du laboratoire du professeur Yves St-Pierre: Carole Campion, Marilyne Labrie, Maria-Claudia Vladoiu et moi-même. De plus, ce projet de thèse n'aurait jamais pu être mené sans les fonds des IRSC et du CRSNG. J'ai également eu le privilège d'obtenir des bourses de formation au doctorat par la Fondation Armand-Frappier et le FRQS.

Finalement, j'ai reçu le plus beau des cadeaux au cours de ces 7 dernières années: mes enfants, Maëva et Joakym. Leur joie de vivre m'inspire un peu plus chaque jour et me donne la force de poursuivre dans le domaine de la recherche en santé. Les encouragements de mon mari, Ezup, pour la poursuite de mes études graduées ont également fait toute la différence. Grâce à son dévouement en tant que père, la conciliation travail-famille a été possible. Mes derniers remerciements sont pour ma famille, ainsi que ma belle-famille qui ont toujours cru en moi et mes amis pour leurs précieux conseils.

LISTE DES RÉALISATIONS SCIENTIFIQUES

Publications

Total: 11 **1^{ère} auteure:** 2

Grosset AA, Poirier F, Gaboury L & St-Pierre Y (2016) Galectin-7 expression potentiates HER-2 positive phenotype in breast cancer. (en préparation)

Grosset AA, Labrie M, Vladoiu MC, Youssef EM, Gaboury L & St-Pierre Y (2016) Galectin signatures contribute to the heterogeneity of breast cancer and provide new prognostic information and therapeutic targets. *Oncotarget* doi: 10.18632/oncotarget.7784.

Vladoiu MC, Labrie M, Létourneau M, Egesborg P, Gagné D, Billard E, **Grosset AA**, Doucet N, Chatenet D & St-Pierre Y (2015) Design of a peptidic inhibitor that targets the dimer interface of a prototypic galectin. *Oncotarget* 6(38): 40970-80.

Labrie M, Vladoiu MC, Leclerc BG, **Grosset AA**, Gaboury L, Stagg & St-Pierre Y (2015) A mutation in the carbohydrate recognition domain drives a phenotypic switch in the role of galectin-7 in prostate cancer. *PLoS One* 10(7): e0131307.

Grosset AA, Labrie M, Gagné D, Vladoiu MC, Gaboury L, Doucet N & St-Pierre Y (2014) Cytosolic galectin-7 impairs p53 functions and induces chemoresistance in breast cancer cells. *BMC Cancer* 14(1): 801.

Labrie M, Vladoiu MC, **Grosset AA**, Gaboury L & St-Pierre Y (2014) Galectin-7 expression and functions in ovarian cancer. *Oncotarget* 5(17): 7705-21.

Campion CG, Labrie M, **Grosset AA**, Gaboury L & St-Pierre Y (2014) The LAP2 isoform of CCAAT/Enhancer-binding Protein β (C/EBP β) upregulates galectin-7 expression in human breast cancer cells. *PLoS One* 9(5): e95087.

Biron-Pain K, **Grosset AA**, Poirier F, Gaboury L & St-Pierre Y (2013) Expression and functions of galectin-7 in human and murine melanomas. *PLoS One* 8(5): e63307.

Fathers KE, Bell ES, Rajadurai CV, Cory S, Zhao H, Mourskaia A, Zuo D, Madore J, Monast A, Mes-Masson AM, **Grosset AA**, Gaboury L, Hallet M, Siegel P & Park M (2012) Crk adaptor proteins act as key signaling integrators for breast tumorigenesis. *Breast Cancer Research* 14(3): R74.

St-Pierre Y, Campion CG & **Grosset AA** (2012) A distinctive role for galectin-7 in cancer? *Frontiers in Bioscience* 17: 438-50.

Demers M, Rose AA, **Grosset AA**, Biron-Pain K, Gaboury L, Siegel PM & St-Pierre Y (2010) Overexpression of galectin-7, a myoepithelial cell marker, enhances spontaneous metastasis of breast cancer cells. *The American Journal of Pathology* 176(6): 3023-31.

Rose AA, **Grosset AA**, Dong Z, Russo C, Macdonald PA, Bertos NR, St-Pierre Y, Simantov R, Hallet M, Park M, Gaboury L & Siegel PM (2010) Glycoprotein nonmetastatic B is an independent prognostic indicator of recurrence and a novel therapeutic target in breast cancer. *Clinical Cancer Research* 16(7): 2147-56.

Résumés publiés de congrès internationaux

Total: 4 1^{ère} auteure: 2

St-Pierre Y, **Grosset AA**, Labrie M, Gagné D, Vladioiu MC, Gaboury L & Doucet N (2015) Galectin-7 increases resistance of breast cancer cells to drug-induced apoptosis and promotes tumor escape by killing T cells. *Cancer Research* 75(9 Suppl): P1-07-16.

Grosset AA, Gagné D, Labrie M, Vladioiu MC, Gaboury L, Doucet N & St-Pierre Y (2014) Cytoplasmic galectin-7 has an antiapoptotic function by decreasing p53 nuclear translocation in breast cancer cells. *Cancer Research* 74(19 Suppl): 1352.

Labrie M, Vladioiu MC, **Grosset AA**, Gaboury L & St-Pierre Y (2014) Galectin-7 increases the invasive behavior of ovarian cancer cells and promotes tumor escape. *Cancer Research* 74(19 Suppl): 152.

Grosset AA, Gaboury L & St-Pierre Y (2008) Galectin-7 is expressed in high-grade human breast cancers. *Histopathology* 53 suppl.1: 40.

Présentations orales

Total: 3 Primées: 2 1^{ère} auteure: 2

Sirois J, Trinh QH, Mansouri B, **Grosset AA**, Albadine R, Latour M, Saad F & Trudel D (2015) Intraductal carcinoma of the prostate is associated with distant recurrence rather than with local recurrence: an insight to treatment planning. *31^e Journée scientifique du Département de pathologie et biologie cellulaire de l'Université de Montréal*. CRCHUM, Montréal, Qc, Canada.

***Jennifer Sirois est récipiendaire d'un prix pour la présentation**

Grosset AA, Labrie M, Gagné D, Vladioiu MC, Gaboury L, Doucet N & St-Pierre Y (2014) La galectine-7 cytoplasmique a une fonction anti-apoptotique par la régulation négative de p53 dans les cellules du cancer du sein. *Colloque La Recherche en Santé – Faculté des sciences de l'UQAM*. Montréal, Qc, Canada.

***Récipiendaire d'un prix pour la présentation**

Grosset AA & Gaboury L (2008) Carcinome mammaire de phénotype basal et pouvoir métastatique. *Congrès annuel des stagiaires de la Faculté de médecine (COPSÉ)*. Université de Montréal, Montréal, Qc, Canada.

Présentations par affiche

Total: 26 Primées: 3 1^{ère} auteure: 10 International: 7

Ait Slimane A, Lauzon N, **Grosset AA**, Fossouo L, Saad F, Chaurand P & Trudel D (2015) Intraductal carcinoma of the prostate: Imaging mass spectrometry for *in situ* characterization oriented on the prognosis. *25^{ème} Journée Annuelle de l'Institut du cancer de Montréal*. CRCHUM, Montréal, Qc, Canada.

Ait Slimane A, Lauzon N, **Grosset AA**, Fossouo L, Saad F, Chaurand P & Trudel D (2015) Intraductal carcinoma of the prostate: Imaging mass spectrometry for *in situ* characterization oriented on the prognosis. *31^e Journée scientifique du Département de pathologie et biologie cellulaire de l'Université de Montréal*. CRCHUM, Montréal, Qc, Canada.

Vladoiu MC, Labrie M, Létourneau M, Egesborg P, Gagné D, Billard E, **Grosset AA**, Doucet N, Chatenet D & St-Pierre Y (2015) A novel approach to disrupt the homodimeric structure of galectin-7 and its pro-apoptotic function on T-lymphocytes. *15e symposium annuel PROTEO*. Université Laval, Québec, Qc, Canada.

Vladoiu MC, Labrie M, Létourneau M, Gagné D, **Grosset AA**, Billard E, Doucet N, Chatenet D & St-Pierre Y (2015) Conception d'un inhibiteur peptidique ciblant l'interface dimérique de la galectine-7 et inhibant ses fonctions pro-apoptotiques. *Colloque annuel BioMed-FODAR*. Sainte-Adèle, Qc, Canada.

St-Pierre Y, **Grosset AA**, Labrie M, Gagné D, Vladoiu MC, Gaboury L & Doucet N (2014) Galectin-7 increases resistance of breast cancer cells to drug-induced apoptosis and promotes tumor escape by killing T cells. *Thirty-Seventh Annual CTRC-AACR San Antonio Breast Cancer Symposium*. San Antonio, Texas, États-Unis.

Labrie M, Vladoiu MC, **Grosset AA**, Gaboury L & St-Pierre Y (2014) Galectin-7 increases the invasive behavior of ovarian cancer cells and promotes tumor immune escape. *5th Annual Ovarian Cancer Symposium*. Princess Margaret Cancer Center, Toronto, ON, Canada.

Vladoiu MC, Labrie M, Létourneau M, Gagné D, **Grosset AA**, Billard E, Doucet N, Chatenet D & St-Pierre Y (2014) A new approach to inhibit the immunosuppressive properties of galectin-7 in ovarian cancer. *5th Annual Ovarian Cancer Symposium*. Princess Margaret Cancer Center, Toronto, ON, Canada.

Vladoiu MC, Labrie M, Létourneau M, Gagné D, **Grosset AA**, Billard E, Doucet N, Chatenet D & St-Pierre Y (2014) A novel approach to disrupt the homodimeric galectin-7 structure decreases its pro-apoptotic activity on T-lymphocytes. *33rd European Peptide Symposium*. Sofia, Bulgarie.

Vladoiu MC, Labrie M, Gagné D, **Grosset AA**, Billard E, Doucet N, Chatenet D & St-Pierre Y (2014) Le rôle de la structure homodimérique de la galectine-7 dans l'apoptose des lymphocytes T. *Colloque La Recherche en Santé – Faculté des sciences de l'UQAM*. Montréal, Qc, Canada.

***Maria Claudia Vladoiu est récipiendaire d'un prix pour la présentation**

Labrie M, Vladioiu MC, **Grosset AA**, Gaboury L & St-Pierre Y (2014) La galectine-7 augmente le potentiel invasif des cellules cancéreuses ovariennes et favorise l'immunosuppression. *Colloque La Recherche en Santé – Faculté des sciences de l'UQAM*. Montréal, Qc, Canada.

Grosset AA, Gagné D, Labrie M, Vladioiu MC, Gaboury L, Doucet N & St-Pierre Y (2014) Cytoplasmic galectin-7 has an anti-apoptotic function by decreasing p53 nuclear translocation in breast cancer cells. *AACR Annual Meeting 2014*. San Diego, Californie, États-Unis.

Labrie M, Vladioiu MC, **Grosset AA**, Gaboury L & St-Pierre Y (2014) Galectin-7 increases the invasive behavior of ovarian cancer cells and promotes tumor escape. *AACR Annual Meeting 2014*. San Diego, Californie, États-Unis.

Beauchamp S, Gagné D, **Grosset AA**, Gaboury L, St-Pierre Y & Doucet N (2013) Investigating the role between protein structure and biological function in the cancer-associated galectine-7. *13e symposium annuel PROTEO*. Laval, Qc, Canada.

Labrie M, Vladioiu MC, **Grosset AA** & St-Pierre Y (2013) Galectine-7: nouvelle cible thérapeutique contre les cancers du sein et de l'ovaire. *Colloque annuel du RQRM*. Hotel Best Western Europa, Montréal, Qc, Canada.

Grosset AA, Gaboury L & St-Pierre Y (2012) Relations structure-fonction de la galectine-7 dans le cancer du sein. *Huitième colloque annuel du BioMed*. UQAM, Montréal, Qc, Canada.

***Récipiendaire d'un prix pour la présentation**

Grosset AA, Gendronneau G, Poirier F, Gaboury L & St-Pierre Y (2011) Impact de l'expression de galectine-7 dans un modèle transgénique pré-clinique du cancer du sein HER-2 positif. *Septième colloque annuel du BioMed*. UQAM, Montréal, Qc, Canada.

Grosset AA, Gaboury L & St-Pierre Y (2010) Implication de la voie de signalisation HER-2 dans l'expression de la galectine-7 dans le cancer du sein. *Congrès Signalisation Québec*. Estrimont Suites et Spas, Orford, Qc, Canada.

Grosset AA, Gaboury L & St-Pierre Y (2009) La galectine-7 : un marqueur d'intérêt dans le cancer du sein humain. *Congrès Armand-Frappier*. Château Bromont, Bromont, Qc, Canada.

Grosset AA, Gaboury L & St-Pierre Y (2009) La galectine-7 exprimée dans les cancers du sein humains de haut grade. *Congrès de l'Acfas*. Université d'Ottawa, Ottawa, ON, Canada.

Grosset AA, Gaboury L & St-Pierre Y (2009) La galectine-7 : un marqueur d'intérêt dans le cancer du sein humain. *Congrès annuel des étudiants, stagiaires et résidents du Centre de recherche du CHUM*. Hôpital Notre-Dame, Montréal, Qc, Canada.

***Récipiendaire d'un prix pour la présentation**

Grosset AA, Gaboury L & St-Pierre Y (2008) Galectin-7 is expressed in high-grade human breast cancers. *Journée de la recherche de l'IRIC*. Université de Montréal, Montréal, Qc, Canada.

Grosset AA, Gaboury L & St-Pierre Y (2008) La galectine-7 exprimée dans les cancers du sein humains de haut grade. *Journée scientifique du Département de pathologie et biologie cellulaire*. Université de Montréal, Montréal, Qc, Canada.

Grosset AA, Gaboury L & St-Pierre Y (2008) Galectin-7 is expressed in high-grade human breast cancers. *Congrès de l'Académie Internationale de Pathologie*. Centre international de conférences Megaron, Athènes, Grèce.

Campion C, **Grosset AA** & St-Pierre Y (2008) Inhibition of human galectin-7 expression by GATA-3 in tumors cells. *Congrès Cancer and Inflammation, AACR*. JW Marriott Ihilani Resort and Spa Ko Olina, Oahu, Hawaii, États-Unis.

Campion C, **Grosset AA**, Gaboury L & St-Pierre Y (2008) Implication du facteur GATA-3 dans l'inhibition de l'expression de la galectine-7 humaine dans le cancer. *Congrès Signalisation Québec*. Centre de Recherche en cancérologie de l'Université Laval, Hôtel-Dieu de Québec, Québec, Qc, Canada.

Demers M, Biron-Pain K, **Grosset AA**, Hinsinger J, Gaboury L & St-Pierre Y (2007) Galectin-7 in breast cancer. *Special AACR Conference on Advances in Breast Cancer research*. San Diego, Californie, États-Unis.

RÉSUMÉ

La résistance à l'apoptose par les agents chimiothérapeutiques est un obstacle majeur dans le traitement des formes agressives du cancer du sein. Récemment caractérisée dans la glande mammaire, l'expression de la galectine-7 est exclusive aux sous-types de carcinomes mammaires associés à un mauvais pronostic. De plus, l'injection de cellules du cancer du sein qui surexpriment la galectine-7 augmente les métastases osseuses et pulmonaires, tout en diminuant le taux de survie des souris. Le mécanisme moléculaire par lequel la galectine-7 augmente la dissémination du cancer du sein reste toutefois inconnu. Bien que les galectines soient très bien connues pour leur rôle dans la liaison des récepteurs de la membrane cellulaire, plusieurs études démontrent que les galectines intracellulaires exercent d'importantes fonctions dans les cellules cancéreuses. Cependant, quelles que soient leur localisation, la capacité des galectines à moduler les voies apoptotiques semble au cœur même de leurs fonctions pro-tumorales.

Le premier objectif de notre travail vise à étudier la distribution intracellulaire de la galectine-7 et caractériser sa fonction anti-apoptotique dans les cellules du cancer du sein. Le deuxième objectif comporte l'analyse de la signature des galectines dans les différents sous-types du cancer du sein. Il est d'autant plus important que les membres de la famille des galectines, de par leur structure à la fois similaire globalement et distincte en régions précises, peuvent être compensatoires ou antagonistes.

Pour ce faire, nous avons construit une série de mutants ponctuels de la galectine-7 et porté une attention particulière au mutant R74S. Ce mutant s'exprime de façon préférentielle dans le cytosol des cellules du cancer du sein. Contrairement à la forme normale de la galectine-7, ce mutant est incapable de se déplacer à la mitochondrie ou dans le noyau. Nos résultats démontrent que la mutation n'altère pas la fonction anti-apoptotique de la galectine-7 dans les cellules du cancer du sein traitées avec la doxorubicine, le chlorure de cobalt ou l'étoposide. De façon surprenante, la galectine-7 normale et mutée diminuent la translocation de p53 au noyau et l'expression de p21, un gène cible de p53, suite au traitement à la doxorubicine. L'utilisation d'un inhibiteur du protéasome suggère que la galectine-7 contrôle la dégradation protéasomale de p53, possiblement via une interaction directe avec p53. Par la suite, nous avons évalué l'expression en ARNm et en protéine des différents membres de la famille des galectines, dans le cancer du sein. Les études *in silico* indiquent que *Igals1* et *Igals3* sont associés à un mauvais pronostic pour les sous-types les plus agressifs. De par la construction de micromatrices tissulaires, comprenant 213 tumeurs de patientes différentes, nous avons déterminé que l'expression stromale des galectines 1, 3 et 9 est exclusive aux sous-types HER-2 positif et triple-négatif. Lorsqu'épithéliales, les galectines 1, 3, 8 et 9 sont restreintes

au cytosol ou retrouvées dans le cytosol et le noyau. Cette localisation est d'autant plus importante que la galectine-1 nucléaire est associée à un faible taux de survie, à l'inverse de la galectine-8 nucléaire qui est associé à un bon pronostic. La nécessité d'analyser les différents membres des galectines est confirmée par l'observation de la survie de 5 ans sans maladie et sans métastase de 100% des patientes atteintes d'un cancer triple-négatif, positif pour les galectines 1 et 8 nucléaires, ce qui indique une dominance du phénotype de la galectine-8.

Ces résultats mettent en évidence l'existence d'un nouveau mécanisme par lequel la galectine-7 module la survie des cellules de cancer du sein et suggèrent que la galectine-7 cytosolique pourrait être une cible potentielle afin d'améliorer l'efficacité des agents chimiothérapeutiques pour le traitement des sous-types agressifs du cancer du sein. De plus, nos données cliniques suggèrent que les galectines ont une utilité clinique comme indicateurs de la progression de la maladie dans le cancer du sein.

Mots clés: cancer du sein, triple-négatif, galectines, galectine-7, apoptose, p53, micromatrice tissulaire, immunohistochimie, localisation, stroma

ABSTRACT

Resistance to apoptosis induced by chemotherapeutic agents is a major obstacle in the treatment of aggressive forms of breast cancer. Recently characterized in the mammary gland, the expression of galectin-7 is exclusive to subtypes of breast carcinomas associated with a poor prognosis. In addition, injection of breast cancer cells that overexpress galectin-7 increases bone and lung metastasis, while decreasing the mouse survival. The molecular mechanism by which galectin-7 increases the spread of breast cancer remains unknown. Although galectins are well known for their role in the binding of receptors on the cell membrane, several studies show that intracellular galectins have important functions in cancer cells. However, whatever their location, the ability of galectins to modulate apoptotic pathways seems at the heart of their pro-tumoral functions.

The first objective of our work is to study the intracellular distribution of galectin-7 and characterize its anti-apoptotic function in breast cancer cells. The second goal involves the analysis of galectin signature in different subtypes of breast cancer. This is of significant importance since galectin can have either agonize or antagonize each other since they have a similar overall structure but also different specific regions.

To address our goals, we generated a series of point mutants of galectin-7 and paid particular attention to the mutant R74S. This mutant is expressed preferentially in the cytosol of breast cancer cells. Unlike the normal form of galectin-7, this mutant is unable to traffic into the mitochondria or the nucleus. Our results demonstrate that the mutation does not alter the anti-apoptotic function of galectin-7 in breast cancer cells treated with doxorubicin, cobalt chloride or etoposide. Surprisingly, wild type galectin-7 and mutated galectin-7 both decrease p53 translocation to the nucleus and expression of p21, a p53 target gene, after treatment of doxorubicin. The use of a proteasome inhibitor suggests that galectin-7 controls the proteasomal degradation of p53, possibly through direct interaction with p53. Subsequently, we evaluated the expression of mRNA and protein of different members of the family of galectins in breast cancer. The *in silico* studies indicate that *Igals1* and *Igals3* are associated with a poor prognosis for the more aggressive subtypes. In tissue microarrays, including 213 tumors from different patients, we determined that expression of stromal galectins 1, 3 and 9 is exclusive to HER-2 positive and triple-negative subtypes. In epithelial cells, galectins 1, 3, 8 and 9 are restricted to the cytosol or found in the cytosol and the nucleus. This localization is particularly important since nuclear galectin-1 is associated with a low survival rate, in contrast to nuclear galectin-8 which is associated with a good prognosis. The need to analyze the different members of galectins, as an entity, is confirmed by the observation that patients with triple-negative cancer, positive for nuclear galectins 1 and 8 have a 100% 5-year survival

without disease and without metastasis, indicating a preferential dominance of the galectin-8 phenotype.

These results demonstrate the existence of a novel mechanism by which galectin-7 modulates the survival of breast cancer cells and suggest that cytosolic galectin-7 could be a potential target to improve chemotherapy efficiency for the treatment of aggressive breast cancer subtypes. In addition, our clinical data demonstrate that galectins have clinical utility as indicators of disease progression in breast cancer.

Key words: breast cancer, triple-negative, galectins, galectin-7, apoptosis, p53, tissue microarray, immunohistochemistry, localization, stroma

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
LISTE DES RÉALISATIONS SCIENTIFIQUES	IV
RÉSUMÉ.....	X
ABSTRACT	XII
TABLE DES MATIÈRES	XIV
LISTE DES FIGURES	XVI
LISTE DES TABLEAUX	XIX
LISTE DES ANNEXES.....	XX
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XXI
CHAPITRE 1 - INTRODUCTION.....	1
1. LE CANCER DU SEIN	2
1.1 LA GLANDE MAMMAIRE	4
1.2 CAUSES ET MECANISMES.....	8
1.3 L'IDENTIFICATION DES SOUS-TYPES MOLECULAIRES	10
1.3.1 <i>Luminal A</i>	13
1.3.2 <i>Luminal B</i>	14
1.3.3 <i>HER-2</i>	15
1.3.4 <i>Phénotype basal</i>	16
1.3.5 <i>Faible en claudines</i>	19
1.4 LES TRAITEMENTS.....	20
1.5 LES BIOMARQUEURS	22
2. LES GALECTINES.....	23
2.1 CLASSIFICATION ET STRUCTURE	24
2.2 EXPRESSION TISSULAIRE ET CELLULAIRE	26
2.3 FONCTIONS	28
2.3.1 <i>Fonctions extracellulaires</i>	29

2.3.2	<i>Fonctions intracellulaires</i>	31
2.4	PATHOLOGIES RELIEES AUX GALECTINES	32
2.5	LEURS ROLES DANS LE CANCER	36
2.5.1	<i>Transformation cellulaire</i>	37
2.5.2	<i>Régulation du cycle cellulaire</i>	38
2.5.3	<i>Processus apoptotique</i>	39
2.5.4	<i>Adhésion cellulaire et matricielle</i>	40
2.5.5	<i>Angiogenèse tumorale</i>	41
2.5.6	<i>Évasion du système immunitaire</i>	42
2.6	LEUR ROLE COMME BIOMARQUEURS	43
2.7	LEUR POTENTIEL THERAPEUTIQUE	45
3.	LA GALECTINE-7.....	47
3.1	DECOUVERTE	47
3.2	STRUCTURE	47
3.3	FONCTIONS	50
3.4	MECANISMES MOLECULAIRES QUI REGULENT SON EXPRESSION	51
3.5	SES LIGANDS	52
3.6	EXPRESSION ET FONCTIONS DANS LES DIFFERENTS CANCERS	54
3.6.1	<i>Rôle anti-tumoral</i>	54
3.6.2	<i>Rôle pro-tumoral</i>	57
3.7	LA GALECTINE-7 DANS LE CANCER DU SEIN	59
	HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DU PROJET DE THESE	61
	CHAPITRE 2 - ARTICLE 1	62
	CHAPITRE 3 - ARTICLE 2.....	93
	CHAPITRE 4 - DISCUSSION.....	134
	CHAPITRE 5 – CONCLUSION GENERALE	153
	RÉFÉRENCES.....	157
	ANNEXES.....	I

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Statistiques sur l'incidence et la mortalité du cancer du sein, au Canada.....	2
Figure 1.2	Développement et progression du cancer du sein.....	3
Figure 1.3	Grade SBR-EE	4
Figure 1.4	Structure de la glande mammaire.....	5
Figure 1.5	Coupe histologique de la glande mammaire normale.....	6
Figure 1.6	Hiérarchie des cellules de la glande mammaire.....	7
Figure 1.7	Causes du cancer du sein.....	9
Figure 1.8	Signature du cancer.....	10
Figure 1.9	Classification des sous-types d'expression génique du cancer du sein.....	12
Figure 1.10	Marquage nucléaire d'ER et PR d'un carcinome mammaire luminal A.....	13
Figure 1.11	Marquage membranaire de la protéine HER-2 d'un carcinome mammaire HER-2+.....	15
Figure 1.12	Marquage membranaire et cytoplasmique des CK5/6 et d'EGFR d'un carcinome mammaire de phénotype basal.....	17
Figure 1.13	Marquage membranaire et cytoplasmique de la vimentine et des CK5/19 d'un carcinome mammaire faible en claudines.....	20
Figure 1.14	Classification des galectines.....	25
Figure 1.15	Structure conservée des galectines.....	25
Figure 1.16	Liaison des galectines dans le compartiment extracellulaire.....	30
Figure 1.17	Fonctions associées aux galectines dans la progression du cancer.....	36
Figure 1.18	Structure de la galectine-7.....	48
Figure 1.19	Spectre ¹⁵ N- ¹ H HSQC de la galectine-7.....	49
Figure 1.20	Régulation de l'expression du gène <i>galectine-7</i> dans le cancer du sein.....	52
Figure 1.21	Schématisation de l'interaction entre la galectine-7 et ses ligands, ainsi que ses fonctions.....	54
Figure 2.1	Expression of gal-7 in human mammary cancer tissues and cell lines.....	80
Figure 2.2	Structural analysis of wild-type gal-7 and the R74S mutant.....	81

Figure 2.3	Subcellular distribution of gal-7 in MCF-7 cells.....	82
Figure 2.4	Subcellular distribution of the R74S mutant.....	83
Figure 2.5	Anti-apoptotic function of gal-7 is not altered by R74S mutation.....	84
Figure 2.6	Gal-7 and its R74S variant suppress PARP-1 cleavage, p53 expression and p21 transcription induced by doxorubicin.....	85
Figure 2.7	Decreased of p53 nuclear translocation through proteasomal degradation induced by cytoplasmic gal-7.....	86
Figure S2.1	Isothermal calorimetric titration of gal-7 with lactose.....	88
Figure S2.2	Binding of recombinant wtgal-7 and R74S to Jurkat T cells.....	89
Figure S2.3	Clusters of gal-7 in MCF-7 cells observed by electron microscopy.....	90
Figure S2.4	Interaction of endogenous gal-7 with p53 in MCF10A cells.....	91
Figure S2.5	Cellular proliferation of MCF-7 is not significantly affected by gal-7 and R74S variant.....	92
Figure 3.1	Gene expression map of <i>Igals1</i> in PAM50 molecular subtypes of breast cancer using bc-GenExMiner database.....	115
Figure 3.2	Prognostic role of galectin genes in HER2 breast cancer.....	116
Figure 3.3	Prognostic role of galectin genes in triple-negative breast cancer.....	117
Figure 3.4	Galectins expression in normal mammary gland and breast cancer tissues.....	118
Figure 3.5	Prognostic potential of galectin in across molecular subtypes of breast cancer.....	119
Figure 3.6	Subcellular localization of galectins in breast cancer tissues.....	120
Figure 3.7	Prognostic potential of nuclear galectin-8 in TNBC.....	121
Figure 3.8	Prognostic potential of nuclear galectin-1 and -8.....	122
Figure 3.9	Stromal expression of galectins.....	123
Figure 3.10	Correlation between galectin-1, -3 and -9 expression in breast cancer tissues.....	124
Figure 3.11	Schematic diagram highlighting galectin expression patterns in breast cancer tissues.....	125
Figure S3.1	<i>In silico</i> analysis of galectins mRNA expression of human breast cancer (bc-GenExMiner).....	129

Figure S3.2	Effect of <i>galectin</i> gene expression on disease-free survival (DFS) of patients with breast cancer, independently of the LN status and across the molecular subtypes.....	130
Figure S3.3	Representative IHC staining showing positive controls of galectins expression in normal tissues.....	131
Figure S3.4	Prognostic potential of galectin in across molecular subtypes of breast cancer.....	132
Figure S3.5	Prognostic potential of <i>galectin-12</i> , <i>-13</i> and <i>-14</i> genes in breast cancer.....	133
Figure 4.1	Localisation mitochondriale de protéines glycosylées et de la galectine-7.....	140
Figure 4.2	Micromatrices tissulaires.....	147
Figure 5.1	Modèle du mécanisme moléculaire anti-apoptotique de la galectine-7 dans les cellules du cancer du sein.....	154
Figure 5.2	Schématisation de l'étude sur les signatures de galectines dans le cancer du sein.....	155

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Classification des sous-types moléculaires du cancer du sein selon l'expression de marqueurs tissulaires spécifiques.....	12
Tableau 3.1 High mRNA expression as a poor prognostic factor for DFS using the pam50 classifier.....	110
Tableau 3.2 High mRNA expression as a good prognostic factor for DFS using the pam50 classifier.....	110
Tableau 3.3 Galectins distribution, cellular localization and intensity in normal mammary gland.....	110
Tableau 3.4 Histoclinical correlations of breast cancers according to galectins expression in cancer cells.....	111
Tableau 3.5 Histoclinical correlations of breast cancers according to galectins localization in cancer cells.....	112
Tableau 3.6 Histoclinical correlations of breast cancers according to galectins expression in cancer-associated stroma.....	113
Tableau 3.7 Histoclinical correlations of breast cancers according to galectins expression in cancer-associated stroma.....	114
Tableau S3.1 Antibodies validation.....	127
Tableau S3.2 Histoclinical correlations of triple-negative breast cancers according to galectins expression in cancer cells.....	128

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE I	Un rôle distinct pour la galectine-7 dans le cancer?.....	ii
ANNEXE II	La surexpression de la galectine-7, un marqueur de cellules myoépithéliales, augmente les métastases spontanées des cellules du cancer du sein.....	xvi
ANNEXE III	Génération de mutants de la galectine-7.....	xxvi
ANNEXE IV	Interaction de la galectine-7 avec les protéines de la famille Bcl-2.....	xxviii
ANNEXE V	Mutation G70A (WG/AR) de la galectine-7.....	xxxi
ANNEXE VI	L'expression de la galectine-7 potentialise le phénotype HER-2 positif dans le cancer du sein.....	xxxiii

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ANT	translocase du nucléotide adénine
APS	antigène prostatique spécifique
ATP	adénosine triphosphate
ADP	adénosine diphosphate
CA 125	antigène tumoral 125
CA 15-3	antigène tumoral 15-3
CDDP	cis-diamminedichloroplatinum
C/EBP β -2	<i>CCAAT/Enhancer-Binding Protein Beta 2 Isoform</i>
CK	cytokératines
CRD	<i>carbohydrate recognition domain</i> (domaine de reconnaissance des glucides)
CSC	cellule souche cancéreuse
DAMP	motif moléculaire associé aux dommages
DMBA	7-12-dimethylbenz[a]anthracene
Dox	doxorubicine
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i> (récepteur du facteur de croissance épidermique)
EM	<i>electron microscopy</i> (microscopie électronique)
ER	<i>estrogen receptors</i> (récepteur des œstrogènes)
ErbB2	<i>avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2</i> (homologue 2 de l'oncogène viral de la leucémie érythroblastique aviaire)
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
FISH	<i>fluorescence in situ hybridization</i> (hybridation <i>in situ</i> en fluorescence)
gal	galectine
HES	hématoxyline-éosine-safran
HER-2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i> (récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain)

HER-2+	HER-2 positif
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i> (facteur de croissance hépatocytaire)
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
ITC	titration calorimétrique isotherme
JNK	c-jun NH ₂ -terminal kinase
kDa	kilodaltons
KO	<i>knock-out</i> (retiré)
LTR	<i>long terminal repeats</i> (répétitions terminales longues)
MaSCs	<i>mammary stem cells</i> (cellules souches mammaires)
MCP	<i>modified citrus pectin</i> (pectine d'agrume modifiée)
MLS	signal de localisation mitochondrial
MMP	métalloprotéase de la matrice
MMTV	<i>mouse mammary tumor virus</i> (virus tumoral murin mammaire)
MNU	1-methyl-nitrosourea
NDUFS3	protéine NADH déhydrogénase [ubiquinone] fer-sulfuré 3
NLS	signal de localisation nucléaire
OSCC	carcinome épidermoïde de la bouche
OSCP	protéine sensibilité-conférée à l'oligomycine
PAMP	motifs moléculaires associés aux pathogènes
PARP	poly(ADP-ribose) polymérase
PDH E1 α	pyruvate déhydrogénase E1 α
PI3K-Akt	phosphoinositide 3-kinase-Akt
PIG1	<i>p53-induced gene 1</i> (gène 1 induit par p53)
PIGs	<i>p53-induced genes</i> (gènes induient par p53)
PR	<i>progesterone receptors</i> (récepteur de la progestérone)
RMN	résonance magnétique nucléaire
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (dérivés réactifs de l'oxygène)
SAI	sans autre indication

SBR-EE	Scarff-Bloom-Richardson et Elston-Ellis
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i> (immunodéficience sévère combinée)
SERMs	<i>selective estrogen receptor modulators</i> (modulateurs du récepteur des œstrogènes sélectifs)
siRNA	petits ARN interférents
SMA	<i>smooth muscle actin</i> (actine du muscle lisse)
TGF β	<i>transforming growth factor β</i> (facteur de croissance transformant β)
TICs	<i>tumor-initiating cells</i> (cellules initiateuses de tumeur)
TN	Triple-négatif
TNBC	<i>Triple-negative breast cancer</i> (cancer du sein triple-négatif)
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire)
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
wtgal-7	<i>wild-type galectin-7</i> (galectine-7 de type sauvage)

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1. LE CANCER DU SEIN

Au Canada, le cancer le plus fréquent chez la femme est le cancer du sein. Il est également le second plus meurtrier, après le cancer du poumon. Selon les statistiques du comité consultatif de la Société canadienne du cancer, une femme sur neuf aura un diagnostic de cancer du sein. De plus, la probabilité d'en mourir est d'une femme sur 30 (Figure 1.1) (Canadian Cancer Society's Advisory Committee on Cancer Statistics, 2014). L'incidence et la mortalité de cette maladie en font un sujet de recherche important pour améliorer les chances de survie des Canadiennes.

Prévisions de l'année 2014

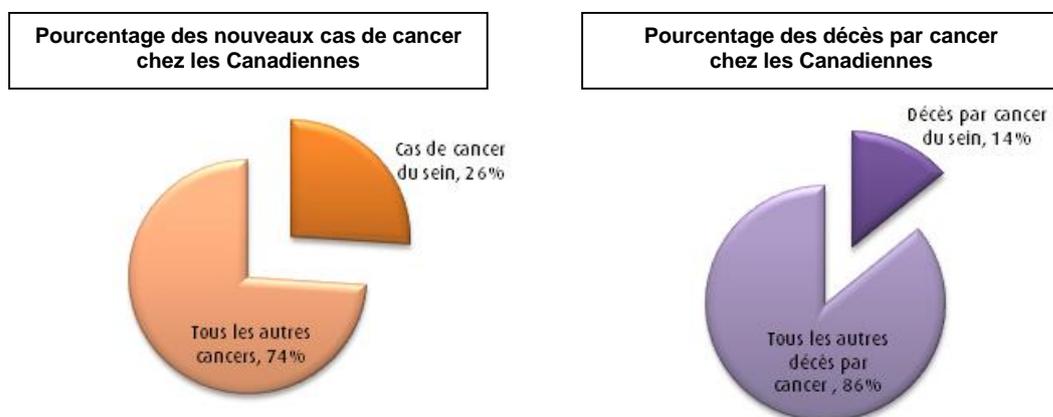


Figure 1.1 Statistiques sur l'incidence et la mortalité du cancer du sein, au Canada.
Modifié de (Société canadienne du cancer, 2015b)

L'hétérogénéité de cette maladie peut être considérée par une analyse histologique du tissu mammaire au microscope. Les pathologistes, médecins spécialistes de l'analyse de spécimens biologiques, en sont les principaux responsables par l'application de critères bien établis (College of American Pathologists, 2013). Une masse dans le sein, généralement détectée lors d'une mammographie, est échantillonnée lors d'une biopsie. C'est le premier spécimen que le pathologiste devra observer pour, dans un premier temps, déterminer le diagnostic, puis évaluer si la chirurgie s'impose. Dans ce cas, une mastectomie, partielle ou totale, sera effectuée, puis acheminée aux spécialistes de la pathologie, en vue d'un diagnostic et d'un choix de traitement. Les principaux critères à évaluer pour un cancer du sein sont: type histologique, grade, taille, statut des récepteurs hormonaux, statut HER-2 et métastases ganglionnaires.

Le cancer du sein est généralement classé selon le type histologique. La majorité de ces adénocarcinomes sont de type canalaire SAI (sans autre indication). Le second type

histologique le plus fréquent est le lobulaire. Les cancers mammaires canaux et lobulaires proviennent de la même région anatomique: les unités canales lobulaires terminales. Les autres types histologiques, par ordre d'incidence, sont: tubulaire, mucineux, médullaire, papillaire et métaplasique (Robbins *et al.*, 2005).

Le potentiel métastatique du carcinome mammaire peut également être évalué au microscope. La première caractéristique est le confinement des cellules tumorales, ce qu'on appelle l'intracanaux ou plus communément le *in situ*. Tel qu'illustré dans la figure 1.2, le carcinome *in situ* est limité par la membrane basale (flèche) de canaux ou encore de lobules, ce qui empêche la migration des cellules transformées vers les vaisseaux sanguins et lymphatiques. Le confinement des cellules cancéreuses empêche la formation de métastases, sauf si cette lésion progresse vers un cancer infiltrant (S. A. Kaufman *et al.*, 2015b). L'apparition d'un carcinome infiltrant, aussi nommé envahissant, implique que les cellules tumorales ont la capacité d'envahir le stroma, de migrer vers le système vasculaire et d'essaimer à distance. Évidemment, cela implique le bris de la membrane basale (Figure 1.2). Les sites métastatiques les plus communs du cancer du sein sont les ganglions lymphatiques, les os, les poumons, le foie et le cerveau (Chikarmane *et al.*, 2015). La figure 1.2 donne un aperçu de l'évolution probable d'un cancer du sein de la structure glandulaire normale jusqu'aux métastases.

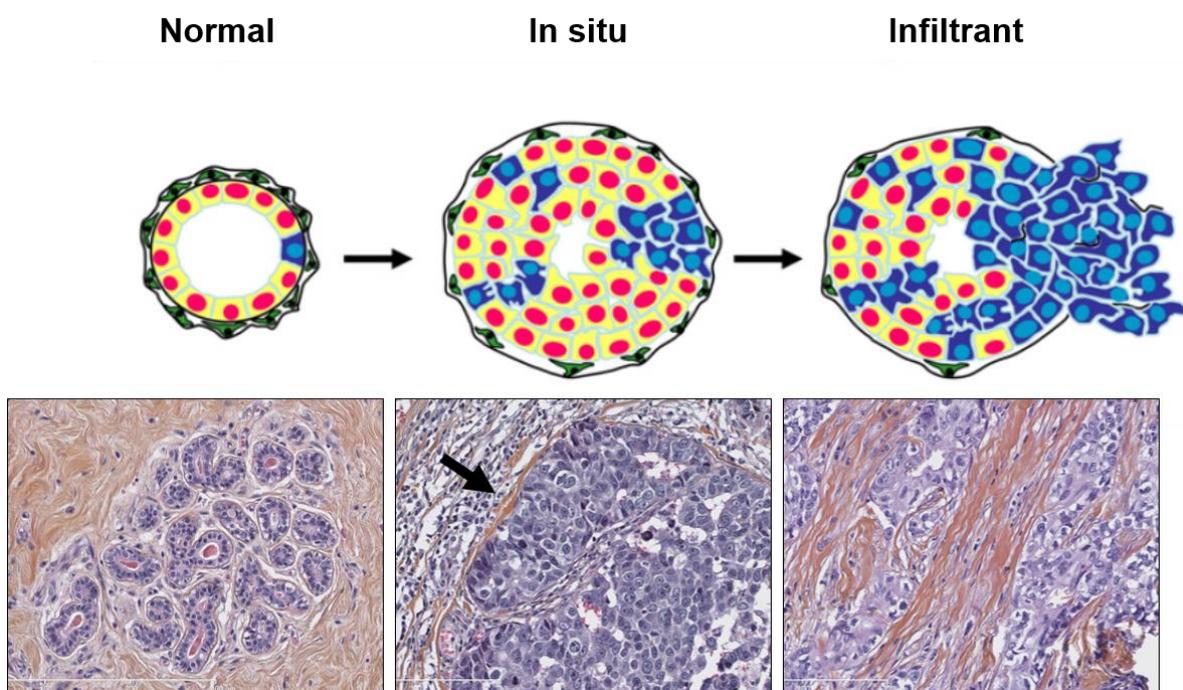


Figure 1.2 Développement et progression du cancer du sein. Schématisation (haut) et coupes histologiques (bas) de l'évolution probable d'une structure glandulaire normale vers un carcinome mammaire *in situ*, puis bris de la membrane basale par un carcinome mammaire infiltrant. Barre de mesure: 300 μ m. Inspiré de (Kouros-Mehr *et al.*, 2008)

Le grade SBR-EE (Scarff-Bloom-Richardson et Elston-Ellis) permet également d'évaluer le potentiel métastatique (Elston *et al.*, 1991). C'est la seconde caractéristique considérée dans le diagnostic de la maladie. Un carcinome mammaire de bas grade présente les caractéristiques de la structure du sein normal: structures tubulaires, petits noyaux uniformes et peu de mitoses (Figure 1.3). Le cancer du sein de bas grade est bien différencié, ce qui ralentit son évolution et il ne forme que rarement des métastases. À l'inverse, un carcinome de haut grade est peu différencié: perte de structures tubulaires, gros noyaux polymorphes et activité mitotique élevée (Figure 1.3). Le risque de métastases est augmenté en présence d'un carcinome mammaire de haut grade puisque son évolution est accélérée par l'indifférenciation des cellules.

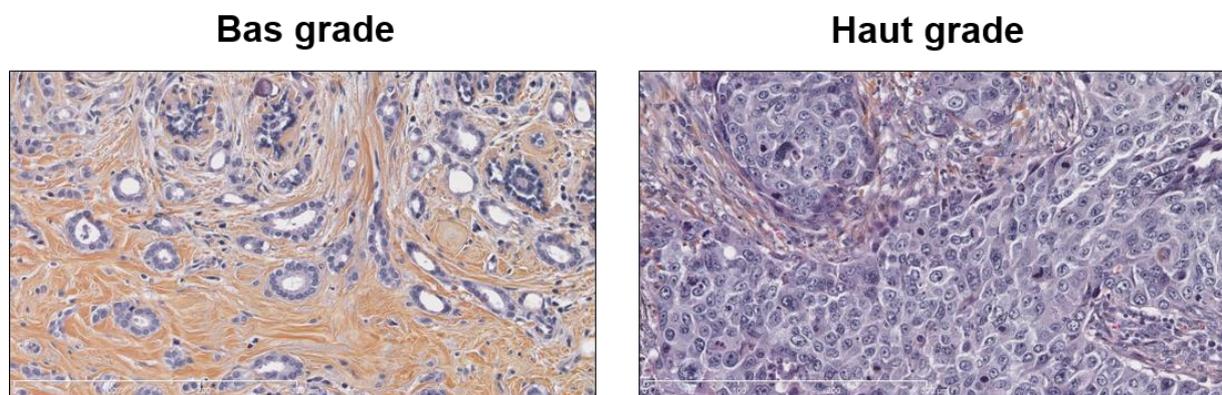


Figure 1.3 Grade SBR-EE. Coupes histologiques d'un carcinome mammaire de bas grade (gauche) et de haut grade (droite). Barre de mesure: 300 μ m.

1.1 La glande mammaire

Le sein est un organe glandulaire composé principalement de stroma fibro-adipeux, entourant un épithélium, et est adossé sur le muscle pectoral (Figure 1.4) (Macias *et al.*, 2012). Cette glande a pour fonction de produire et sécréter le lait pour permettre au nouveau-né de se nourrir, ce qui définit les mammifères. Au cours de l'embryogenèse, il y a formation de la glande mammaire à partir de l'ectoderme, pour l'épithélium, et le mésoderme, en ce qui a trait au stroma. Le tout est orchestré par les signaux du mésenchyme. Ce réseau canalaire primitif, bien que déjà compétent quant à sa fonction de produire et sécréter du lait, reste en latence jusqu'à la puberté. La structure de l'organe change alors pour permettre l'augmentation du réseau composé principalement de canaux, tous connectés au canal principal, appelé galactophore, et qui se termine au mamelon. C'est l'augmentation des hormones provenant des ovaires (œstrogènes) et de l'hypophyse (hormone de croissance) qui permet ces changements importants. Au cours d'une grossesse, ce réseau entrera dans une phase de

prolifération intense pour permettre l'augmentation du nombre d'embranchements par canal et la formation des structures lobuloalvéolaires (Figures 1.4 et 1.5). Plus spécifiquement, ces structures terminales sont responsables de la production du lait qui sera acheminé par le réseau de canaux jusqu'au mamelon. Le tissu adipeux disparaît peu à peu pour faire place à cette organisation épithéliale et aux capillaires sanguins pour en assurer l'apport nutritionnel. Dans cette phase de la reproduction, les hormones responsables sont la progestérone et la prolactine, sécrétées par les ovaires et l'hypophyse, respectivement. La période d'allaitement, ou lactation, se définit par la stabilisation de cette structure glandulaire et bien entendu, la production et sécrétion du lait par les lobules. Le sevrage de l'enfant va induire la mort cellulaire, via l'apoptose notamment, ainsi que le remodelage important de la glande mammaire. Le retour à la structure canalaire rudimentaire se fait principalement par la présence importante de protéases, en plus de la réapparition des adipocytes. Cette étape, nommée involution, est également retrouvée chez les femmes post-ménopausées. Par contre, cette involution lobulaire qui est causée par la vieillesse se définit principalement par le remplacement de la majorité de l'organe, autant l'épithélium que le tissu conjonctif, par du tissu graisseux. Cet événement pourrait être causé par la déplétion des cellules souches mammaires et conférer un effet protecteur par rapport au développement d'un cancer du sein.

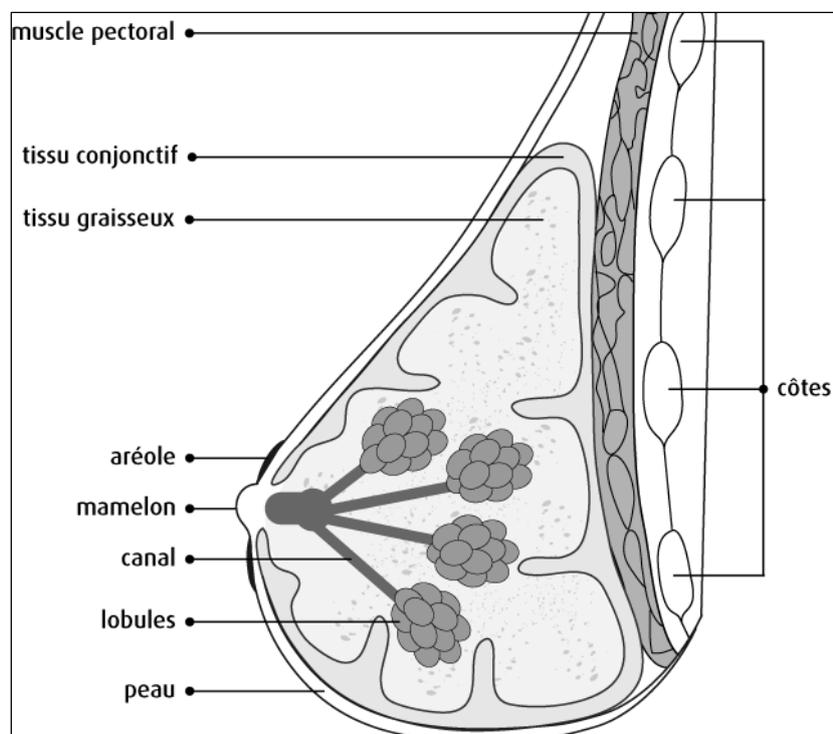


Figure 1.4 Structure de la glande mammaire. Schématisation de toutes les composantes du sein, ainsi que de la peau, le muscle pectoral et les côtes. Modifié de (Société canadienne du cancer, 2015a).

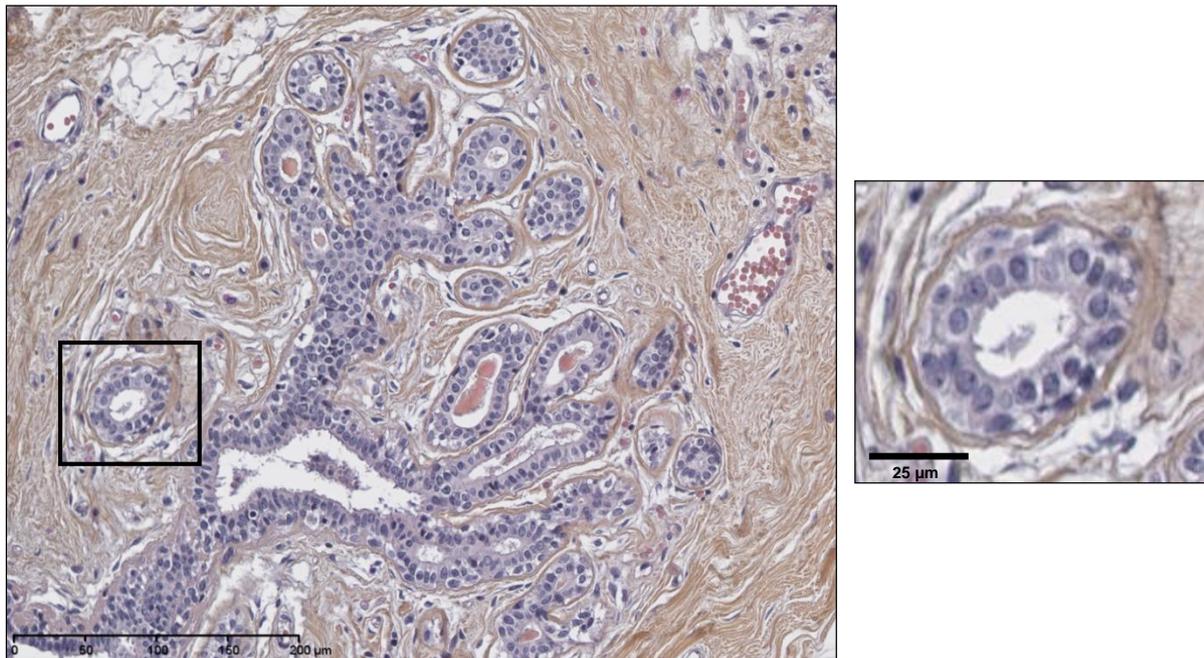


Figure 1.5 Coupe histologique de la glande mammaire normale. À gauche, une coupe histologique d'un canal qui se termine en plusieurs lobules et qui est entouré d'un stroma fibro-adipeux. Barre de mesure : 200 µm. À droite, un lobule (agrandissement de l'encadré dans l'image de gauche) composé de cellules épithéliales luminales (couche interne) et de cellules épithéliales basales (couche externe). Les cellules progénitrices et souches peuvent se retrouver également dans la couche externe. Barre de mesure: 25 µm.

L'épithélium mammaire, la partie fonctionnelle du sein, se définit par une hiérarchie de cellules qui permettent la production et l'expulsion du lait maternel (Figure 1.6). Cet arbre hiérarchique se termine par les cellules matures, plus communément nommées différenciées. Ces cellules mammaires forment une double couche de cellules épithéliales. La couche interne, c'est-à-dire qui touche la lumière des canaux et lobules, est composée de cellules épithéliales luminales. L'expression de différents marqueurs les caractérise: récepteurs hormonaux ER (récepteur des oestrogènes) et PR (récepteur de la progestérone), ainsi que les cytokératines (CK) luminales, telles que CK8 et CK18 (Oakes *et al.*, 2014). Elles ont pour fonction de produire le lait en période de lactation (Macias *et al.*, 2012). Pour que ce lait soit sécrété à l'intérieur de la lumière du réseau glandulaire, une deuxième couche de cellules épithéliales est nécessaire. Ces cellules dites myoépithéliales sont de forme allongée et de par l'expression de protéines spécifiques, telles que l'actine du muscle lisse (SMA), elles ont la capacité de se contracter. Ces contractions permettent l'expulsion du lait présent dans les cellules épithéliales luminales, ainsi que son acheminement des lobules aux canaux, puis dans le canal galactophore vers le mamelon. Les cellules myoépithéliales, également appelées cellules épithéliales basales, peuvent être identifiées non seulement par la présence de

protéines contractiles, mais aussi par les cytokératines basales, telles que CK5, CK6, CK14 et CK17 (Dewar *et al.*, 2011).

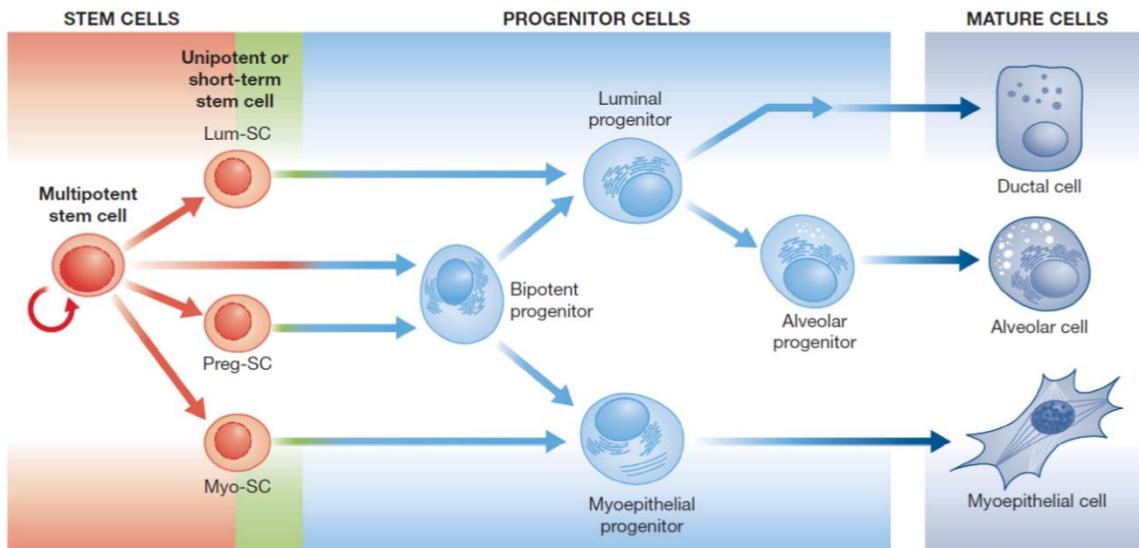


Figure 1.6 Hiérarchie des cellules de la glande mammaire. Arbre hiérarchique construit à partir des études qui démontrent la présence, dans la glande mammaire, de cellules souches multipotentes, unipotentes et à court-terme. Leurs cellules filles sont des cellules progénitrices luminales, myoépithéliales et bipotentes. La différenciation de ces cellules permettra de produire les canaux et lobules contenant la double couche de cellules épithéliales luminales et basales. Modifié de (Visvader *et al.*, 2011)

Les cellules différenciées sont le résultat de la division des cellules progénitrices (Figure 1.6). L'équipe de Geoffrey J. Lindeman a mis en évidence la présence de cellules progénitrices luminales et myoépithéliales, chez l'humain (Lim *et al.*, 2009). Ces cellules se caractérisent par une division cellulaire très active et se distinguent par l'expression de marqueurs spécifiques. Les cellules progénitrices luminales, avec les marqueurs de surface cellulaire $CD49^{+}EpCAM^{+}$, expriment les CK8/18 et CK5/6, en plus de pouvoir se différencier en cellules productrices de lait, en présence d'un stimulus lactogénique (37,5% de la population). Quant aux cellules progénitrices myoépithéliales, possédant les marqueurs membranaires $CD49^{hi}EpCAM^{-}$, elles expriment p63, CK5/6 et CK14. Le faible pourcentage de cette population à posséder la capacité d'une différenciation alvéolaire, en plus de leur aspect très hétérogène, concrétise l'existence de cellules progénitrices bipotentes.

Finalement, les cellules souches mammaires multipotentes sont au sommet de cette hiérarchie et sont uniques quant à leur capacité d'auto-renouvellement (Visvader *et al.*, 2011). Elles sont identifiées par des marqueurs de surface, $CD29^{hi}CD49^{fhi}CD24^{+}Sca-1^{-}$, et produisent trois types de cellules filles: cellule souche luminaire unipotente, cellule souche myoépithéliale unipotente et, seulement lors d'une grossesse, une cellule souche de court-terme responsable de l'augmentation de l'épithélium mammaire (Figure 1.6). On attribue à ces

cellules souches unipotentes, ou de court-terme, des rôles essentiels dans la morphogenèse et le maintien de l'épithélium mammaire. Comparativement à ses cellules filles, la cellule souche multipotente ne serait responsable que de l'initiation de la formation de la glande mammaire, par exemple lors de la régénération tissulaire. Cette hiérarchie est d'autant plus importante lorsque l'on considère l'hypothèse de la cellule souche cancéreuse (CSC). Ce concept pour les tumeurs solides a été consolidé en 2003 par Al-Hajj et ses collègues. Leur étude a permis d'identifier les cellules tumorales mammaires $CD44^+CD24^{-/low}$ comme étant les seules à posséder la capacité d'initier de nouvelles tumeurs *in vivo* (Al-Hajj *et al.*, 2003). Les quelques CSCs d'une tumeur seraient en fait responsables de la production des cellules cancéreuses et de leur hétérogénéité du fait qu'elles s'auto-renouvellent, en plus de produire des cellules différenciées (Medema, 2013). Les récurrences locales, ainsi que les métastases, pourraient également découler de ces cellules dites réservoir. De ce fait, les traitements devraient spécifiquement cibler les CSCs pour éradiquer complètement le cancer des femmes atteintes.

1.2 Causes et mécanismes

La transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse se produit suite à l'instabilité génétique. Dans le cas où ce phénomène se produit dans la glande mammaire, plusieurs causes sont connues (Figure 1.7). Premièrement, les facteurs environnementaux jouent un rôle de plus en plus important du fait que l'espérance de vie a augmenté au cours du dernier siècle. Plus précisément pour le cancer du sein, les œstrogènes, hormones stéroïdiennes produites principalement par les ovaires, jouent un rôle crucial. L'exemple le plus frappant est la prise d'hormonothérapie lors de la ménopause qui est associée à un risque plus élevé de développer un cancer du sein, selon plusieurs études (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 1997). Globalement, tous les événements qui comportent une exposition aux œstrogènes, tels qu'une ménarche hâtive, une ménopause tardive ou encore l'absence de grossesse au cours d'une vie font partie des facteurs de risque du cancer du sein (Samavat *et al.*, 2015).

Les antécédents familiaux de cancer sont également à considérer. Bien que n'affectant que moins de 10% des femmes atteintes du cancer du sein, ils sont associés principalement à des mutations génétiques héréditaires dans trois gènes: *TP53*, *PTEN* et *BRCA* (Foulkes, 2008). Contrairement aux mutations de *PTEN* et *TP53*, qui permettent le développement de plusieurs cancers, *BRCA1* et *BRCA2* mutés sont identifiés en tant que gènes du cancer du sein et de l'ovaire. Le seul fait de présenter la mutation de ces gènes augmente de 10 à 30 fois le risque

de développer un cancer du sein. Le risque d'être atteinte d'un cancer de l'ovaire est également augmenté, plus particulièrement en présence de mutations du gène *BRCA1*. Le mécanisme qui permettrait la transformation cellulaire serait dû au fait que ces mutations empêchent la production protéique de ces réparateurs de l'ADN. Les tumeurs mammaires présentant *BRCA1* muté sont associées au sous-type de phénotype basal qui, comme décrit dans la section suivante, n'ont pas de thérapies ciblées.

Suite à la découverte d'ER et du développement de l'hormonothérapie, la seconde protéine qui a en quelque sorte révolutionné le traitement du cancer du sein est HER-2 (récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain). La thérapie ciblée anti-HER-2 a permis non seulement de traiter plus efficacement certaines patientes, mais également de découvrir une cause et certains mécanismes associés au développement d'un carcinome mammaire. Le développement d'une lignée de souris en tant que modèle du cancer du sein par l'insertion du transgène *ErbB2*, précédé d'un promoteur fort LTR (répétitions terminales longues) du MMTV (virus tumoral murin mammaire) a permis d'en étudier les effets (Ursini-Siegel *et al.*, 2007). Le seul fait d'exprimer cet oncogène induit le développement de tumeurs multifocales sept mois suivant la naissance de ces souris MMTV-ErbB2. Ce modèle *in vivo* permet d'une part d'évaluer l'activation de certaines voies de signalisation, telles que PI3K-Akt (phosphoinositide 3-kinase-Akt), et d'autre part, d'évaluer l'impact d'une autre protéine sur le cancer du sein, à l'aide d'un croisement entre ces souris et un autre modèle transgénique. C'est ce que Li et ses collègues ont voulu déterminer pour le mutant 172H de p53 (B. Li *et al.*, 1997). Leurs résultats forts intéressants sur l'apparition plus rapide des tumeurs et l'indifférenciation cellulaire démontrent bien l'importance des souris transgéniques du cancer du sein pour la recherche sur le développement et la progression de la maladie.

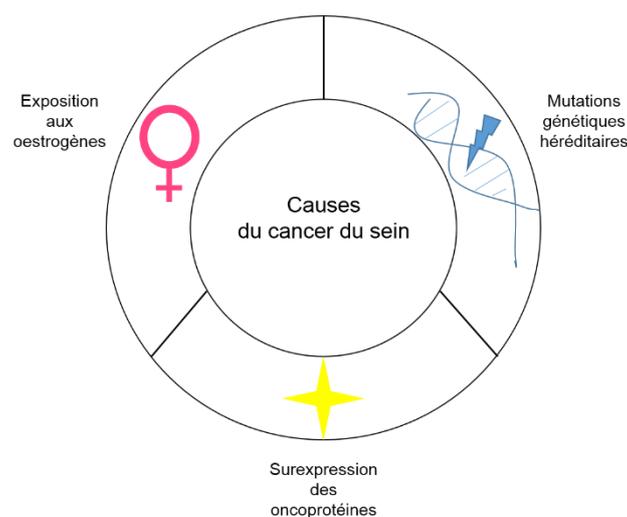


Figure 1.7 Causes du cancer du sein. Schématisation des 3 principales causes du développement du cancer du sein qui comprend des facteurs environnementaux et génétiques.

Lorsque le cancer est déjà initié, ce sont les mécanismes qui doivent être ciblés par les thérapies disponibles ou à l'essai (Figure 1.8). Ils sont définis par la signature du cancer qui se caractérise en six points principaux: capacité de réplication immortelle, induction de l'angiogenèse, résistance à la mort cellulaire, signaux prolifératifs soutenus, évasion des suppresseurs de croissance et activation de l'invasion et métastases (Hanahan *et al.*, 2000). Plus récemment, quatre autres mécanismes se sont ajoutés: dérégulation énergétique cellulaire, évasion de la destruction immunitaire, mutation et instabilité génomique et promotion tumorale de l'inflammation (Hanahan *et al.*, 2011). Ces mécanismes contribuent à une vaste hétérogénéité quant à la biologie du cancer et mettent l'emphase sur l'importance de catégoriser les tumeurs, au sein d'un même cancer, pour augmenter l'efficacité des traitements qui ciblent des mécanismes spécifiques.

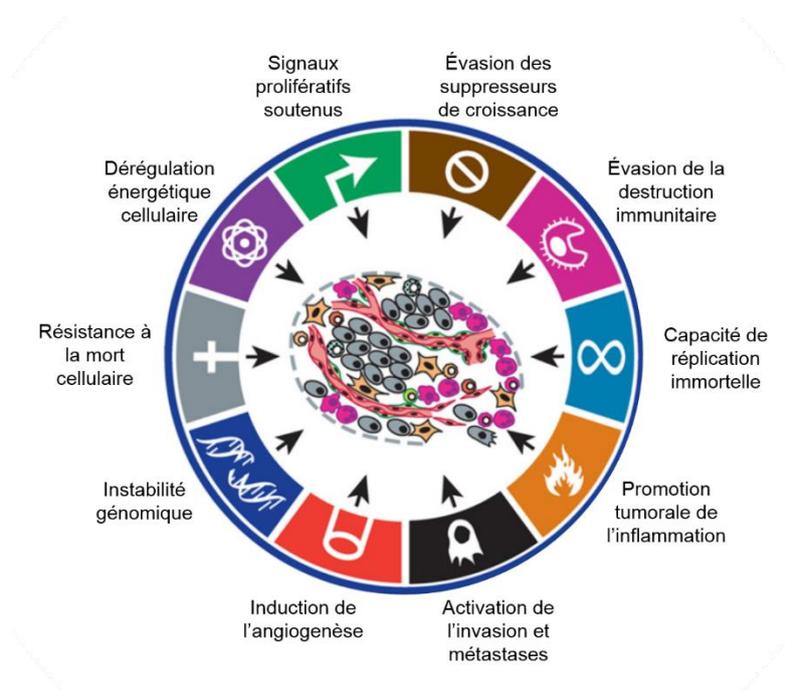


Figure 1.8 Signature du cancer. Schématisation des 10 mécanismes utilisés par les cellules cancéreuses. Modifié de (Hanahan *et al.*, 2011)

1.3 L'identification des sous-types moléculaires

Perou et ses collègues ont établi une classification selon le profil d'expression des gènes (Perou *et al.*, 2000). Le portrait moléculaire de 65 spécimens chirurgicaux de tumeurs mammaires humaines, provenant de 42 individus, a été établi à l'aide de puces à ADN permettant d'évaluer l'expression de 8 102 gènes humains. Une comparaison pré et post-chimiothérapie d'environ 20 tumeurs a également été réalisée. Les biopsies du sein ont été

analysées en tant qu'échantillons pré-chimiothérapie. De plus, l'évaluation de 17 lignées cellulaires, dans cette étude, a permis de les caractériser au même titre que les échantillons tissulaires. Un sous-groupe intrinsèque de gènes a été basé sur l'expression de 496 gènes de par leur variation significative entre les échantillons de tumeurs mammaires provenant de patientes différentes. Les échantillons pré et post-chimiothérapie d'un même individu ont été classés, pour la majorité, dans le même sous-groupe identifié d'après l'expression des gènes. Par la suite, deux groupes de tumeurs ont été établis: ER- et ER+, ce dernier comportant bon nombre de gènes exprimés par les cellules épithéliales lumorales. Le groupe ER- se compose des sous-groupes de phénotype basal, ErbB2+ et de phénotype normal. Les auteurs ont par la suite émis l'hypothèse d'une possible contamination de tissu normal sans tumeur dans l'analyse du sous-type de phénotype normal (Parker *et al.*, 2009). Pour améliorer cette nouvelle classification, ce même groupe a d'abord analysé un plus grand nombre de tumeurs, en plus d'associer un type d'expression génique aux données cliniques (Sorlie *et al.*, 2001). Les résultats associent une présence plus élevée du gène *p53* muté et un pronostic défavorable aux sous-types ErbB2+ et de phénotype basal. Ces études apportent une contribution significative à la médecine personnalisée. Voici donc une description de chaque sous-type moléculaire: luminal A, luminal B, HER-2+ et de phénotype basal. Le profil faible en claudines, plus récemment caractérisé, y sera également discuté (Figure 1.9) (Herschkowitz *et al.*, 2007).

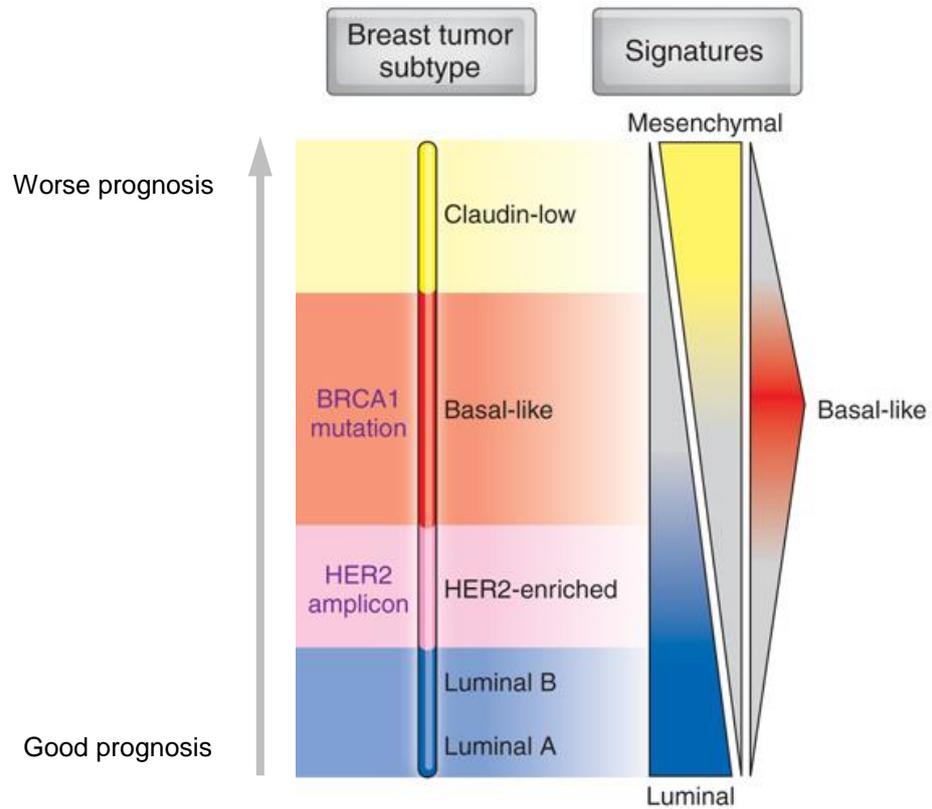


Figure 1.9 Classification des sous-types d'expression génique du cancer du sein. Association du pronostic, de mutations, d'amplifications géniques, ainsi que d'une signature spécifique à chacun des sous-types du cancer du sein. Modifié de (Prat *et al.*, 2009)

Tableau 1.1 Classification des sous-types moléculaires du cancer du sein selon l'expression de marqueurs tissulaires spécifiques

		Marqueurs tissulaires						
		ER	PR	HER-2	CK5/6	EGFR	CK5/19	VIM
Sous-types moléculaires	Luminal A	•	•					
	Luminal B	•	•	•				
	HER-2+			•				
	Phénotype basal				•	•		
	Faible en claudines						•	•

Compilation de sources diverses (Nielsen *et al.*, 2004, Perou *et al.*, 2000, Prat *et al.*, 2010, Sorlie *et al.*, 2001)

1.3.1 Luminal A

Les sous-types moléculaires du cancer du sein les plus fréquents sont ceux qui expriment les récepteurs hormonaux, plus particulièrement ER: luminal A et B (Tableau 1.1) (Ignatiadis *et al.*, 2013). Ils comprennent approximativement les deux tiers des carcinomes mammaires. La co-expression d'ER et PR est fréquente, mais non essentielle à la classification (Figure 1.10). La caractéristique principale du cancer du sein luminal A est l'expression des différents marqueurs propres aux cellules épithéliales luminales de la glande mammaire normale, tels que FOXA1, GATA-3 et les cytokératines luminales (CK8/18), d'où son appellation (Badve *et al.*, 2009).

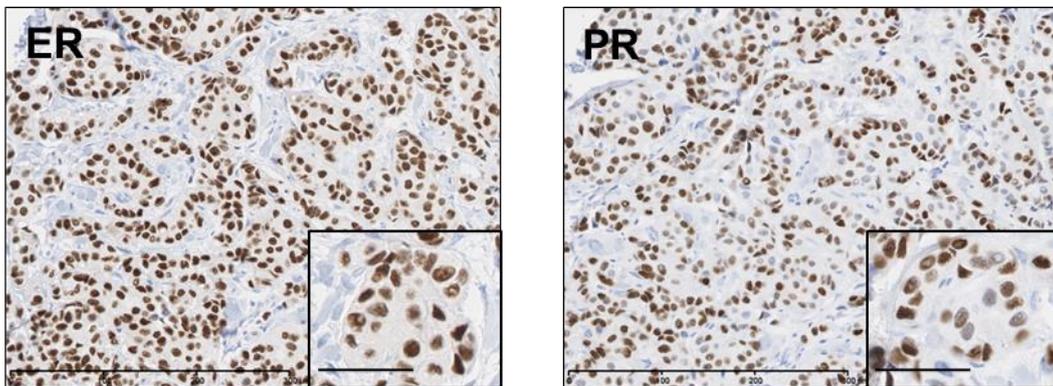


Figure 1.10 Marquage nucléaire d'ER et PR d'un carcinome mammaire luminal A. Coloration immunohistochimique, en marron, des protéines ER et PR, pour l'association de cette tumeur au sous-type luminal A. Contre-coloration en bleu (hématoxyline et bicarbonate). Barre de mesure : 300 µm et 50 µm (petit encadré à l'intérieur de l'image)

Le bon pronostic attribué à ce sous-type est dû, entre autres, à la classification de la majorité des tumeurs mammaires de bas grade dans le sous-type luminal A. Par contre, le cancer du sein luminal A est chimiorésistant, dû au faible taux prolifératif de ces tumeurs, ce qui nécessite l'utilisation d'autres thérapies pour l'éliminer. Puisque la présence d'ER est importante et est responsable de la capacité proliférative des cellules tumorales, une thérapie ciblée contre ER a été développée: l'hormonothérapie. Les modulateurs du récepteur des œstrogènes sélectifs, plus communément appelés SERMs (*selective estrogen receptor modulators*) sont parmi les thérapies les plus utilisées (Di Cosimo *et al.*, 2010). Le tamoxifène est le médicament le plus utilisé et a un effet antagoniste sur ER. Plus précisément, la liaison d'un SERM au récepteur des œstrogènes bloque le ligand naturel, ce qui empêche la transcription des gènes cibles. Dans le cas où la patiente atteinte d'un cancer du sein est post-ménopausée, le traitement de choix sera alors les inhibiteurs d'aromatase (Mauri *et al.*, 2006). L'inhibition de la synthèse des

œstrogènes par ce traitement est plus performante pour ce groupe de femmes, que ce soit en présence d'un cancer du sein à un stade précoce ou avancé. La limite de l'hormonothérapie est la résistance endocrine des tumeurs de type luminal qui est acquise au cours du traitement pour la majorité des patientes (Hayes *et al.*, 2015). Le développement de nouvelles thérapies pour ce sous-type spécifique est aussi important et plusieurs essais cliniques sont en cours. Une étude de phase III sur la combinaison entre un inhibiteur de mTOR et l'hormonothérapie a démontré l'efficacité de l'inhibition de la voie de signalisation PI3K-Akt-mTOR en augmentant la survie sans progression de la maladie de femmes atteintes d'un cancer du sein luminal A métastatique (Baselga *et al.*, 2012a).

1.3.2 Luminal B

La différence principale de ce cancer par rapport au sous-type luminal A est l'index de prolifération. Cette activité peut être mesurée à l'aide d'une protéine, Ki-67, qui est exprimée dans un nombre beaucoup plus important de cellules cancéreuses du sous-type luminal B. La seconde distinction est la présence de l'oncoprotéine HER-2, en plus d'ER (Tableau 1.1). L'un ou l'autre de ces critères sont utilisés dans les différentes études sur le cancer du sein luminal B par manque d'un consensus de la part de la communauté scientifique (Ades *et al.*, 2014). Cheang et ses collègues ont considéré ce problème d'autant plus important dans les études d'expression protéique que génique (Cheang *et al.*, 2009). L'objectif consistait à développer un essai immunohistochimique qui permet de sélectionner les cas de sous-type luminal B. Dans un premier temps, les marqueurs ER et PR ont été utilisés pour déterminer les tumeurs tout simplement dites « lumineuses ». Par la suite, deux catégories ont été établies: 1) luminal B, selon une expression nucléaire de Ki-67 dans 14% ou plus des cellules cancéreuses; 2) luminal HER-2-positif, selon l'expression de l'oncoprotéine HER-2. Ces données permettent l'association des sous-types luminal B et luminal-HER-2 positif à des paramètres cliniques défavorables: haut grade, tumeur plus volumineuse et métastases ganglionnaires. L'association de marqueurs associés à l'agressivité, tels que HER-2 et Ki-67, indique, peu importe le critère de sélection, que le pronostic des patientes atteintes d'un cancer de sous-type luminal B est plus défavorable que pour celles atteintes d'un cancer de sous-type luminal A. Par contre, l'importante chimiorésistance retrouvée dans les cancers luminal A l'est beaucoup moins dans le cas du luminal B. Bien que la surexpression d'ER mène les médecins vers l'option de l'hormonothérapie, la surexpression de HER-2 confère une résistance envers ce traitement (Di Cosimo *et al.*, 2010). Les différents essais cliniques indiquent l'importance de cibler ER et l'oncoprotéine HER-2 pour de meilleurs résultats. Des cibles thérapeutiques

spécifiques doivent être développées pour le cancer du sein luminal B. Puisque ces cellules tumorales ont une activité proliférative plus importante, différentes études se penchent sur l'inhibition de voies de signalisation associées, telles que PI3K, FGF, IGF et les CDKs (Ades *et al.*, 2014).

1.3.3 HER-2

La découverte de l'amplification du gène *ErbB2* sur le chromosome 17, ainsi que de la surexpression de l'oncoprotéine HER-2, a permis de cibler un groupe de tumeurs mammaires bien distinct (Ross *et al.*, 2004). La proportion de femmes atteintes du cancer du sein nommé « HER-2 positif » est d'environ 15-20%. Le diagnostic de la surexpression de cette protéine membranaire se fait, dans un premier temps, par immunohistochimie (Figure 1.11). Cette technique permet également de vérifier l'absence des récepteurs hormonaux (Tableau 1.1). En deuxième lieu, lorsque le marquage membranaire de l'oncoprotéine est douteux, l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) permettra de confirmer ou non la présence d'une amplification du gène *ErbB2*. Si ce test est positif, malgré le diagnostic douteux de l'immunohistochimie, la tumeur sera considérée comme étant « HER-2 positive ».

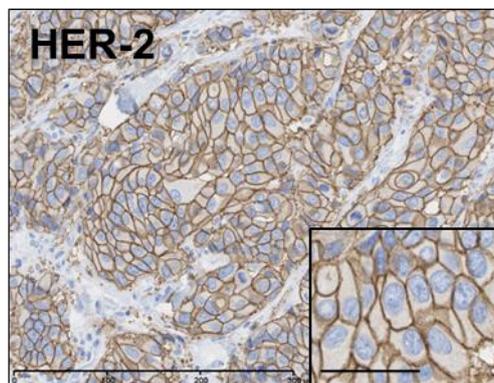


Figure 1.11 Marquage membranaire de la protéine HER-2 d'un carcinome mammaire HER-2+. Coloration immunohistochimique, en marron, de l'oncoprotéine HER-2, pour l'association de cette tumeur au sous-type HER-2+. Contre-coloration en bleu (hématoxyline et bicarbonate). Barres de mesure: 300 µm et 50 µm (petit encadré à l'intérieur de l'image)

Ce sous-type est associé aux cancers infiltrants de haut grade, plus agressifs, ainsi qu'à une diminution de la survie (Slamon *et al.*, 1987). Par contre, cette évolution clinique défavorable peut être améliorée par le Trastuzumab (Herceptin; Genentech, San Francisco, CA), une thérapie ciblée contre HER-2. Ce traitement consiste à cibler le domaine extracellulaire du

récepteur HER-2 à l'aide d'un anticorps monoclonal humanisé. En combinant la chimiothérapie et le Trastuzumab, le risque de décès est diminué (Slamon *et al.*, 2001). L'envers de la médaille est la cardiotoxicité de ce traitement. La santé cardiovasculaire des patientes doit être vérifiée préalablement pour déterminer leur éligibilité au Trastuzumab. Un autre problème au traitement par anticorps anti-HER-2 est la résistance, plus particulièrement chez les patientes présentant des métastases. Le groupe de José Baselga travaille depuis des années pour contrer l'hétérodimérisation des différents membres de la famille HER qui est responsable, en partie, de la résistance au Trastuzumab. Le Pertuzumab (Perjeta; Genentech, San Francisco, CA), un anticorps monoclonal inhibiteur de la dimérisation du récepteur HER-2, combiné au Trastuzumab et à la chimiothérapie par le docétaxel, a prolongé la survie sans progression des patientes atteintes d'un cancer métastatique HER-2 positif (Baselga *et al.*, 2012b). Ce sous-type agressif du cancer du sein, bien qu'ayant une thérapie ciblée depuis plusieurs années, doit faire partie intégrante des études sur de nouvelles avenues thérapeutiques pour permettre au plus grand nombre de femmes possible de bénéficier d'un traitement anti-cancéreux efficace.

1.3.4 Phénotype basal

L'absence d'ER, PR et HER-2 est associée à une entité nommée « triple-négatif ». Selon différentes études, de 10 à 17% des carcinomes mammaires seraient « triples-négatifs » (TN) (Badve *et al.*, 2011). La présence de différents biomarqueurs permet également de diviser cette entité en deux principales catégories: phénotype basal et faible en claudines. Le sous-type faible en claudines sera discuté dans la prochaine section.

Bien que le sous-type de phénotype basal ait été identifié par génétique, l'utilisation de la coloration immunohistochimique permet également de le définir (Tableau 1.1). Pour augmenter la spécificité et la sensibilité de l'association d'une tumeur mammaire TN au sous-type de phénotype basal, le carcinome mammaire doit être positif pour les cytokératines 5 et 6 (CK5/6) et/ou le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) (Nielsen *et al.*, 2004) (Figure 1.12). L'ajout d'autres cytokératines basales, telles que la cytokératine 14 (CK14), permet d'associer d'autres marqueurs de cellules basales à la tumeur, mais n'est pas essentielle à sa classification. L'expression de ces protéines est spécifique aux cellules myoépithéliales de la glande mammaire. Dès la découverte de ce sous-type, la présence d'autres protéines propres à cette couche épithéliale, telles que p-cadhérine et cavéoline-1, a permis d'associer l'origine de ce cancer aux cellules myoépithéliales (Rakha *et al.*, 2008). Les marqueurs qui ont posé une ambiguïté, dès l'étude de Perou et ses collègues, sont les CK5/6

qui sont également exprimées par les cellules souches et progénitrices (Perou *et al.*, 2000). Plus tard, d'autres marqueurs, tels que Sox2 et les gènes d'expression de SLUG, tous exprimés par les cellules souches, ont augmenté les évidences d'une provenance du cancer de phénotype basal des cellules indifférenciées (Rodriguez-Pinilla *et al.*, 2007, Storci *et al.*, 2008).

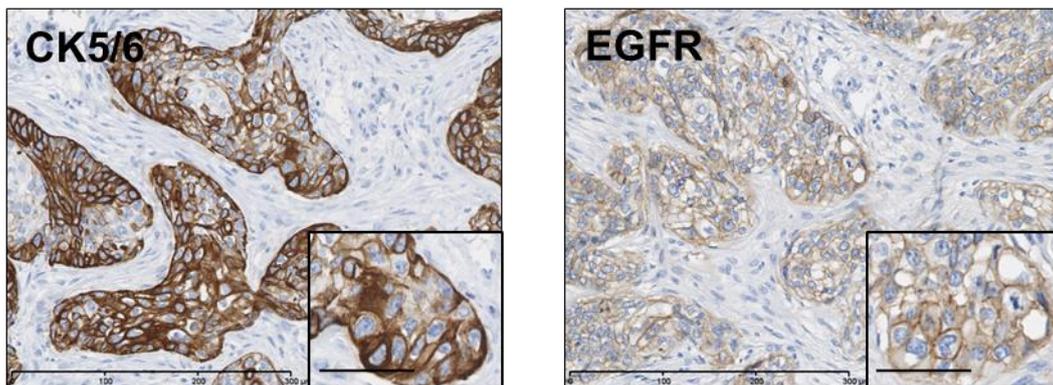


Figure 1.12 Marquage membranaire et cytoplasmique des CK5/6 et d'EGFR d'un carcinome mammaire de phénotype basal. Coloration immunohistochimique, en marron, des protéines CK5/6 et EGFR, pour l'association de cette tumeur au sous-type de phénotype basal. Contre-coloration en bleu (hématoxyline et bicarbonate). Barre de mesure: 300 μm et 50 μm (petit encadré à l'intérieur de l'image)

Le sous-type de phénotype basal représente environ 15% des cancers du sein. Il est principalement de type histologique canalaire SAI invasif, de haut grade, mais est également retrouvé dans certains types histologiques plus rares, tels que les types médullaire et métaplasique. L'analyse histologique de ce sous-type révèle son agressivité, dont voici les principales caractéristiques: tumeur volumineuse au contour mal défini, nécrose centrale, pléomorphisme nucléaire marqué, formation tubulaire manquante, haut taux mitotique et infiltrat lymphocytaire (N. C. Turner *et al.*, 2013). Sa croissance rapide en fait une cible difficile en ce qui a trait au dépistage par mammographie. Il est aussi associé à un âge moins avancé (moins de 50 ans), ainsi qu'aux femmes ayant un bagage génétique africain (Badve *et al.*, 2011). Fait surprenant, ces tumeurs ont une forte réponse à la chimiothérapie par anthracycline/taxane comparativement au sous-type luminal A (Di Cosimo *et al.*, 2010). Bien qu'il y ait des patientes avec réponse complète, celles qui présentent une maladie résiduelle ont un mauvais pronostic. Les métastases de ce sous-type agressif se situent préférentiellement au cerveau et aux poumons, ce qui pourrait expliquer l'évolution clinique défavorable (Luck *et al.*, 2008).

Tout comme le sous-type HER-2+, les tumeurs résistantes doivent être ciblées spécifiquement. La protéine de choix dans le cas du sous-type TN est EGFR. L'utilisation

d'anticorps monoclonaux dirigés contre EGFR, appelé également HER-1, semble indiquée puisque ce récepteur fait partie de la même famille que l'oncoprotéine HER-2. L'anti-EGFR Cetuximab (ERBITUX®; Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne) n'a pas donné les bénéfices cliniques escomptés en monothérapie ou en combinaison à la chimiothérapie dans les essais cliniques impliquant des femmes atteintes du cancer du sein TN (Carey *et al.*, 2010). Bien que ce récepteur membranaire soit une cible de choix, il ne faut pas oublier toute la cascade de signalisation qui en découle. De nos jours, plusieurs essais cliniques se penchent sur la combinaison de thérapies ciblées pour contrer l'obstacle principal: la résistance des tumeurs au traitement. La mise en évidence d'un mécanisme de compensation entre EGFR, HER-3 et la voie PI3K-Akt a paru dans une étude de Tao et ses collègues (Tao *et al.*, 2014). Les résultats sur le cancer du sein TN, *in vitro* et *in vivo*, démontrent l'importance de bloquer les trois cibles simultanément pour augmenter l'activité anti-tumorale. Lorsqu'EGFR est inhibé, la compensation de la signalisation de prolifération se fait par HER-3. De plus, l'inhibition de la voie PI3K-Akt est beaucoup plus efficace lorsque HER-3 est ciblé. L'obstacle à l'utilisation d'un traitement anti-EGFR est, selon cette étude, que les cellules cancéreuses possèdent d'autres récepteurs qui permettent leur prolifération. L'autre raison possible des faibles résultats du Cetuximab est l'absence d'une quantification du récepteur EGFR comparativement à l'oncoprotéine HER-2. L'équipe de Maurizio Scaltriti a publié récemment une méthodologie quant à la quantification des différents membres de la famille HER dans le cancer du sein (Nuciforo *et al.*, 2015). L'éligibilité des patientes au traitement anti-HER-2 est très stricte selon une expression franche du récepteur à la membrane des cellules tumorales. Le succès des anticorps monoclonaux anti-EGFR serait possible suite à un test d'expression et de localisation puisque les tests *in vitro*, impliquant des lignées de cellules tumorales mammaires ayant une forte expression d'EGFR, sont concluants.

La seconde cible thérapeutique prometteuse est la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP). Le fait que la mutation de *BRCA1* induise le développement d'une tumeur de phénotype basal indique un défaut dans la réparation de l'ADN pour ces cellules. En ciblant la protéine PARP par un inhibiteur, les cellules tumorales auront une capacité à détecter et réparer l'ADN endommagé beaucoup plus réduite, ce qui mènera à l'apoptose, principalement pas une chimiosensibilité augmentée (Carey *et al.*, 2010). Différents essais cliniques sont en cours et des résultats encourageants impliquent l'inhibiteur de PARP-1/2 Olaparib (LYNPARZA™; AstraZeneca, Macclesfield, UK). En phase clinique II, cet inhibiteur, à la suite de la chimiothérapie, a démontré une activité anti-tumorale en augmentant la survie sans progression des patientes atteintes du cancer de l'ovaire, plus spécifiquement avec mutations de *BRCA* (B. Kaufman *et al.*, 2015a). Il est le premier inhibiteur de PARP à être approuvé par le *US Food and Drug Administration* (FDA) pour le traitement du cancer de l'ovaire avancé

avec mutations de *BRCA*, conditionnel à la démonstration de bénéfices cliniques en essai clinique de phase III qui inclura également des patientes atteintes du cancer du sein avec *BRCA* muté. Cette nouvelle, parue en décembre 2014, démontre l'importance de cibler spécifiquement les femmes atteintes d'un cancer du sein non seulement TN, mais également avec mutations de *BRCA*, pour obtenir les résultats qui permettront de les traiter avec un inhibiteur de PARP tel que LYNPARZA™.

1.3.5 Faible en claudines

La découverte du sous-type « faible en claudines » (*claudin-low*) est distincte de l'étude de Perou et ses collègues en 2000. En fait, il s'est espacé sept ans entre la découverte des sous-types moléculaires du cancer du sein et ce sous-type (Herschkowitz *et al.*, 2007). Son nom découle de l'expression réduite des gènes des jonctions serrées, de l'adhésion cellule-cellule et codants pour les claudines 3, 4 et 7. L'histologie, ainsi que les marqueurs d'identification, s'apparentent de façon importante au phénotype basal: carcinomes canaux SAI invasifs de haut grade, carcinomes médullaires, carcinomes métaplasiques, TN (ER-, PR- et HER-2-) (Prat *et al.*, 2011). La caractéristique principale de ce sous-type est sa similarité aux cellules souches et mésenchymateuses. Puisque la vimentine est un marqueur de la transition épithélio-mésenchymateuse, l'équipe de Charles M. Perou a identifié cette protéine en tant que marqueur du sous-type « faible en claudines » (Prat *et al.*, 2010). Le masque épithélial, marqué par les cytokératines 5 et 19 (CK5/19), précise l'expression de la vimentine par les cellules tumorales (Tableau 1.1) (Figure 1.13). Pour révéler cette double expression protéique, une seule technique est possible: l'immunofluorescence. Bien que les sous-types luminal A, luminal B et HER-2+ ne présentent pas cette double expression, le sous-type de phénotype basal ne diffère pas du sous-type « faible en claudines ». D'autres marqueurs seront nécessaires pour distinguer spécifiquement ces tumeurs mammaires. Les protéines claudines seront à considérer quant à leur perte très spécifique dans leur expression génique. Malgré que nous ayons une caractérisation bien établie de l'expression des gènes du sous-type faible en claudines, d'autres études seront indispensables pour son identification en immunohistochimie, et ainsi, permettre son inclusion dans les études d'expression des protéines selon les sous-types du cancer du sein.

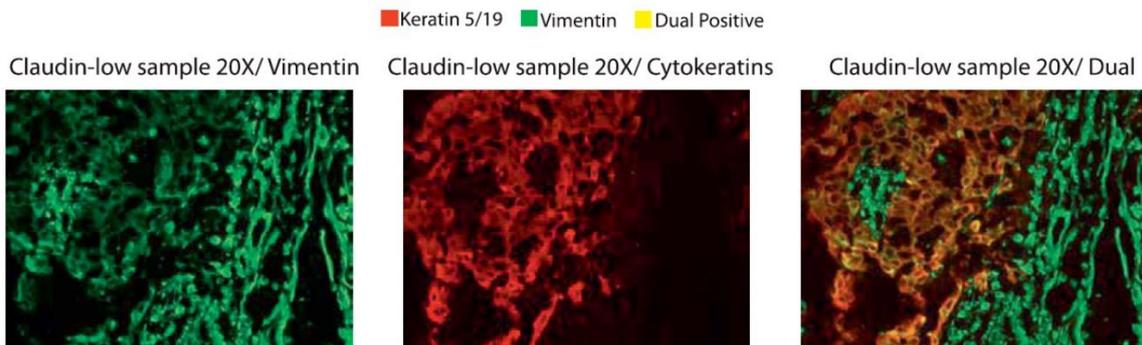


Figure 1.13 Marquage membranaire et cytoplasmique de la vimentine et des CK5/19 d'un carcinome mammaire faible en claudines. Coloration par immunofluorescence des protéines vimentine (vert) et CK5/19 (rouge), pour l'association de cette tumeur au sous-type faible en claudines. L'image de droite indique une co-expression de ces deux marqueurs, plus précisément la vimentine dans les cellules épithéliales cancéreuses faibles en claudines. Modifié de (Prat *et al.*, 2010)

Sa prévalence est de 12 à 14% et s'associe à un mauvais pronostic (Prat *et al.*, 2011). En ce qui a trait à la réponse chimiothérapeutique, les patientes atteintes de ce sous-type répondent mieux à ce traitement que les tumeurs de sous-types luminal A ou B, mais moins bien que pour le sous-type basal (Prat *et al.*, 2010). Les différentes thérapies ciblées en essais cliniques, spécifiques au cancer du sein TN, incluent ce sous-type également. De plus amples études permettront d'identifier les biomarqueurs, en plus des cibles thérapeutiques potentielles, spécifiques au cancer du sein faible en claudines.

1.4 Les traitements

Les traitements standards peuvent être utilisés localement ou de façon systémique (Matsen *et al.*, 2013). La première approche locale est la chirurgie qui peut être conservatrice (retrait seulement d'une partie de la glande mammaire) ou radicale (retrait complet du sein qui contient la tumeur). Ce traitement permet d'une part de retirer la tumeur, mais également certains ganglions lymphatiques régionaux qui seront analysés en histopathologie pour évaluer la présence de métastases. Ces informations sont importantes pour le pronostic et pour le choix des thérapies qui suivront la chirurgie. Le second traitement local est la radiothérapie. Elle est utilisée principalement pour cibler des métastases osseuses qui sont fréquemment retrouvées chez les patientes souffrant d'un cancer du sein avancé. La radiothérapie permet également de compléter la chirurgie conservatrice pour s'assurer de ne pas laisser de cellules cancéreuses dans la glande mammaire.

La chimiothérapie est le traitement systémique classique. Elle peut être néo-adjuvante, c'est-à-dire administrée avant la chirurgie, ou encore adjuvante, suite à la chirurgie (M. Kaufmann *et al.*, 2012). Les anthracyclines, telles que la doxorubicine, s'intercalent dans l'ADN, ce qui empêche la réplication de l'ADN et la division cellulaire (Rabbani *et al.*, 2005). Ces intercalants sont utilisés depuis plus de 30 ans. Le désavantage de la chimiothérapie à base d'anthracyclines est la cardiotoxicité induite par son accumulation dans le cœur. Les taxanes, tels que le paclitaxel et le docetaxel, sont un traitement plus récent, mais, selon certaines études, serait plus efficace dans le traitement du cancer du sein que les anthracyclines. La perturbation de la dynamique des microtubules par les taxanes a pour conséquence l'inhibition de la division cellulaire (Jordan *et al.*, 2004). Ces deux familles de composés sont les plus utilisés pour traiter le cancer du sein et peuvent également être combinés ensemble ou avec d'autres composés. Les deux autres thérapies systémiques disponibles sont l'hormonothérapie, dans le cas où le cancer exprime les récepteurs hormonaux ER et PR, et la thérapie ciblée contre HER-2, le Trastuzumab.

Bien que l'ensemble de ces traitements soit utilisé depuis longtemps, certains cancers du sein n'y répondent pas. Il y a un réel manque de thérapies ciblées, comme les anti-oestrogènes et le Trastuzumab, pour traiter plus adéquatement les tumeurs. Au cours des dernières années, des progrès ont été réalisés dans le développement de ces thérapies. Le cancer du sein TN est le seul à ne pouvoir bénéficier d'aucune thérapie ciblée. C'est pourquoi plusieurs groupes ont étudié les différents biomarqueurs surexprimés par cette catégorie de carcinomes mammaires (Di Cosimo *et al.*, 2010). Tels que discuté précédemment, EGFR et PARP sont deux cibles de choix quant au traitement de tumeurs de sous-type basal. D'autres thérapies sont également en essai clinique. Le Bevacizumab (Avastin; Genentech, San Francisco, CA) est un anticorps monoclonal anti-VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire). L'angiogenèse tumorale est une cible de choix puisqu'essentielle pour l'apport d'oxygène et de nutriments aux cellules cancéreuses. Bien qu'utilisé pour le traitement d'autres cancers, le Bevacizumab n'a pas amélioré de façon considérable la survie des femmes atteintes d'un carcinome mammaire, ce qui lui a valu d'être retiré du marché pour ce qui est du traitement du cancer du sein (Lehmann *et al.*, 2014).

Bien que certains essais cliniques ne donnent pas les résultats escomptés, la découverte de nouvelles thérapies ciblées est essentielle. Ce long processus débute généralement par la découverte et l'analyse de biomarqueurs tumoraux.

1.5 Les biomarqueurs

La mise en évidence des biomarqueurs permet, aujourd'hui, ce qu'on appelle la médecine personnalisée. Celle-ci est utilisée pour plusieurs maladies, dont le cancer du sein. Les biomarqueurs peuvent être de différents types: diagnostiques, pronostiques ou prédictifs de la réponse à un traitement. Plusieurs tests multigéniques ont été élaborés pour permettre d'établir un pronostic. Tout d'abord, le test moléculaire multigénique Oncotype DX® (Genomic Health, Inc., Redwood, CA, USA) comprend 21 gènes pour les carcinomes mammaires ER+ et sans métastase ganglionnaire (Paik *et al.*, 2004). L'analyse des gènes se fait selon une transcription inverse, suivi d'une réaction en chaîne par polymérase quantitative (RT-PCR en temps réel), à partir d'une tumeur conservée dans un bloc de paraffine. Ce test est actuellement commercialisé et correspond principalement à l'analyse de 16 gènes associés à ER (*ESR1*, *PGR*, *BCL2*, *SCUBE2*), à la prolifération (*Ki67*, *STK15*, *Survivin*, *CCNB1*, *MYBL2*), à l'oncoprotéine HER-2 (*HER-2*, *GRB7*), à l'invasion (*MMP11*, *CTSL2*) et d'autres gènes (*GSTM1*, *CD68*, *BAG1*). Les cinq gènes supplémentaires servent de gènes de référence. Le résultat, appelé Recurrence Score®, permet de prédire la réponse au tamoxifène. Un score élevé indique que la combinaison du tamoxifène à une chimiothérapie serait plus efficace. De plus, les scores de récurrence plus élevés seraient davantage associés au sous-type luminal B qu'au sous-type luminal A puisqu'associé à une prolifération plus importante et à HER-2. Un second test, MammaPrint® (Agendia, Irvine, CA, USA), est constitué de puces à ADN pouvant analyser l'expression de 70 gènes impliqués dans la cascade métastatique, ce qui en fait l'essai multigénique commercial avec le plus grand éventail de gènes (van 't Veer *et al.*, 2002). Cette signature tumorale, à partir d'échantillons congelés de carcinomes mammaires sans métastase ganglionnaire, permet de prédire le risque de récurrence dans les 5 ans suivant le diagnostic. Le statut d'ER et de HER-2 peut être positif ou négatif, contrairement au test Oncotype DX®. Ce test multigénique indique aux professionnels de la santé si la patiente a davantage besoin d'un traitement chimiothérapeutique (Slodkowska *et al.*, 2009). L'étude de Parker et ses collègues a permis la classification des sous-types intrinsèques du cancer du sein (luminal A, luminal B, HER-2 enrichi et phénotype basal), selon 50 gènes, ce qui précise la valeur pronostique d'une tumeur (Parker *et al.*, 2009). Les analyses ont été effectuées sur tissus congelés et en paraffine, à l'aide de puces à ADN et RT-PCR en temps réel. Tout comme pour le test Oncotype DX®, les tumeurs doivent avoir un statut positif pour ER. Prosigna® (NanoString Technologies, Seattle, WA, USA) est l'algorithme qui mesure l'expression de ces 50 gènes cibles (Dowsett *et al.*, 2013). Le risque de récurrence (nommé ROR pour *Risk of Recurrence*) est alors assigné, ce qui permet de déterminer la probabilité d'une récurrence à distance dans les 10 ans suivant le diagnostic. Ces trois tests multigéniques sont actuellement commercialisés et offerts aux professionnels de la santé qui voudraient concrétiser leurs

décisions quant au traitement des femmes atteintes du cancer du sein. Tels que décrit, ces tests possèdent leurs avantages et leurs inconvénients.

Bien que l'analyse des gènes, ainsi que le développement d'une médecine personnalisée, soient en vogue, le travail des pathologistes reste indispensable (Leong *et al.*, 2011). Tout d'abord, une analyse au microscope du tissu mammaire permet de déterminer, entre autres, le type histologique et le grade du carcinome. Pour que les résultats pathologiques soient complets, l'usage de la technique d'immunohistochimie est primordial pour révéler certains marqueurs protéiques sur les coupes histologiques. Dans un carcinome mammaire, l'évaluation de l'expression des récepteurs hormonaux, ER et PR, de l'oncoprotéine HER-2 et parfois du marqueur de prolifération Ki-67 se fait de routine dans le milieu hospitalier. Les pathologistes sont également impliqués dans l'élaboration de projets de recherche visant à développer de nouveaux biomarqueurs qui pourront être introduits dans la pratique clinique et qui permettront d'améliorer, d'une part, la prédiction pronostique, et d'autre part, les protéines cibles pour le développement de nouvelles thérapies. Fait intéressant, une étude récente démontre que l'utilisation des quatre marqueurs révélés par immunohistochimie, de routine, permet de prédire le score de récurrence donné par l'Oncotype DX (B. M. Turner *et al.*, 2015). Ces résultats démontrent que l'analyse des gènes, au coût d'environ 4 350\$ pour une seule patiente, peut être remplacée par la dépense actuelle des hôpitaux pour l'immunohistochimie. L'analyse de prélèvements sanguins pour trouver des protéines en circulation est une avenue prometteuse pour les biomarqueurs puisque non invasive. Les protéines les plus connues sont l'antigène prostatique spécifique (APS) pour une affection de la prostate et l'antigène tumoral 125 (CA 125) pour identifier une récurrence du cancer de l'ovaire (Diamandis *et al.*, 2013). Le cancer du sein a également son marqueur sanguin, l'antigène tumoral 15-3 (CA 15-3), aussi connu sous le nom de MUC1 circulant, qui est utilisé pour vérifier l'efficacité du traitement en cours (Kufe, 2009). Ces marqueurs sériques ne peuvent pas être utilisés pour diagnostiquer un cancer. La recherche d'autres protéines en circulation, lors d'un cancer, est primordiale. Plusieurs études ont mis en évidence une famille de lectines, les galectines, qui se retrouvent dans le sang de patients atteints de différents types de cancer.

2. LES GALECTINES

La modification post-traductionnelle qu'est la glycosylation, présente principalement sur les récepteurs membranaires, est essentielle à la vie (Ohtsubo *et al.*, 2006). Cet attachement de sucres a plusieurs fonctions, dont celle d'être un ligand pour certaines protéines, telles que les lectines. Ces protéines peuvent être classées par famille. Pour faire partie de la famille des

glectines, les protéines doivent avoir une affinité pour les β -galactosides, ainsi qu'une séquence d'acides aminés spécifique qui est conservée chez toutes les glectines. Ce site protéique spécifique est le domaine de reconnaissance des glucides (CRD). La définition du terme glectine attribué aux protéines possédant ces deux caractéristiques a été proposée en 1994 (Barondes *et al.*, 1994a, Barondes *et al.*, 1994b).

La découverte des glectines remonte aux années 70, chez l'*Electrophorus electricus* (Teichberg *et al.*, 1975). Une protéine ayant une affinité pour les β -galactosides a été retrouvée dans l'organe électrique de cette anguille et, par conséquent, a été nommée électrolectine. L'année suivante, de Waard et ses collègues ont découvert la première glectine chez les mammifères, plus tard désignée glectine-1 (de Waard *et al.*, 1976). Les glectines ont par la suite été nommées dans l'ordre de leur découverte. Différentes études ont permis de montrer que les glectines ont été conservées au cours de l'évolution, des invertébrés jusqu'aux vertébrés (Cooper, 2002). La famille des glectines compte maintenant 15 membres, dont 11 retrouvés chez l'humain (gal-1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 12, 13 et 14).

2.1 Classification et structure

La classification des 15 membres des glectines est basée sur leurs propriétés structurales (Figure 1.14) (Cooper, 2002, R. Y. Yang *et al.*, 2008). La première classe, les glectines prototypes, se compose des glectines 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 et 15. La caractéristique principale de cette sous-famille est la présence d'un seul CRD par glectine. Pour la plupart, ces monomères peuvent se dimériser en solution de façon non-covalente, ce qui implique l'exposition de deux sites de reconnaissance au ligand. Cette attraction entre deux glectines prototypes est dynamique. L'attachement de deux ligands distincts est alors possible pour cette protéine dimérique adossée du côté opposé au CRD. Concrètement, cela permet notamment de stabiliser la dimérisation d'un récepteur membranaire glycosylé à la surface des cellules. La deuxième sous-famille ne se compose que d'un seul membre, la glectine-3. En plus de posséder un domaine contenant le CRD, cette glectine, de type chimérique, possède une extension du côté N-terminal riche en proline et en glycine, ce qui lui permet de former des treillis moléculaires. Cette extension comprend un site de clivage pour les métalloprotéinases de la matrice (MMPs) (Ochieng *et al.*, 1994). La capacité de la glectine-3 à former des multimères via cette extension polypeptidique lui permet de lier plus de deux ligands glycosylés à la fois. La troisième sous-famille de type tandem comprend les glectines 4, 6, 8, 9 et 12. Leur structure particulière se définit par un lien peptidique qui relie de façon covalente deux domaines homologues contenant chacun un CRD. La séquence, ainsi que la

longueur de ce peptide de liaison sont propres à chaque galectine de cette classe, ce qui rend la proximité et l'orientation de chaque CRD spécifique à chacune. Cet arrangement structural leur confère les mêmes activités que les dimères des galectines prototypes. Par contre, puisque cette classe de protéines implique l'exposition de deux CRD différents, la probabilité de lier deux ligands non-identiques est beaucoup plus importante. La classification des galectines répond, en partie, au fait que chaque galectine se distingue par une affinité bien précise pour des ligands glycosylés.

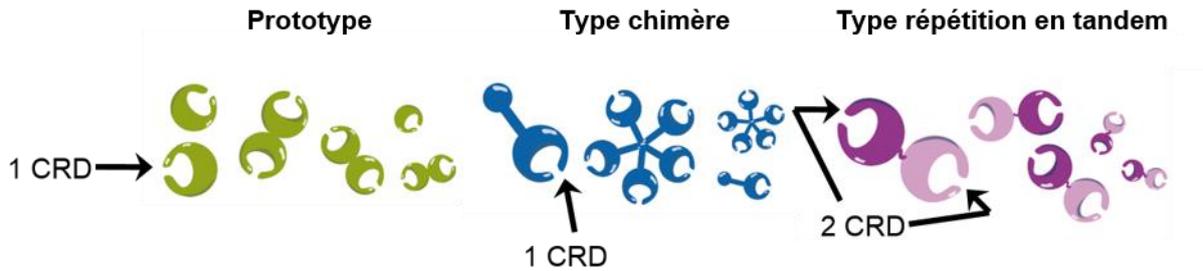


Figure 1.14 Classification des galectines. Représentation schématique des 3 classes de la famille des galectines: prototype, type chimère et type répétition en tandem. Modifié de (R. Y. Yang *et al.*, 2008)

Bien que séparées en trois sous-familles, les galectines sont similaires par le haut niveau de conservation d'environ 130 acides aminés, à partir de leur extrémité C-terminale. Cette séquence forme une poche, le CRD, qui est responsable de l'attachement d'un sucre ou, de façon plus physiologique, d'une protéine glycosylée. La figure 1.15 permet de constater, en jaune, les résidus hautement conservés qui sont spécifiques non seulement au CRD, mais aussi à la liaison directe aux sucres (Henrick *et al.*, 1998).

G1_bovine	P11945	N	N	L	C	L	H	F	N	P	R	F	N	A	H	G	D	V	N	T	I	V	C	N	S	K	D	A	G	A	W	G	A	E	Q	R	E	S	A	F	P							
G1_hamster	P48538	N	N	L	C	L	H	F	N	P	R	F	N	A	H	G	D	A	N	T	I	V	C	N	S	K	D	N	G	A	W	G	T	E	H	R	E	P	A	F	P							
G1_human	P09382	N	N	L	C	L	H	F	N	P	R	F	N	A	H	G	D	A	N	T	I	V	C	N	S	K	D	G	G	A	W	G	T	E	H	R	E	P	A	F	P							
G1_mouse	P17601	N	N	L	C	L	H	F	N	P	R	F	N	A	H	G	D	A	N	T	I	V	C	N	S	K	E	D	G	T	W	G	T	E	H	R	E	P	A	F	P							
G1_rat	P11782	N	N	L	C	L	H	F	N	P	R	F	N	A	H	G	D	A	N	T	I	V	C	N	S	K	D	D	G	T	W	G	T	E	H	R	E	T	A	F	P							
G1_chick	P07583	S	T	L	M	L	H	F	N	P	R	F	D	C	H	G	D	V	N	T	V	V	C	N	S	K	E	D	G	T	W	G	T	E	H	R	K	A	D	F	P							
G1m_chick	P23668	T	H	L	G	L	H	F	N	P	R	F	D	A	H	G	D	V	N	L	I	V	C	N	S	K	K	M	E	E	W	G	T	E	H	R	E	T	V	F	P							
G2_human	P05162	D	K	L	N	L	H	F	N	P	R	F	S	E	S																																	
G3_hamster	P47953	N	D	I	A	F	H	F	N	P	R	F	N	E	N																																	
G3_dog	P38486	N	D	V	A	F	H	F	N	P	R	F	N	E	D																																	
G3_human	P17931	N	D	V	A	F	H	F	N	P	R	F	N	E	N																																	
G3_mouse	P16110	N	D	V	A	F	H	F	N	P	R	F	N	E	N																																	
G3_rabbit	P47845	N	D	V	A	F	H	F	N	P	R	F	N	E	N																																	
G3_rat	P08609	N	D	I	A	F	H	F	N	P	R	F	N	E	N																																	
G4_rat1	P38552	A	D	I	A	F	H	F	N	P	R	F	D	G																																		
G4_rat2	P38552	G	D	I	A	F	H	M	N	P	R	I	G	D																																		
G5_rat	P47967	G	D	I	A	F	H	L	N	P	R	F	D	E	N																																	
G7_human	P47929	S	D	A	A	L	H	F	N	P	R	L	D	T	S																																	
G8_rat	A55975	R	D	I	A	L	H	L	N	P	R	L	N	V	K																																	

Figure 1.15 Structure conservée des galectines. Alignement de la séquence d'acides aminés des premières galectines découvertes, chez différents vertébrés. Le surlignement jaune indique les acides aminés hautement conservés, en bleu sont ceux partiellement conservés et les résidus en rouge sont variables. Modifié de (Henrick *et al.*, 1998)

Bien qu'historiquement les galectines soient surtout connues pour leur capacité à lier des sucres via leur CRD, il est maintenant clair qu'elles peuvent aussi avoir des interactions protéine-protéine. C'est notamment le cas des galectines intracellulaires. La liaison entre les galectines 1 et 3 et la protéine Gemin4, dans le compartiment nucléaire, en est un exemple parmi d'autres (J. W. Park *et al.*, 2001).

2.2 Expression tissulaire et cellulaire

Chez l'humain, les galectines sont exprimées dans la majorité des tissus. Par contre, le patron d'expression est propre à chaque galectine. Par exemple, la galectine-1 se retrouve dans le compartiment stromal de la majorité des tissus, principalement dans les fibroblastes et les cellules endothéliales (Alves *et al.*, 2011, Bektas *et al.*, 2010, Kohrenhagen *et al.*, 2010, Machado *et al.*, 2013).

Quant à la galectine-2, elle se retrouve principalement dans le cytosol et le noyau des cellules épithéliales (Saal *et al.*, 2005). Cette lectine est très fortement exprimée dans la muqueuse de la vésicule biliaire, les cellules pariétales de l'estomac, les cellules folliculaires de la thyroïde et les acini séreux des glandes salivaires. D'autres tissus présentent des niveaux d'expression variés de la galectine-2, ce qui indique un patron ubiquitaire, mais spécifique selon le type cellulaire.

La galectine-3 est une des galectines les plus étudiées, avec la galectine-1. Son importance en tant que biomarqueur pour diverses maladies correspond à une variation généralement à la hausse dans les tissus pathologiques. Son absence de la thyroïde normale, en comparaison aux cellules tumorales papillaires qui surexpriment la galectine-3, est la caractéristique de cette lectine la plus étudiée (Chiu *et al.*, 2010, Feilchenfeldt *et al.*, 2003). La vésicule biliaire, le placenta, la glande mammaire, la prostate, le cerveau et la thyroïde sont tous des tissus où l'expression de la galectine-3 a été observée (Borges *et al.*, 2011, Jeschke *et al.*, 2007, Junking *et al.*, 2008, Logullo *et al.*, 2007, Rios Moreno *et al.*, 2011, Y. Wang *et al.*, 2009). Sans être exhaustive, cette liste de tissus positifs pour la galectine-3 démontre que cette protéine, à la fois épithéliale et stromale, retrouvée dans le noyau et le cytoplasme des cellules, est omniprésente dans le corps humain.

Une des galectines les moins étudiées, la galectine-4, a été observée dans tous les organes du tractus digestif, chez différentes espèces animales (Huflejt *et al.*, 2004). Pour ce qui est de l'humain, Huflejt et ses collègues ont démontré l'expression dense supra-nucléaire de la galectine-4 dans les cellules de la muqueuse du côlon. Sa localisation cytosolique est

également observée dans l'épithélium mammaire, mais avec une très faible intensité. Ces deux tissus, le côlon et le sein, lorsque cancéreux expriment la galectine-4 de façon plus importante.

Les galectines 5 et 6 se retrouvent seulement chez le rat et la souris, respectivement, et non chez l'humain.

La galectine-7 est bien connue de par son expression dans les épithéliums stratifiés. De par sa découverte dans les kératinocytes, la galectine-7 a été analysée dans de nombreuses études sur la peau (Magnaldo *et al.*, 1998). Une revue exhaustive de la littérature nous a permis d'identifier bon nombre de tissus qui expriment cette lectine (Tableau I de l'annexe I (St-Pierre *et al.*, 2012)). De façon prédominante, ce sont les cellules épithéliales qui contiennent la galectine-7, dans le cytoplasme, le noyau et à la membrane, ainsi que dans le milieu extracellulaire. On la retrouve dans la peau, la cornée, la lèvre, la muqueuse orale, la langue, la trachée, l'hypopharynx, le larynx, l'œsophage, l'estomac, le côlon, la vessie, les crêtes uro-génitales, le col de l'utérus, le vagin, l'ovaire, la vulve, l'anus, le sein et le thymus. Par ailleurs, la couche intima des artères exprime également la galectine-7.

Pour ce qui est de la galectine-8, on la retrouve surtout dans la peau, les glandes du côlon et dans les cellules hépatiques (Danguy *et al.*, 2001). Les cellules du pancréas, du segment tête et cou, du poumon et de la vessie expriment également cette protéine, mais en plus faible quantité. Sa localisation cellulaire peut être exclusivement cytoplasmique ou à la fois nucléaire et cytoplasmique. L'étude de Danguy et ses collègues démontre également que l'expression de la galectine-8 est réprimée lorsque le tissu devient cancéreux, à l'exception de la glande mammaire qui tend à surexprimer cette lectine dans les cellules tumorales.

Dans le cas de la galectine-9, les études ont surtout mis en évidence sa localisation pulmonaire et endométriale (Matsumoto *et al.*, 2013, Shimizu *et al.*, 2008). Son expression est également retrouvée dans le col de l'utérus, le sein, la peau et l'estomac. Par ailleurs, sa présence est rapportée plus spécifiquement lors de la transformation cancéreuse de ces quatre tissus (Irie *et al.*, 2005, Jiang *et al.*, 2013, Kageshita *et al.*, 2002, Liang *et al.*, 2008).

Les galectines subséquentes, c'est-à-dire de 10 à 15, n'ont été que très peu étudiées et elles ne sont pas toutes retrouvées chez l'humain. De plus amples études seront nécessaires pour identifier leur localisation tissulaire spécifique.

Bien que chaque groupe s'intéresse principalement à une ou parfois deux galectines, plus souvent les galectines 1 et 3, il est fort probable que plusieurs galectines soient présentes dans un même tissu. Toutefois, la signature des galectines (« galectinome ») pour un tissu spécifique demeure généralement encore très mal connue. Les études du placenta sont parmi les plus intéressantes. Par exemple, l'étude de Jeschke et ses collègues au troisième trimestre

de la grossesse a pu mettre en évidence un patron d'expression spécifique caractérisé par la présence des galectines 1 et 3 dans le trophoblaste villositaire et des galectines 2, 4, 8 et 9 dans le syncytiotrophoblaste (Jeschke *et al.*, 2013). Étant donné l'effet compensatoire ou parfois antagoniste entre ces lectines, une signature des galectines pour un organe donné est indispensable pour connaître le rôle biologique de l'ensemble. Une première signature des galectines dans le cancer de la prostate a démontré leur distribution spécifique dans les différentes composantes cellulaires du tissu (Compagno *et al.*, 2013, Laderach *et al.*, 2013). La définition de ces signatures est primordiale pour connaître la fonction des galectines dans le cancer et le design d'inhibiteurs efficaces qui ciblent les fonctions pro-tumorales des galectines.

2.3 Fonctions

De façon générale, la localisation intracellulaire, que ce soit dans le cytosol, le noyau, la mitochondrie ou la membrane, est attribuée à une fonction bien définie (Liu *et al.*, 2002). Historiquement, cependant, les galectines sont surtout connues pour leurs fonctions extracellulaires via leur attachement aux récepteurs membranaires glycosylés. Elles sont relâchées dans le milieu extracellulaire par un mécanisme encore mal défini et sans l'aide d'un peptide signal d'export hors de la cellule dans la séquence d'acides aminés des galectines. De plus, elles ne présentent pas de modifications post-traductionnelles, telles que la glycosylation, et ne traversent pas la voie vésiculaire du réticulum endoplasmique jusqu'à l'appareil de Golgi. C'est ce qui a mené la communauté scientifique à émettre l'hypothèse que les galectines, protéines cytoplasmiques typiques, utilisent une voie de sécrétion non-classique (Hughes, 1999). La galectine-3 est probablement celle qui a été la plus étudiée pour sa sécrétion hors de la cellule. Plusieurs mécanismes d'action ont été proposés pour expliquer leur présence dans le milieu extracellulaire: pics intracellulaires de l'ion calcium, transduction mécanique par détachement des cellules, accumulation de vésicules à la membrane plasmique interne pour la relâche de leur contenu dans l'espace extracellulaire et transfert par exosomes (Ochieng, 2014). Bien que d'autres études soient nécessaires pour élucider cette sécrétion dite non-classique pour les membres de la famille des galectines, l'aboutissement au compartiment extracellulaire implique des fonctions spécifiques dans le milieu extracellulaire.

2.3.1 Fonctions extracellulaires

Lorsque sécrétées par la cellule, les galectines ont pour principale fonction de lier les glycoprotéines présentes dans la membrane cellulaire et dans les éléments du stroma (Vasta *et al.*, 2012). On les retrouve, par exemple, dans la matrice extracellulaire, c'est-à-dire le tissu responsable du support des cellules fonctionnelles de l'organe. Les glycoprotéines qui s'y retrouvent, telles que le collagène et la laminine, sont des ligands pour le CRD des galectines. La structure des galectines implique la dimérisation dynamique des galectines prototypes, la dimérisation constante, pour le type répétition en tandem, et l'oligomérisation pour la galectine-3. Ces propriétés engendrent l'exposition de plusieurs CRD reliés entre-eux. C'est ce qui permet aux galectines d'induire une interaction entre les glycoprotéines de la matrice extracellulaire et les récepteurs glycosylés à la surface des cellules (Figure 1.16A). Ces interactions sont nommées CRD-dépendantes et impliquent principalement les intégrines exposées à la membrane cytoplasmique.

La liaison aux chaînes de sucres, plus particulièrement le galactose, située sur les récepteurs membranaires, a pour autre fonction l'adhésion intercellulaire, que ce soit homo ou hétérotypique. Ces différentes interactions ont pour principal rôle le soutien entre les différentes composantes d'un même organe tissulaire, ce qui est indispensable pour la fonction des systèmes biologiques. C'est ce qui a été étudié par l'équipe d'Avraham Raz. Ils ont démontré que la présence de la galectine-3 et de son ligand, la protéine de liaison de Mac-2, une protéine glycosylée sécrétée, induit l'agrégation cellulaire (Inohara *et al.*, 1996). Leur liaison est CRD-dépendante et se produit à la surface des cellules.

La figure 1.16B démontre schématiquement un aspect plus fonctionnel des galectines, soit l'induction des voies de signalisation intracellulaire. Comme il a été décrit pour l'interaction cellule-matrice, la multiplication des CRD fonctionnels permet le rapprochement de deux récepteurs de la même famille. C'est ce qui a été décrit dans plusieurs études sur les galectines, et surtout pour la galectine-3 qui a la capacité de former des treillis puisqu'elle peut oligomériser par son prolongement protéique unique. Le groupe de James W. Dennis a démontré l'attachement de la galectine-3 aux résidus glycosylés d'EGFR et du récepteur du facteur de croissance transformant β (TGF β) (Partridge *et al.*, 2004). Cette interaction favorise la rétention des récepteurs à activité kinase à la membrane, ce qui empêche leur endocytose et prolonge leur signalisation intracellulaire.

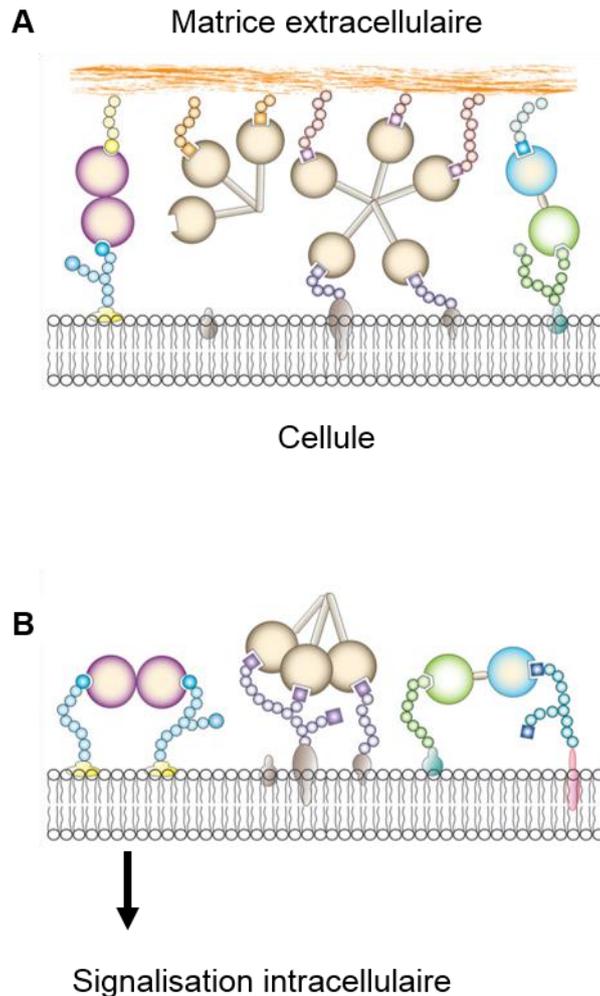


Figure 1.16 Liaison des galectines dans le compartiment extracellulaire. (A) Stabilisation de l'adhérence cellulaire par la liaison entre les protéines glycosylées de la matrice extracellulaire, les récepteurs glycosylés à la surface des cellules et les galectines. (B) Stabilisation des récepteurs à la surface des cellules et de leur dimérisation par l'attachement de plusieurs galectines sous forme dimérique ou multimérique. Modifié de (Vasta *et al.*, 2012)

Hormis leur capacité à augmenter la stabilité membranaire des glycorécepteurs, les galectines sont bien connues pour leur rôle à moduler la mort des cellules du système immunitaire. Ce rôle a été très bien mis en évidence dans le cas de la galectine-1 (Perillo *et al.*, 1995). Cette lectine s'attache aux récepteurs glycosylés à la surface des cellules du système immunitaire. L'étude de Matarrese *et al.* a permis de démystifier le mécanisme d'action de la galectine-1 (Matarrese *et al.*, 2005). La mort des lymphocytes T est induite par la sensibilisation de Fas, aussi nommé CD95, que l'on retrouve à la surface des cellules. La caspase-8, ainsi que les dommages mitochondriaux, sont les mécanismes intracellulaires, suivant cette sensibilisation, qui amorcent la mort cellulaire programmée. D'autres récepteurs, tels que CD45, CD43 et CD7, sont également reconnus par la galectine-1, ce qui mène à l'apoptose des cellules T (Rabinovich *et al.*, 2012). La galectine-3, dans le milieu extracellulaire, peut également

provoquer la mort des lymphocytes T par son attachement aux CD45, CD71 et CD29. Bien que leurs récepteurs n'aient pas été identifiés jusqu'à maintenant, les galectines 2, 4, 8 et 9 possèdent également des capacités pro-apoptotiques. De plus, notre groupe a démontré l'induction de la mort des lymphocytes T par la galectine-7 extracellulaire (Labrie *et al.*, 2014).

L'abondance des galectines à l'interface fœto-maternelle est également associée à leurs fonctions extracellulaires (Blidner *et al.*, 2013). Elles sont exprimées soit dans le tractus reproducteur, l'embryon et/ou le placenta. Le membre de la famille des galectines qui a été le plus étudié dans la reproduction est la galectine-1. Sa sécrétion semble centrale au début de la gestation, c'est-à-dire lors de l'implantation de l'embryon. Plus précisément, elle est impliquée dans l'invasion du trophoblaste, couche cellulaire responsable de l'envahissement de la muqueuse de l'utérus et qui devient, au cours de la grossesse, le placenta. De plus, selon les mécanismes d'immunosuppression bien connus pour la galectine-1, plus particulièrement par l'induction de l'apoptose des lymphocytes T, la présence de cette lectine dans le milieu extracellulaire permet la tolérance du système immunitaire de la mère envers son fœtus. Ces fonctions extracellulaires sont évidemment CRD-dépendantes puisqu'elles impliquent la liaison de récepteurs glycosylés. L'identification de récepteurs pour la galectine-1 dans le stroma endométrial et du trophoblaste, tels que l'intégrine $\beta 1$ et MUC1, appuie son implication dans l'implantation de l'embryon par l'adhésion cellule-matrice (G. Barrientos *et al.*, 2014). Concrètement, l'importance de cette galectine dans le support du développement gestationnel est observée par la quantité de galectine-1 sérique plus faible chez les femmes qui ont des avortements spontanés à répétition comparativement aux femmes fertiles (Ramhorst *et al.*, 2012).

2.3.2 Fonctions intracellulaires

Les ligands principaux des galectines, selon leur catégorisation dans la famille des lectines, sont des groupements de sucres généralement retrouvés sur les récepteurs membranaires, du côté extracellulaire. C'est sur cette localisation que la plupart des études se sont penchées. Par contre, depuis quelques années, l'observation de l'expression des galectines à l'intérieur des cellules a suscité de plus en plus d'intérêt quant à leurs fonctions distinctes de l'espace extracellulaire (Liu *et al.*, 2002, Vladioiu *et al.*, 2014). Fait intéressant, non seulement le patron intracellulaire est important, mais la localisation spécifique à une organelle en définit le rôle biologique (J. L. Wang *et al.*, 2004). Il a été aussi démontré que les interactions protéine-protéine des galectines, à l'intérieur d'une cellule, sont pour la plupart CRD-indépendantes. Une des études les plus importantes à ce sujet est, sans contredit, celle réalisée par Park et

ses collègues (J. W. Park *et al.*, 2001). Ils ont su montrer l'implication importante des galectines 1 et 3 dans l'épissage des pré-ARNm. Ces deux lectines se retrouvent au sein de la machinerie nécessaire à ce processus. De plus, les galectines 1 et 3 ont la capacité de lier directement Gemin4, une protéine importante de la machinerie d'épissage. Puisque le fragment N-terminal de la galectine-3 altère l'épissage tel un dominant négatif, l'interaction de cette lectine à ce complexe est probablement indépendante du CRD. Pour ce qui est de la localisation, leur précédente étude démontre non seulement que les galectines 1 et 3 se retrouvent dans le noyau, mais plus précisément dans des « granules nucléaires », visualisés par immunofluorescence. De plus, ces granules se composent de facteurs d'épissage (Vyakarnam *et al.*, 1998). La galectine-3 est une lectine qui a comme action le transport nucléocytoplasmique (Funasaka *et al.*, 2014). La diffusion passive est probablement utilisée par la galectine-3 de par sa faible masse moléculaire (31 kDa). Sa séquence contient un signal de localisation nucléaire et sa phosphorylation induit son export nucléaire, ce qui implique également l'utilisation du transport actif. Sa localisation nucléaire est associée à l'expression de certains gènes, tels que ceux de la voie Wnt, de par sa liaison à la β -caténine. Le patron nucléaire de la galectine-3 est associé à la prolifération cellulaire, ainsi qu'au mauvais pronostic de certains cancers. Par contre, la localisation cytosolique de cette lectine, pour d'autres types de cancers, est reliée à son activité anti-apoptotique. Ce rôle est attribué spécifiquement à l'interaction de la galectine-3 avec différents joueurs importants de la voie apoptotique, tels que Bcl-2 (R. Y. Yang *et al.*, 1996). De plus, son transport vers les mitochondries, par la synexine, inhibe la relâche de cytochrome c (Yu *et al.*, 2002). Toutes ces observations indiquent que lorsque les galectines sont présentes à l'intérieur d'une cellule, il est primordial d'y analyser la localisation intracellulaire spécifique. Le rôle biologique, entre autres au cours d'une maladie, dépend à la fois du patron cytosolique, nucléaire ou mitochondrial des galectines, ainsi que des ligands de galectines impliqués.

2.4 Pathologies reliées aux galectines

De par leur reconnaissance des sucres de récepteurs membranaires, les galectines peuvent jouer un rôle important lors de la liaison d'un pathogène à son récepteur cellulaire (Sato *et al.*, 2009, Vasta, 2009). De plus, les pathogènes, que ce soient les virus, les bactéries, les parasites et les *fungi*, présentent tous des antigènes de surface glycosylés qui peuvent être liés aux galectines. Diverses infections, comme celles provoquées par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et par *Helicobacter pylori*, tendent également à augmenter l'expression et la sécrétion des galectines, que ce soit dans les cellules du système

immunitaire et certaines cellules épithéliales. À la surface des cellules, les galectines peuvent augmenter les signaux d'activation du système immunitaire, ou encore stabiliser la reconnaissance des antigènes du pathogène par le récepteur de la cellule de l'hôte. C'est ce que suggèrent les études menées par les groupes de Sachiko Sato et Michel J. Tremblay en ce qui a trait à l'infection par le VIH-1. Plus spécifiquement, la galectine-1, de par sa fonction d'adhésion en milieu extracellulaire, permettrait l'accélération de la cinétique de l'attachement du virus à la surface des cellules hôtes, telles que les lymphocytes T et les macrophages (Mercier *et al.*, 2008, Ouellet *et al.*, 2005). De plus, la galectine-1 est fortement exprimée dans les organes réservoirs du VIH, c'est-à-dire le thymus et les ganglions lymphatiques, et est sécrétée par les cellules T cytotoxiques activées. L'implication de cette galectine dans l'infection par le VIH est donc suggérée par ces études. Par ailleurs, l'accélération de cette pathologie est galectine-1 spécifique puisque la galectine-3 est dépourvue d'effet. L'infection par le parasite *Leishmania* implique également les galectines. La reconnaissance des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) spécifiques à ce parasite serait une fonction de la galectine-3 (Sato *et al.*, 2014). De plus, tel un motif moléculaire associé aux dommages (DAMP), la galectine-3 serait impliquée dans la réponse immunitaire innée par le recrutement des neutrophiles, ce qui permet la réduction de la charge parasitaire initiale. La galectine-3 n'est pas un chimioattractant pour les neutrophiles. Par contre, en tant que molécule d'adhésion des neutrophiles, cette galectine peut faciliter la liaison de ces cellules immunitaires à l'endothélium et ainsi, permettre l'extravasation au site d'infection. Bien que l'importance de la galectine-3 dans l'infection par *Leishmania* soit établie, les mécanismes moléculaires des voies PAMP et DAMP devront faire l'objet d'études futures. L'analyse des autres membres de la famille des galectines sera également nécessaire pour cette pathologie puisque bien que la galectine-9 semble être impliquée dans la voie PAMP, la galectine-1 ne se lie pas au parasite.

De nombreuses galectines sont présentes dans le tissu placentaire et certaines sont associées à une grave maladie: la prééclampsie (Blois *et al.*, 2014). Plus précisément, les galectines 1 et 3 sont surexprimées dans la membrane du trophoblaste extravilleux du placenta, lors de cette condition pathologique. À l'inverse, la galectine-13, nommée protéine placentaire 13 (PP13) lors de sa découverte, est régulée à la baisse en présence de prééclampsie. Cette galectine, en condition normale, est exprimée par le syncytiotrophoblaste du tissu placentaire et l'endothélium des capillaires des villosités, en plus d'être relâchée en circulation, où elle aurait une fonction immunorégulatrice (Than *et al.*, 2014). Les mutations du promoteur ou du gène *Igals13*, ce qui pourrait empêcher son expression, sont associées aux pathologies obstétricales, telles que la prééclampsie, suite à une dérégulation du système immunitaire. La diminution de la galectine-13 peut être détectée dans le sang périphérique maternel, ce qui

permettrait de prédire le risque de développer la prééclampsie dès le premier trimestre. En présence d'un gène non muté, le mécanisme proposé est la diminution de la régulation transcriptionnelle de *Igals13* de par l'expression à la baisse du gène *GCM1* qui encode un facteur de transcription pour l'expression de cette galectine. Une étude, chez le rat, démontre la possibilité de traiter les femmes enceintes par l'administration de la PP13 pour prévenir la maladie (Gizurarson *et al.*, 2013). Brièvement, l'injection sous-cutanée de galectine-13, chez des rates en cours de grossesse, a menée à l'hypotension et l'augmentation du rythme cardiaque. De plus, l'analyse *in vitro* d'un traitement PP13 sur l'utérus et les artères mésentériques a démontré son potentiel dilatateur. Par ailleurs, la prise en charge devra être effectuée au premier trimestre puisque la galectine-13 est relâchée au deuxième trimestre, possiblement hors de microvésicules en réponse au stress induit par la prééclampsie. Ce phénomène est dit « toxique » de par la réaction pro-inflammatoire exagérée suite à la relâche d'une grande quantité de PP13 (Than *et al.*, 2014).

Plusieurs études démontrent l'importance de la galectine-3 en tant que biomarqueur de l'insuffisance cardiaque (Filipe *et al.*, 2014). Le mécanisme d'action proposé est la régulation à la hausse de l'expression de la galectine-3 par l'aldostérone ou l'angiotensine II. Cette lectine induit des dommages rénaux, un remodelage cardiaque et vasculaire de par l'induction de sclérose, fibrose et hypertrophie. Bien que la galectine-3 circulante produise ces effets indésirables, sa localisation sanguine implique la possibilité d'utiliser cette protéine comme biomarqueur sérique. Ceci découle de sa valeur prédictive indépendante de la mortalité et de ré-hospitalisation de ces patients atteints d'insuffisance cardiaque. Le test VIDAS® Galectin-3 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) est commercialisé pour cibler, selon le taux de galectine-3 sérique ou plasmatique, les patients à haut risque (McCullough *et al.*, 2011). Cet essai suggère, lorsque la concentration de galectine-3 est supérieure à 17.8 ng/mL, un suivi clinique plus serré, ainsi qu'une prise en charge thérapeutique plus importante. En perspective thérapeutique, les études pré-cliniques sont également encourageantes en ce qui concerne l'inhibition de la galectine-3 pour le traitement de cette maladie (Filipe *et al.*, 2014).

La fibrose est également une pathologie qui implique les galectines. Par contre, le rôle de ces lectines s'avère contradictoire quant à l'évolution de la maladie. La galectine-1 semble être une protéine anti-fibrotique puisqu'elle interfère avec la voie de signalisation TGF β des cellules épithéliales rénales. Plus spécifiquement, la galectine-1 diminue l'expression du gène profibrotique *COL1A2* par l'inhibition de la liaison du facteur de transcription Smad3 à l'ADN (Okano *et al.*, 2008). Ce rôle a également été attribué à la galectine-7 dans les hépatocytes. En fait, l'étude d'Inagaki et ses collègues a permis de démontrer une liaison directe entre Smad3 et la galectine-7, cette dernière impliquée dans l'export nucléaire du facteur de transcription Smad3 (Inagaki *et al.*, 2008). Hors du noyau, Smad3 est dans l'incapacité

d'induire la transcription des gènes pro-fibrotiques. Cet effet anti-fibrotique se produit suite à la stimulation des cellules au facteur de croissance hépatocytaire (HGF). Bien que ces deux galectines possèdent une activité importante pour la prévention de la fibrose rénale et hépatique, la galectine-3 joue un rôle opposé. Cette lectine est impliquée dans la progression de la fibrose hépatique, pulmonaire, cardiaque, vasculaire, ainsi que pour la sclérose systémique (L. C. Li *et al.*, 2014). L'implication de la galectine-3 dans la fibrose débute par sa sécrétion hors des macrophages et des fibroblastes. L'analyse de l'évolution de la fibrose dans le modèle de souris déficiente en galectine-3 a démontré une activation de TGF β atténuée, ainsi que l'expression de gènes pro-fibrotiques, tels que *COL1A1*. Autre que l'induction de la synthèse de matrice extracellulaire, l'inflammation est également augmentée par la galectine-3 puisqu'elle induit la sécrétion de cytokines spécifiques par les macrophages, ce qui favorise la fibrose. Plusieurs inhibiteurs de la galectine-3 permettent la diminution de la fibrose et des essais cliniques sont en cours.

Finalement, la maladie qui est probablement la plus étudiée autant pour l'expression que pour le rôle de tous les membres de la famille des galectines est le cancer.

2.5 Leurs rôles dans le cancer

Les galectines sont connues pour avoir de multiples fonctions pro ou anti-tumorales (Figure 1.17) (Liu *et al.*, 2005, Vladioiu *et al.*, 2014). Voici une description du rôle joué par les galectines dans les différentes étapes de la progression du cancer.

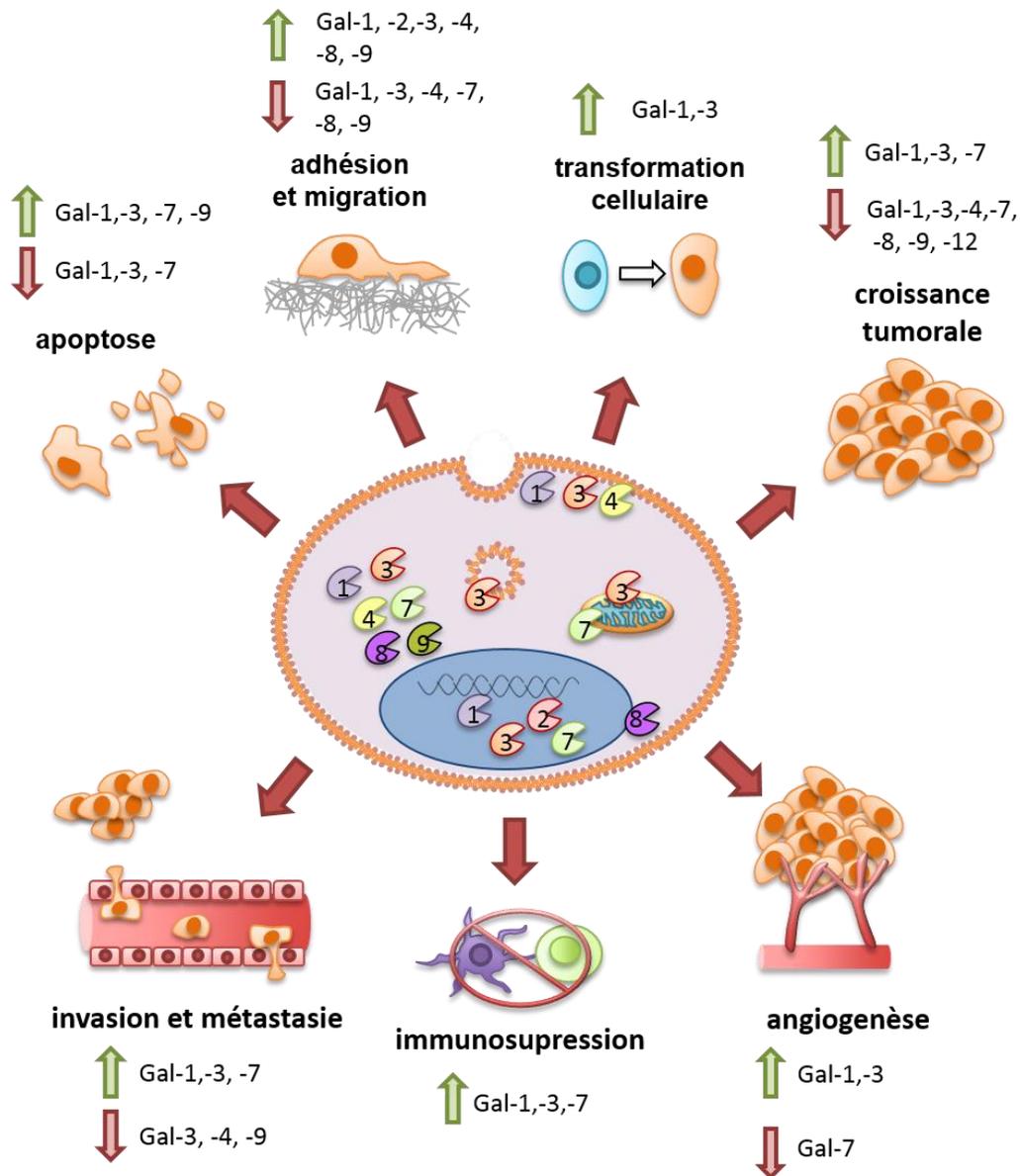


Figure 1.17 Fonctions associées aux galectines dans la progression du cancer. Les différentes étapes où sont impliquées les galectines, dans l'oncologie, sont schématisées. Les flèches indiquent si ces protéines augmentent (flèche verte vers le haut) ou inhibent (flèche rouge vers le bas) le processus spécifié. La localisation intracellulaire, lorsque connue, est également schématisée pour chacune des galectines dans la cellule, au centre de la figure: membranaire, cytosolique, mitochondriale, nucléaire, péri-nucléaire et endosomale. Modifié de (Vladioiu *et al.*, 2014)

2.5.1 Transformation cellulaire

La transformation cellulaire est la première étape dans le développement du cancer. La dérégulation des gènes, à la hausse pour les pro-oncogènes et à la baisse pour les gènes suppresseurs de tumeurs, est l'étape critique de ce processus. L'activation de différentes protéines induit la transformation cellulaire; c'est le cas des protéines RAS GTPases, plus communément appelés H-RAS, K-RAS et N-RAS (Karnoub *et al.*, 2008). Le principe d'activation des RAS GTPases est, dans un premier temps, l'ancrage des formes cytosoliques au côté intracellulaire de la membrane cellulaire. Cette relocalisation permettra de changer la conformation et activer la forme active de RAS-GDP en RAS-GTP suite à la dimérisation de récepteurs membranaires de type tyrosine kinase. La forme active de RAS induit plusieurs cascades de signalisation intracellulaire qui mènent éventuellement à la transformation des cellules.

La première étape cruciale pour l'activation des protéines RAS GTPases nécessite la liaison d'autres protéines, dont la galectine-1 (Paz *et al.*, 2001). En fait, la liaison directe entre la galectine-1 et H-RAS à la membrane cellulaire interne serait essentielle pour l'activation spécifique de la voie ERK, responsable de la transformation cellulaire. Les auteurs proposent que la galectine-1 stabilise l'ancrage de RAS-GTP à la membrane pour initier l'activation de la cascade de signalisation. Une autre étude de ce groupe a permis de confirmer cette hypothèse puisque la galectine-1 a une plus grande affinité pour RAS-GTP que pour RAS-GDP, en plus d'augmenter et de prolonger la signalisation cellulaire médiée par les RAS GTPases (Elad-Sfadia *et al.*, 2002). L'effecteur de RAS, Raf1, est celui qui serait activé lors de la liaison de la galectine-1, en plus d'être en amont de la voie ERK. Le même groupe a ultérieurement démontré que la galectine-3 se lie aussi de façon préférentielle à la forme active de K-RAS, en plus de prolonger et d'augmenter la signalisation cellulaire induite par RAS (Elad-Sfadia *et al.*, 2004). Dans ce cas-ci toutefois, la voie activée suite à l'interaction entre les deux protéines est la voie de PI3K, et ce de façon concomitante à l'inhibition de la voie ERK. Par contre, l'activité de l'effecteur de RAS, Raf1, peut également être augmentée. D'autres expériences ont permis à Shalom-Feuerstein et ses collègues de proposer un modèle: la galectine-3 possède deux domaines distincts pour la modulation des protéines RAS GTPases, 1) le domaine C-terminal se lie à K-RAS, ce qui augmente son activation; 2) le domaine N-terminal interagit avec RASGRP4 pour inhiber les voies associées à N-RAS et H-RAS (Shalom-Feuerstein *et al.*, 2008). Bien qu'il y ait certaines différences dans l'interaction entre les galectines 1 et 3 et les protéines RAS-GTPases, ces études démontrent bien l'importance de ces deux familles, RAS et galectines, dans la promotion de la transformation cellulaire.

2.5.2 Régulation du cycle cellulaire

Les premiers indices de l'implication d'une galectine dans la régulation du cycle cellulaire ont été découverts dans le cancer du sein. En fait, la galectine-3 a été étudiée par le groupe d'Avraham Raz qui cherchait à comprendre son rôle dans la mort programmée induite par le détachement des cellules, ce que l'on nomme anoïkis (H. R. Kim *et al.*, 1999). Selon leurs résultats, la galectine-3 serait responsable de la régulation de certaines cyclines et de leurs inhibiteurs, c'est-à-dire la diminution des cyclines E et A et l'augmentation de p21 et p27, ce qui a pour effet l'arrêt en phase G1. Ce mécanisme permet ainsi la survie des cellules lors d'une perte d'adhésion. Puisque l'on retrouve la galectine-3 dans le compartiment nucléaire, Lin et ses collègues se sont interrogés sur la possibilité que cette protéine ait un rôle dans la transcription des gènes de la transition cellulaire (Lin *et al.*, 2002). Leurs expériences, également sur une lignée de cellules du cancer du sein, illustrent une fonction pour la galectine-3 dans l'activation du promoteur de la cycline D1. Plus précisément, cette protéine semble stabiliser le complexe transcriptionnel au site du facteur de transcription CREB pour réguler à la hausse l'expression de la cycline D1. Ce phénomène pourrait avoir comme conséquence la prolifération des cellules tumorales où l'on observe la localisation nucléaire de la galectine-3. Le second mécanisme d'action proposé est l'activation de la voie Wnt par un complexe protéique comprenant la galectine-3, la β -caténine et Tcf-4, ce qui aurait pour effet d'augmenter la régulation du gène CCND1 (Shimura *et al.*, 2004). Toutes ces études démontrent bien un rôle critique de la galectine-3 dans la régulation du cycle cellulaire des cellules tumorales puisqu'il implique les cyclines et leurs inhibiteurs, protéines centrales de la transition des différentes phases. Peu d'études se sont toutefois focalisées sur les autres galectines et leur possibilité à moduler le cycle cellulaire. Nous savons néanmoins que la galectine-1 peut également induire l'arrêt en phase G1. C'est ce qu'a découvert le groupe de Stefan Rosewicz dans plusieurs lignées de cellules tumorales (Fischer *et al.*, 2005). Tout comme la galectine-3, la galectine-1 augmente l'expression de p21 et p27, ce qui diminue la croissance cellulaire en bloquant la phase G1. Par contre, son effet est extracellulaire puisque dû à son attachement sur les sucres de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. L'augmentation de la transactivation des facteurs de transcription Sp1 et Sp3, ainsi que l'inhibition de la voie Ras-MEK-ERK par la galectine-1 extracellulaire sont les mécanismes suggérés. Plus récemment, Satelli et ses collègues ont investigué le rôle de la galectine-4 dans le cancer du côlon (Satelli *et al.*, 2011). La régulation à la baisse de cette protéine dans la progression tumorale du côlon suggère un rôle anti-tumoral. Des études fonctionnelles *in vitro* ont permis d'attribuer à la galectine-4 une fonction modulatrice du cycle cellulaire. En fait, lorsque surexprimée dans les lignées cellulaires du cancer du côlon, la galectine-4 induit l'arrêt en phase G2/M. L'augmentation de p21 et p15, ainsi que la diminution de la cycline D1 pourraient en être la cause. De plus, la

galectine-4 interagit avec les protéines β -caténine, APC et axine, complexe qui mène à la dégradation de la β -caténine, ce qui empêche la signalisation de la voie Wnt. Rappelons que l'activation de cette voie de signalisation intracellulaire augmente la transcription du gène *CCND1*. La régulation du cycle cellulaire par la galectine-4 pourrait être attribuée à la baisse de son expression dans l'adénome et le carcinome colorectal.

2.5.3 Processus apoptotique

L'inhibition de l'apoptose par les cellules tumorales est une étape incontournable dans la progression du cancer. De toutes les fonctions intracellulaires attribuées à la galectine-3, l'inhibition de la mort cellulaire programmée est la plus détaillée (Nakahara *et al.*, 2005). L'apoptose est un processus que la cellule cancéreuse doit contrer, particulièrement suite aux traitements chimiothérapeutiques et de radiothérapie. Pour y arriver, les protéines ayant la propriété d'inhiber la mort cellulaire seront régulées à la hausse ou localisées de manière à permettre leurs activités. La galectine-3 fait partie de ces protéines de par diverses actions intracellulaires. D'une part, sa structure comporte des éléments ayant une similitude indéniable à certains membres de la famille Bcl-2. C'est le cas de la séquence d'acides aminés NWGR de la galectine-3 et qui serait responsable de sa capacité d'interagir avec la protéine Bcl-2. Cette séquence est retrouvée dans le domaine BH1 de la famille Bcl-2 et confère l'activité anti-apoptotique caractéristique de ce groupe de protéines. La formation d'hétérodimères entre les différents membres de cette famille est observée et le motif NWGR permettrait donc ce regroupement entre la galectine-3 et Bcl-2 (R. Y. Yang *et al.*, 1996). Puisque cette courte séquence se retrouve à proximité des acides aminés responsables de l'attachement des sucres à la galectine-3, cette interaction est CRD-dépendante. Plus encore, la substitution de la glycine pour une alanine de ce motif anti-mort inhibe, à elle seule, l'activité anti-apoptotique de la galectine-3 dans les cellules du cancer du sein humain, BT-549, en présence de cisplatine (Akahani *et al.*, 1997). Il est donc logique de croire que la localisation subcellulaire de la galectine-3 est primordiale pour lui permettre d'inhiber l'apoptose via Bcl-2. Le groupe de Hyeong-Reh Choi Kim a étudié le transport intracellulaire de la galectine-3 en présence de stimuli apoptotiques (Yu *et al.*, 2002). Les auteurs de l'étude ont observé une accumulation de la protéine à la membrane périnucléaire, plus précisément dans l'organelle indispensable au processus de la mort cellulaire programmée: la mitochondrie. Cette accumulation de la galectine-3 prévient les dommages aux mitochondries et la relâche du cytochrome c, qui induirait l'apoptose. La synexine, aussi connue sous le nom d'annexine VII, serait responsable de la liaison de la galectine-3 et de sa translocation à la mitochondrie. Le transport nucléocytoplasmique est tout aussi important en ce qui a trait aux fonctions protectrices de la galectine-3. Yoshii et ses collègues ont pu déterminer qu'une modification post-traductionnelle

était impliquée dans l'activité anti-apoptotique de la galectine-3 (Yoshii *et al.*, 2002). Plus précisément, la phosphorylation de la sérine 6, par la caséine kinase I, est nécessaire à cette activité puisque la substitution de cet acide aminé par une alanine ou un acide glutamique empêche la chimiorésistance, ainsi que la protection contre l'anoïkis. Ce groupe a ensuite démontré que cette phosphorylation est également responsable de la translocation de la galectine-3 du noyau vers le cytoplasme (Takenaka *et al.*, 2004). La séquestration nucléaire de ce membre de la famille des galectines empêche l'induction d'une chimiorésistance. Ces différentes études mettent en évidence le fait que la distribution subcellulaire de la galectine-3 est au cœur même de sa fonction protectrice qui, du fait même, est pro-tumorale.

La galectine-7 peut, quant à elle, être pro ou anti-apoptotique. Ce rôle bivalent, anti et pro-tumoral, est caractéristique de cette protéine. Le type cellulaire d'origine du cancer définit si la galectine-7 est bénéfique, par exemple en induisant la mort des cellules cancéreuses de la prostate (Labrie *et al.*, 2015). Elle peut également favoriser la progression et l'agressivité du cancer, par exemple en augmentant le potentiel métastatique et en inhibant l'apoptose dans le cancer du sein (Demers *et al.*, 2010). Les mécanismes moléculaires spécifiques qui permettent la modulation de l'apoptose par la galectine-7 doivent faire l'objet d'études subséquentes.

2.5.4 Adhésion cellulaire et matricielle

L'adhésion entre les cellules cancéreuses doit être maintenue pour permettre leur survie lorsque la maladie est encore à un stade précoce. De par leur capacité à relier des récepteurs aux cellules adjacentes, les galectines favorisent cette agrégation cellulaire. La liaison des galectines 1 et 3 à la glycoprotéine 90K a mis en évidence cette action extracellulaire (Tinari *et al.*, 2001). Fait intéressant, la liaison de chacune de ces galectines ne se situe pas au même endroit sur la glycoprotéine 90K et est donc non compétitive. La synergie de ces deux lectines serait alors possible et ne ferait qu'augmenter le potentiel d'adhésion cellulaire. Cette interaction, nommée homotypique, donnerait lieu au rapprochement des cellules cancéreuses de par l'expression à la surface des cellules de la glycoprotéine 90K et de la présence, dans le milieu extracellulaire, des galectines. La galectine-4 montre également ce potentiel d'adhésion entre cellules du cancer pancréatique (Belo *et al.*, 2013). L'expression de cette lectine est beaucoup plus élevée dans les cellules tumorales différenciées et plus précisément aux sites de contact cellule-cellule, suite à sa sécrétion à la surface des cellules. Le potentiel migratoire des cellules du cancer pancréatique est d'ailleurs diminué par la présence de la galectine-4 et de son action d'adhésion.

En présence d'un cancer plus avancé, les cellules ont un phénotype de plus en plus indifférencié. L'adhésion intercellulaire auparavant indispensable à leur survie disparaît. De plus l'adhésion matricielle doit également s'atténuer pour que les cellules puissent migrer vers les vaisseaux, puis essaimer à distance. Cette perte d'adhésion implique la galectine-9 dans le cas du cancer du côlon et du mélanome (Nobumoto *et al.*, 2008). La galectine-9 a la capacité de lier CD44, empêchant ainsi la liaison de cette glycoprotéine de surface à l'acide hyaluronique, composant majeur du stroma péri-tumoral. Cette étude a également démontré ce mécanisme de la galectine-9 entre VLA-4, à la surface des cellules cancéreuses, et VCAM-1, molécule d'adhésion présente à la surface de l'endothélium vasculaire. Cette inhibition d'adhésion entre les cellules tumorales et la matrice extracellulaire, dans cette étude, résulte en l'absence d'un potentiel de migration, essentiel pour la dissémination du cancer. Suite au détachement des cellules tumorales, la récupération de l'adhésion intercellulaire est essentielle à la progression métastatique. Contrairement à l'agrégation des cellules tumorales entre-elles qui implique une liaison homotypique, ces cellules pourront s'attacher aux cellules endothéliales par interaction hétérotypique. C'est ce que l'équipe de Vincent Castronovo a constaté dans le cancer de la prostate où l'expression de galectine-1 par les capillaires est beaucoup plus élevée lorsqu'ils sont à l'intérieur de la tumeur (Claude *et al.*, 1999). L'étude de Barrow et ses collègues a permis d'élargir l'éventail des galectines possédant cette caractéristique (Barrow *et al.*, 2011). Leurs résultats démontrent que les galectines-2, 4 et 8 augmentent l'adhésion entre cellules tumorales et endothéliales. Ces données font suite à l'observation d'une hausse de la présence sérique de ces galectines chez des patients atteints d'un cancer du côlon ou du sein. Pour qu'il y ait promotion de ce mécanisme d'action pro-métastatique, l'angiogenèse au sein de la tumeur est indispensable.

2.5.5 Angiogenèse tumorale

Lors de la croissance tumorale, l'apport nutritionnel et en oxygène est nécessaire. Le processus d'angiogenèse, c'est-à-dire la production de nouveaux vaisseaux sanguins, est alors enclenché par les cellules cancéreuses. Ces vaisseaux à proximité de la tumeur facilitent également le transport des cellules à distance du foyer primaire.

La première étude qui démontre que les galectines sont impliquées dans la néovascularisation s'est focalisée sur la galectine-3 (Nangia-Makker *et al.*, 2000). Leur objectif d'étude découlait de leurs dernières expériences qui démontrent que le seul fait de transférer un vecteur codant pour la galectine-3 dans une lignée de cellules cancéreuses du sein, BT-549, permet la propagation de ces cellules dans un modèle murin (Nangiamakker *et al.*, 1995). Pour

déterminer si la progression métastatique découlait d'un rôle pour la galectine-3 dans l'angiogenèse tumorale, ce groupe a étudié le phénomène *in vitro* et *in vivo*. Leurs résultats démontrent que la galectine-3 sécrétée par des cellules du cancer du sein induit la motilité et l'organisation des cellules endothéliales de façon CRD-dépendante, par chimiotaxie. De plus, l'analyse des xénogreffes révèle qu'il y a un plus grand nombre de capillaires intra-tumoraux lorsque les cellules tumorales expriment la galectine-3 de façon ectopique.

La galectine-1 est également associée au processus d'angiogenèse. Thijssen et ses collègues l'ont démontré dans plusieurs modèles (Thijssen *et al.*, 2006). D'abord, la galectine-1 a été identifiée en tant que protéine cible d'un peptide angiostatique, anginex. Sa surexpression dans les cellules endothéliales tumorales, ainsi que son rôle dans la prolifération et la migration de ces cellules ont porté l'étude vers des modèles *in vivo*. L'étude de la galectine-1 chez le poisson zébré a permis d'identifier son rôle dans le prolongement des vaisseaux sanguins, ainsi que dans la formation du réseau vasculaire. L'utilisation de souris génétiquement modifiées galectine-1-déficientes a donné des résultats sur l'importance de cette protéine sécrétée par l'hôte puisque la croissance tumorale de cellules injectées y est inhibée. De plus, la densité capillaire intra-tumorale est beaucoup plus faible chez les souris galectine-1-déficientes. Fait intéressant, le peptide anginex qui induit une diminution de la croissance et de l'angiogenèse tumorale n'a aucun effet sur les tumeurs de souris galectine-1-déficientes. À l'opposé des galectines 1 et 3, la galectine-7, dans le cancer côlon, semble anti-angiogénique (Ueda *et al.*, 2004). L'injection de cellules d'un carcinome colorectal exprimant la galectine-7 de façon ectopique, dans un modèle murin, a permis d'observer le rôle anti-tumoral de la galectine-7. Plus précisément, l'analyse de ces xénogreffes démontre une diminution de la croissance de ces tumeurs par cette protéine. Cet impact pourrait être associé à une inhibition de la néovascularisation puisque le nombre de vaisseaux sanguins intra-tumoraux y est beaucoup plus faible.

2.5.6 Évasion du système immunitaire

Sans contredit, la galectine-1 est le membre le plus étudié de sa famille pour sa capacité d'immunosuppression. L'étude de Perillo et ses collègues est la première à lui avoir attribué ce rôle (Perillo *et al.*, 1995). Ils ont montré que la galectine-1 peut se lier, de façon CRD-dépendante, au récepteur CD45 des cellules T et ainsi, induire l'apoptose. Quelques années plus tard, le groupe de Gabriel Rabinovich a su lier cette destruction du système immunitaire et le potentiel pro-tumoral, plus précisément pour le mélanome (Rubinstein *et al.*, 2004). L'utilisation d'un modèle murin a permis de montrer le rôle majeur de la galectine-1 puisque le seul fait de l'inhiber entraîne le rejet de la tumeur. De plus, une réponse de type T1 tumeur-

spécifique y est alors observée. Bien que nous connaissions l'importance des lymphocytes T dans la réponse immunitaire anti-tumorale, une étude récente démontre bien la surveillance immunitaire de cellules tueuses naturelles, plus communément appelées cellules NK (Baker *et al.*, 2014). En fait, Baker et ses collègues ont démontré le rôle immunosuppresseur de la galectine-1 dans le cancer du cerveau puisque son absence permet la lyse des cellules de gliomes par les cellules NK, suite à la relâche de granzyme B, et ce, avant le début de la réponse immunitaire par les lymphocytes T.

D'autres membres de la famille des galectines semblent également avoir le potentiel d'immunosuppression. C'est le cas de la galectine-3 qui induit la mort des cellules T. Telle que pour la galectine-1, la galectine-3, une fois sécrétée, peut s'attacher à la surface des lymphocytes T de façon CRD-dépendante et ainsi, d'en déclencher l'apoptose (Fukumori *et al.*, 2003). Dans ce cas, les récepteurs impliqués sont CD7 et CD29 et non CD45. Peng et ses collègues ont confirmé ce mécanisme d'évasion du système immunitaire dans un modèle de souris déficientes en lymphocytes (Peng *et al.*, 2008). Plus précisément, une injection simultanée de cellules de mélanomes et de cellules T CD8⁺, réactives aux cellules de mélanomes, a été suivie d'une dose de galectine-3. Les résultats démontrent l'immunosuppression en présence de galectine-3, ce qui a pour effet d'augmenter la croissance tumorale.

De par des études *in vitro*, d'autres galectines ont été mises en évidence pour leur capacité à induire l'apoptose des cellules T. C'est le cas des galectine-2 (Sturm *et al.*, 2004), galectine-7 (Labrie *et al.*, 2014) et galectine-9 (Kashio *et al.*, 2003). Pour celles-ci, des études *in vivo* seront nécessaires pour déterminer leur potentiel pro-tumoral dans l'évasion du système immunitaire.

En résumé, les différentes étapes de la cascade métastatique impliquent un ou, en général, plusieurs membres de la famille des galectines. Leur importance dans les différentes maladies, principalement dans le cancer, est significative et c'est pourquoi leur utilisation en tant que biomarqueur fait l'objet de recherches actives. De plus, quelques inhibiteurs de galectines ont été conçus, en voici les avancées.

2.6 Leur rôle comme biomarqueurs

L'expression génique peut être évaluée par puces à ADN. Dans les analyses à grande échelle de l'ARNm de carcinomes mammaires et d'adénocarcinomes canaux pancréatiques, l'expression des membres de la famille des galectines est affectée à la hausse ou à la baisse

(Grutzmann *et al.*, 2004, Perou *et al.*, 2000). L'utilisation des profils génomiques dans les études fait cependant face à certaines limites, comme: 1) la contamination des échantillons avec du tissu normal, ce qui peut biaiser les résultats dans le cas où les cellules saines expriment fortement la galectine évaluée; 2) la difficulté d'évaluer individuellement les différents types de cellules qui composent un tissu (stromales vs épithéliales); et 3) la non distinction de la localisation dans les compartiments intracellulaires. Ces problèmes peuvent être contournés par la visualisation des protéines lors d'un marquage immunohistochimique.

L'intérêt de plus en plus important pour les galectines a permis de commercialiser des anticorps spécifiques pour chacune. La valeur diagnostique de la galectine-3, dans le cancer de la thyroïde, démontre bien le potentiel de cette famille en tant que biomarqueurs révélés par immunohistochimie (Chiu *et al.*, 2010). L'expression de la galectine-3 n'est retrouvée que dans les lésions malignes de la thyroïde et non lorsque la tumeur est bénigne. La conclusion est que la révélation de la galectine-3 est un outil diagnostique complémentaire lorsque le médecin doit prendre la décision quant à la nécessité d'opérer un patient qui présente une prolifération dans le tissu thyroïdien. De plus, un consensus multicentrique pour l'évaluation de l'expression de la galectine-3 en immunohistochimie a été instauré (Bartolazzi *et al.*, 2008).

Le potentiel de cette famille de lectines en tant que biomarqueurs ne se limite pas simplement à leur détection protéique dans la tumeur. Plusieurs études démontrent la présence des différents membres de la famille des galectines dans le sérum. Plus intéressant encore, leur présence est augmentée chez les patients atteints d'un cancer. Une importante étude, menée par le groupe de Stefano Iacobelli, a permis de constater que la galectine-3 en circulation est associée à un large spectre de cancers (Iurisci *et al.*, 2000). Cette équipe a développé un essai d'immuno-ligand pour quantifier la galectine-3 sérique. Son augmentation a été observée chez les patients atteints d'un cancer du sein, gastro-intestinal (comprenant les carcinomes gastriques, colorectaux, pancréatiques, cholangiocellulaires et hépatocellulaires), du poumon, de l'ovaire, d'un mélanome et d'un lymphome non hodgkinien, en comparaison aux patients sains. L'étude de Yu et son équipe consistait à évaluer plusieurs galectines. Plus précisément, l'expression de six galectines dans le sérum: galectine-1, 2, 3, 4, 8 et 9 (Barrow *et al.*, 2011). L'augmentation des galectines 2, 3, 4 et 8 a été observée lors de la comparaison du sérum de patients sains et ceux atteints d'un cancer colorectal ou du sein. De manière encore plus intéressante, la présence d'un cancer du côlon métastatique augmente davantage la présence sérique des galectines 2, 3, 4 et 8. Plus récemment, l'équipe de L-G Yu a voulu déterminer l'impact de la circulation sanguine des galectines 2, 4 et 8 (C. Chen *et al.*, 2014). Il s'est avéré que la présence de ces galectines permet la sécrétion de cytokines et chimiokines par les vaisseaux sanguins. Cette observation, à la base *in vitro*, puis dans un modèle murin, a été confirmée par l'association de l'augmentation des galectines et de G-CSF, IL-6 et MCP1/CCL2

dans le sérum de patients atteints d'un cancer du sein ou du côlon. Ce mécanisme d'action permet alors une cascade d'évènements: exposition des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales, adhésion des cellules tumorales aux cellules endothéliales, augmentation de la formation du système vasculaire. Le développement d'essais pour déterminer si une ou plusieurs galectines peuvent être considérées comme marqueurs tumoraux permettra d'augmenter les outils diagnostiques dans les hôpitaux. D'autant plus qu'une prise de sang est une technique beaucoup moins invasive qu'une biopsie ou une chirurgie pour analyser l'expression tumorale d'une protéine.

2.7 Leur potentiel thérapeutique

La génération de souris qui n'expriment pas la galectine-1, 3 ou 7 a permis de constater qu'un organisme est viable et ne présente que quelques anomalies en présence de blessures en l'absence d'un membre de cette famille de lectines (Advedissian *et al.*, 2015). Ceci encourage fortement le développement de thérapies pour contrer l'activité des galectines.

La MCP (*modified citrus pectin*) est un complexe soluble de polysaccharides dénaturés isolés à partir de la pelure et la pulpe d'agrumes (Glinsky *et al.*, 2009). Sa forte teneur en β -galactose serait responsable de son effet thérapeutique. GCS-100 (La Jolla Pharmaceutical, San Diego, CA) est une molécule MCP qui est maintenant en essai clinique de phase 2b pour le traitement de maladies rénales chroniques avancées chez les personnes atteintes du diabète. L'inhibition de la galectine-3, pro-fibrotique, par le GCS-100 induit l'augmentation de la fonction rénale. Le mécanisme par lequel la galectine-3 sécrétée par les macrophages induit la fibrose semble être dû par l'activation des fibroblastes (Henderson *et al.*, 2008). Tel que démontré par différentes études, le GCS-100, de par le blocage de la galectine-3, est également anti-tumoral (Chauhan *et al.*, 2005, Streetly *et al.*, 2010). Cette molécule induit, *in vitro*, l'apoptose de cellules de myélomes multiples chimiorésistants. Le GCS-100, ainsi que son homologue GBC-590 (SafeScience Inc.), sont maintenant en essai clinique de phase II pour la leucémie et certaines tumeurs solides, telles que le cancer de la prostate et du pancréas. D'autres composés de polysaccharides, tels que GM-CT-01 (galactomannan) et GR-MD-02 (galactoarabino-rhamnogalaturonan) ont été produits par la compagnie Galectin Therapeutics Inc. (Norcross, GA). Leurs études indiquent que ces molécules inhibitrices de la galectine-3 ont le potentiel de renverser la fibrose hépatique (Traber *et al.*, 2013a, Traber *et al.*, 2013b). Le GM-CT-01, aussi connu sous le nom de Davanat®, a également démontré, lors d'études précliniques et cliniques de phase I et II, son potentiel anti-tumoral lorsque combiné à la chimiothérapie (Klyosov *et al.*, 2012).

TD139 est une petite molécule dérivée de sucres qui inhibe la poche du CRD de la galectine-3 (Mackinnon *et al.*, 2012). Il a été récemment approuvé pour le traitement de la fibrose pulmonaire. Fait intéressant, son administration se fait par inhalation, ce qui rend le traitement plus efficace puisqu'il est appliqué en direction de l'organe cible, le poumon. Puisque les études pré-cliniques, ainsi que l'essai de phase I sont concluants, la compagnie Galecto Biotech AB amorce un essai clinique de phase II. Le mécanisme d'action proposé est que l'inhibition de la galectine-3 empêche l'activation de la β -caténine, important médiateur de la fibrose.

Bien que les galectines par définition sont capables de se lier au β -galactose, leur structure comporte également des séquences impliquées dans d'autres types d'interactions, tels que protéine-protéine. Le peptide anginex est un inhibiteur de l'angiogenèse qui cible les cellules endothéliales. Thijssen et ses collègues ont découvert un récepteur, à la surface des cellules, pouvant lier anginex: la galectine-1 (Thijssen *et al.*, 2006). Il s'est avéré que cette interaction inhibe les diverses conséquences angiogéniques de la galectine-1, telles que la croissance tumorale et l'augmentation de la densité vasculaire. Pour en améliorer les propriétés en tant que médicament, un composé non-peptidique, dérivé d'anginex, a été développé: OTX008, aussi connu sous le nom de 0118 et PTX-008 (OncoEthix, Lausanne, Suisse). Ce composé calixarène se démarque des autres thérapies ciblant les galectines de par sa liaison à la région opposée au CRD de la galectine-1 (Dings *et al.*, 2012). Son action antiproliférative sur les cellules tumorales est observée *in vitro* et *in vivo*, ainsi qu'à de plus faibles concentrations qu'anginex (Astorgues-Xerri *et al.*, 2014). Une combinaison d'OTX008 et d'agents chimiothérapeutiques augmentent les effets antiprolifératifs *in vitro* et est également observé lorsque combiné aux inhibiteurs de récepteurs à activité tyrosine kinase. Astorgues-Xerri et ses collègues indiquent que cet effet synergique est à prendre en considération pour les essais cliniques à venir (essai clinique de phase I en cours).

La détermination des galectines à cibler selon le type de cancer sera cruciale. Une thérapie très sélective d'une ou plusieurs galectines permettra d'empêcher les effets compensatoires et d'augmenter l'activité des galectines anti-tumorales qui ne seront pas ciblées. De par les nombreuses études démontrant de plus en plus l'implication des galectines dans le compartiment intracellulaire dans le cas d'une activité pro-tumorale, il sera aussi important de ne pas seulement s'attaquer aux galectines extracellulaires, ce qui est le cas pour l'instant.

3. LA GALECTINE-7

3.1 Découverte

À la recherche de protéines responsables du maintien du phénotype normal des kératinocytes, Madsen et ses collègues ont découvert la galectine-7 (Madsen *et al.*, 1995). Ils ont procédé à son clonage, à l'analyse de son expression intra et extracellulaire, ainsi qu'à sa localisation sur le chromosome 19. Cette protéine a été associée à la famille des galectines puisqu'elle lie le lactose et contient les acides aminés précis qui lui permettent d'interagir avec les β -galactosides. Ces critères ayant été précédemment établis pour les galectines 1, 2, 3 et 4 (Barondes *et al.*, 1994a, Barondes *et al.*, 1994b). Par la suite, l'équipe de Michel Darmon a su déterminer la localisation de la galectine-7, en ARNm, dans les kératinocytes indifférenciés et pour tous les stades de différenciation (Magnaldo *et al.*, 1995). Quant à la régulation de son expression, ils ont observé que l'acide rétinoïque pourrait jouer un rôle à titre de répresseur du gène *galectine-7*. Quelques années après sa découverte, une première fonction pour la galectine-7 dans les kératinocytes a été décrite (Bernerd *et al.*, 1999). Son expression augmentée, suite à l'exposition des cellules aux rayons ultraviolets, serait associée au maintien de l'homéostasie de l'épiderme de par son rôle dans l'apoptose. La stabilisation de p53, ainsi que le processus apoptotique enclenché des kératinocytes où la galectine-7 est retrouvée suggère une fonction dans la mort cellulaire suite à une exposition au soleil.

Elle est maintenant reconnue pour sa spécificité tissulaire, c'est-à-dire principalement retrouvée dans les épithéliums stratifiés (St-Pierre *et al.*, 2012). Nous parlons bien entendu de l'expression de la galectine-7 dans l'épiderme, mais également dans l'œsophage, l'anus, la muqueuse orale, l'hypopharynx, les glandes salivaires, les glandes sébacées, la glande mammaire, la vulve, le vagin, le col de l'utérus, la vessie et l'urètre. L'analyse de son expression dans les épithéliums simples et pseudostratifiés a révélé la présence de la galectine-7 dans l'ovaire, l'estomac, le côlon, la trachée, le larynx, les artères, la cornée et le thymus (Tableau I de l'annexe I).

3.2 Structure

Dans la famille des galectines, la galectine-7 fait partie de la classe des prototypes. Elle est composée d'un seul domaine de reconnaissance des glucides (CRD). Suite à sa dimérisation en solution, cette petite protéine de 15 kDa doublera en masse moléculaire, en plus d'acquérir

un deuxième CRD. Cette modification se fait par l'interaction des acides aminés des deux protéines du côté opposé du CRD, ce qui permet la conservation de la liaison aux glucides en même temps que la dimérisation (Figure 1.18) (Leonidas *et al.*, 1998).

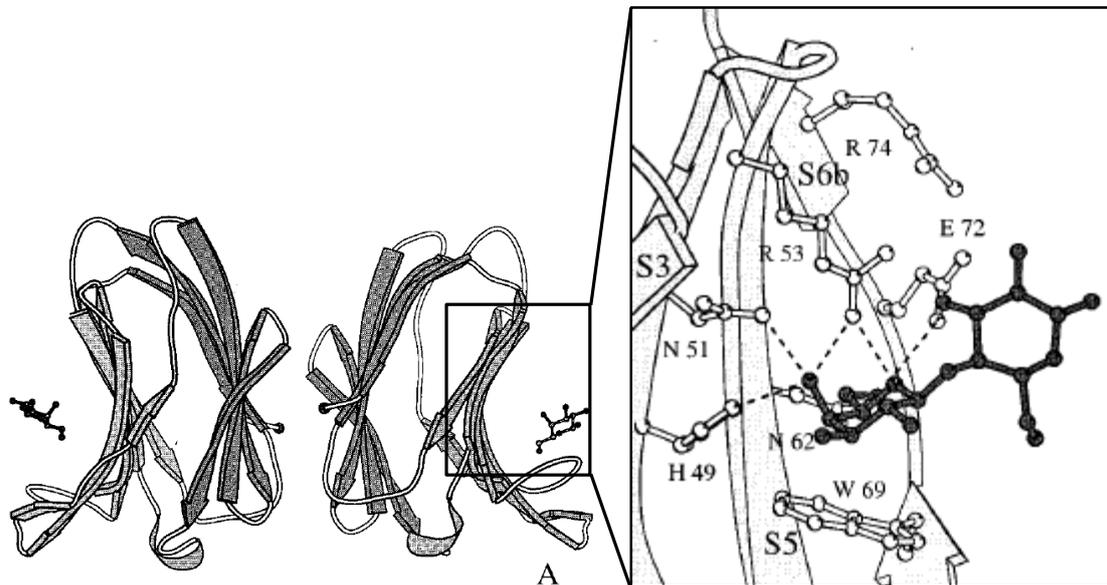


Figure 1.18 Structure de la galectine-7. L'analyse par cristallographie de la galectine-7 montre sa dimérisation (image de gauche), ainsi que les 7 résidus responsables de la liaison au lactose (encadré de droite). Modifié de (Leonidas *et al.*, 1998)

Plus précisément, le CRD de la galectine-7 se compose de 7 acides aminés qui sont responsables de la liaison aux sucres, tels que le lactose: H49, N51, R53, N62, W69, E72 et R74 (Figure 1.18). (Leonidas *et al.*, 1998). Ces résidus spécifiques créent une poche par interaction ionique entre-eux et séquestrent le sucre par liaison hydrogène. Toutes ces caractéristiques définissent la galectine-7 comme étant une protéine très dynamique de par son homodimérisation, ainsi que par la liaison de ses ligands. Ces premières données structurales sur la galectine-7, par cristallographie, furent comparées au cristal des autres membres de la famille des galectines. Cette analyse a révélé que le repliement de la galectine-7 est similaire aux galectines 1 et 2. Par ailleurs, la galectine-10 partage davantage de points communs structuraux avec la galectine-7. Lorsqu'en dimère, le cristal de la galectine-7 se différencie du cristal des galectines 1 et 2. Dans la poursuite de la caractérisation dimérique de la galectine-7, le groupe de Hans-Joachim Gabius a utilisé la spectrométrie de masse (Kopitz *et al.*, 2003). Cette étude a d'abord confirmé la conformation prédominante sous forme de dimères pour la galectine-1 et monomérique pour la galectine-3. Lors de l'analyse de la galectine-7, il s'est avéré qu'elle se comporte comme la galectine-1: majoritairement en homodimères. Les groupes de Gabius et Mayo ont voulu déterminer les propriétés structurales et dynamiques de cette protéine (BioMagRes-Bank numéro 17826) (Nesmelova *et al.*, 2012).

monomérique à de plus faibles concentrations. Cette étude démontre l'importance de la forme dimérique de la galectine-7 puisque renforcée lorsque le site actif, le CRD, est sollicité. Ce groupe a, par ailleurs, démontré des différences pour la galectine-1. Plus précisément, la liaison d'un ligand par le premier monomère diminue la capacité du deuxième monomère à lier un ligand, ce qu'ils ont nommé coopération négative (Nesmelova *et al.*, 2010). À l'inverse, la coopération positive a été observée pour la galectine-7. Bien que la structure générale des galectines soit très similaire, les régions distinctes entre les différents membres de cette famille de lectines semblent au cœur de leur individualité.

3.3 Fonctions

Puisque la galectine-7 se retrouve dans les différents épithéliums, une fonction spécifique, la cicatrisation, a été étudiée. Le groupe de Noorjahan Panjwani s'est intéressé à la fonction extracellulaire de la galectine-7 en présence d'une plaie en cicatrisation dans la cornée (Cao *et al.*, 2002, Cao *et al.*, 2003). Brièvement, ils ont démontré que l'ajout de galectine-7 recombinante permet d'accélérer la réépithélialisation de la cornée de souris de type sauvage et déficientes en galectine-3. La diminution du potentiel de réparation de l'épiderme par la perte de galectine-3 est compensée par l'expression de galectine-7 qui est régulée à la hausse. Tel qu'attendu, ce processus est inhibé par le lactose, ce qui suggère l'attachement des galectines aux glycanes des récepteurs à la surface des cellules.

La génération de souris déficiente en galectine-7 (KO) a permis de comprendre les fonctions de cette protéine dans un modèle vivant (Gendronneau *et al.*, 2008). L'équipe de Françoise Poirier s'est penché plus spécifiquement sur le rôle de la galectine-7 dans l'épiderme où son abondance a déjà été établie. Le constat de souris viables et qui ne présentent pas de défauts de structure ni pour les marqueurs de la peau, tels que les kératines, indique une possibilité pour la compensation des fonctions par les autres galectines. Par contre, deux anomalies ont été rapportées: 1) l'apoptose des kératinocytes, suite à l'irradiation aux rayons ultraviolets, est prématurée et prolongée; et 2) le potentiel de réépithélialisation est réduit. Bien que le premier résultat soit contradictoire envers la description du rôle pro-apoptotique de la galectine-7 dans l'épiderme, le second confirme les études de Cao et ses collègues (Cao *et al.*, 2002, Cao *et al.*, 2003). Gendronneau et ses collègues ont également observé la localisation de cette protéine dans les podosomes, ce qui suggère un rôle dans la migration des kératinocytes. De plus, l'absence de galectine-7 induit l'augmentation de la prolifération cellulaire suite au dommage tissulaire. Cette étude a permis de confirmer les résultats *in vitro* dans un modèle *in vivo* en ce qui a trait à l'apoptose, la prolifération et la migration des kératinocytes. Les souris

déficientes en galectine-7 seront un outil indispensable pour évaluer l'impact de cette protéine dans tous les systèmes biologiques.

3.4 Mécanismes moléculaires qui régulent son expression

PIG1 est un des noms qui a été attribué à la galectine-7, ce qui signifie *p53-induced gene 1* (Polyak *et al.*, 1997). Cette étude du groupe de Bert Vogelstein consistait à déterminer le profil d'expression génique de la lignée cellulaire DLD-1 (cancer colorectal) induit par l'expression exogène de p53. Les PIGs (*p53-induced genes*) se sont révélés être responsables de l'apoptose médiée par p53, possiblement par l'augmentation de la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS).

Bien que décrit précédemment en tant que gène pro-apoptotique induit par p53, l'expression du gène *galectine-7* est reconnue pour son altération, à la hausse ou à la baisse, dans le cancer. Notre groupe a voulu déterminer les facteurs de transcription responsables de l'expression du gène *galectine-7* dans différentes lignées du cancer du sein. Nos récents travaux ont ainsi démontré que p53 serait également responsable de l'expression du gène *galectine-7* dans le cancer du sein (Campion *et al.*, 2013). Ces résultats ont été obtenus suite à l'expression de p53 exogène, c'est-à-dire par la transfection d'un vecteur codant pour la protéine, à l'induction de la protéine endogène par un traitement de doxorubicine et à l'aide de petits ARN interférents (siRNA). Certaines mutations de p53 permettraient également l'induction de la protéine (Figure 1.20), ce qui est d'autant plus intéressant que p53 est reconnu pour son haut taux de mutations, ainsi que des gains de fonction dans le cancer (Muller *et al.*, 2014). La suite de cette étude de notre groupe a permis de démontrer que le facteur de transcription NF- κ B se lie à la région promotrice du gène *galectine-7*, en plus d'induire son expression de façon exogène et endogène (Figure 1.20). De plus, l'utilisation d'inhibiteurs de la voie de signalisation NF- κ B induit la diminution de l'expression de la *galectine-7*. Un autre point intéressant est la possibilité d'un *crosstalk* entre ces deux facteurs de transcription, tel que déjà décrit pour l'expression d'autres gènes (Schneider *et al.*, 2010). Nos observations d'une diminution de l'induction par p53 de l'expression de la *galectine-7*, suite à l'ajout d'inhibiteurs de la voie NF- κ B, a permis d'émettre cette hypothèse.

Une seconde étude de notre laboratoire a démontré que l'expression de la galectine-7 dans les cellules de cancer du sein peut aussi être régulée par l'isoforme 2 du facteur de transcription CCAAT/Enhancer-Binding Protein Beta (C/EBP β) (Campion *et al.*, 2014). Cette conclusion est basée notamment sur le fait qu'une mutation dans le site consensus spécifique à C/EBP β -2 dans la région promotrice du gène *galectine-7* réprime son induction. De plus, la

transfection d'un vecteur codant pour ce facteur de transcription augmente l'expression de la galectine-7, et ce autant au niveau de l'ARNm que de la protéine (Figure 1.20).

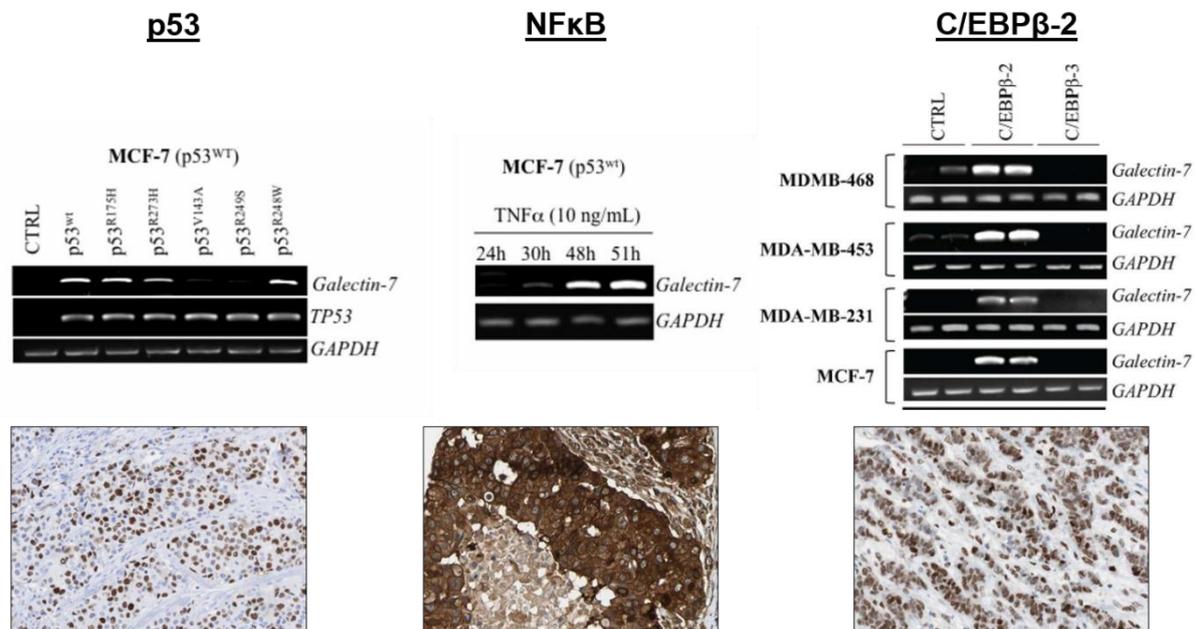


Figure 1.20 Régulation de l'expression du gène *galectine-7* dans le cancer du sein. Analyse semi-quantitative, par RT-PCR, de l'induction du gène *galectine-7* dans différentes lignées du cancer du sein. Plus spécifiquement, l'expression ectopique de p53, de type sauvage ou mutée, et C/EBP β -2, ainsi que l'activation de NF- κ B par TNF α augmentent l'expression génique de la *galectine-7*. L'analyse par immunohistochimie de coupes histologiques de carcinomes mammaires illustre l'expression de chacun des facteurs de transcription. Modifié de (Campion *et al.*, 2014, Campion *et al.*, 2013, Uhlen *et al.*, 2015, Uhlen *et al.*, 2010)

3.5 Ses ligands

Telle que décrit précédemment pour la famille des galectines, la galectine-7 se retrouve dans le compartiment intracellulaire, mais peut également être sécrétée par une voie non-classique et se retrouver dans le milieu extracellulaire. Bien que peu de ligands soient connus pour la galectine-7, voici un bref aperçu de l'impact de ses liaisons selon le compartiment associé (Figure 1.21).

Puisque la galectine-7 a été associée à la famille des galectines, ses ligands les plus connus sont les sucres. Bien entendu, la liaison s'effectue au niveau du CRD de la galectine-7 et principalement dans le compartiment extracellulaire. Une étude sur le neuroblastome a permis d'identifier un premier ligand pour la galectine-7: la chaîne de sucres du ganglioside GM1 (Kopitz *et al.*, 2003). Se retrouvant à la surface de cellules de neuroblastome, ce ganglioside permettrait le pivot entre la différenciation et la prolifération (Kopitz *et al.*, 1994). L'interaction entre la galectine-7 et GM1 a pour conséquence une diminution de la croissance cellulaire.

Par ailleurs, notre groupe a su déterminer l'impact de la sécrétion de la galectine-7 par des cellules de lymphomes (Demers *et al.*, 2005). L'augmentation de l'expression du gène de la métalloprotéinase matricielle 9 (*MMP-9*) en présence de galectine-7 intracellulaire, ainsi que son inhibition lorsque les cellules sont en présence de β -lactose, suggère l'induction d'une signalisation extracellulaire par la galectine-7 qui serait CRD-dépendante. Ces résultats ont également été vérifiés par l'utilisation de la galectine-7 recombinante pour confirmer sa fonction extracellulaire. En contraste des résultats de Kopitz et ses collègues, le mécanisme d'induction d'un gène associé à l'invasion cellulaire, *MMP-9*, serait attribué à la galectine-7 à la surface des cellules de lymphomes.

Les galectines, particulièrement la galectine-1, sont reconnus pour leur capacité à se lier à la surface des cellules du système immunitaire, ce qui permet l'immunosuppression. Notre groupe a également établi ce type de liaison pour la galectine-7, plus précisément dans le cancer de l'ovaire (Labrie *et al.*, 2014). La liaison à la surface de cellules T est dépendante du CRD puisqu'inhibée par le β -lactose, en plus d'induire la mort cellulaire programmée. Ce processus serait spécifique à ces cellules puisque même si la galectine-7 se lie aux cellules cancéreuses de l'ovaire, elle n'induit pas le processus apoptotique pour ces cellules.

La localisation intracellulaire de la galectine-7 peut être cytosolique, nucléaire, mitochondriale et membranaire. Tel que mentionné par Inagaki et ses collègues, le changement de localisation peut entraîner des conséquences pour la cellule (Inagaki *et al.*, 2008). De façon plus spécifique, leur modèle cellulaire hépatique a permis de constater le déplacement de la galectine-7 du noyau vers le cytoplasme, suite à un traitement par le facteur de croissance hépatocytaire (HGF). Ce changement de localisation permet une fonction bien précise qui implique la liaison entre la galectine-7 et Smad3, ce qui a pour effet d'inhiber la transcription des gènes cibles de Smad3. L'export nucléaire de ce facteur de transcription a pour effet de contrer la fibrose induite par la voie TGF- β .

Le second ligand intracellulaire découvert pour la galectine-7 est une protéine centrale du processus apoptotique: Bcl-2 (Villeneuve *et al.*, 2011). Cette interaction directe entre les deux protéines serait responsable, en partie, de la localisation mitochondriale de la galectine-7. De plus, la présence de cette galectine dans l'organelle spécifique a pour effet d'augmenter la relâche du cytochrome c, en présence de signaux pro-apoptotiques. Ces signaux induisent également le bris de la liaison entre Bcl-2 et la galectine-7. Le CRD de la galectine-7 ne serait pas impliqué dans la liaison puisqu'elle n'est pas inhibée par le lactose. Ces résultats, dans les modèles cellulaires du cancer du côlon et du cancer col de l'utérus, permettent de comprendre une partie du mécanisme moléculaire pro-apoptotique de la galectine-7.

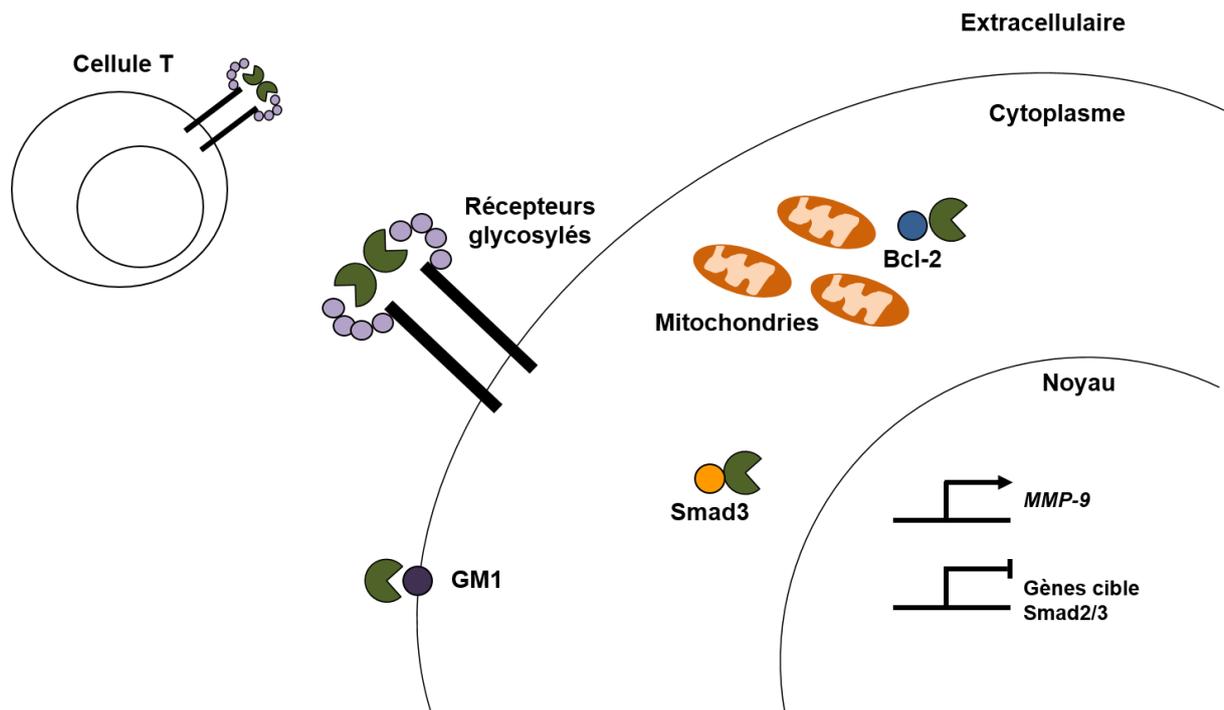


Figure 1.21 Schématisation de l'interaction entre la galectine-7 et ses ligands, ainsi que ses fonctions. La galectine-7 possède plusieurs ligands connus: récepteurs glycosylés à la surface des cellules, GM1 à la surface des cellules, Smad3 dans le cytosol et le noyau, ainsi que Bcl-2 à la mitochondrie. Différentes fonctions sont associées selon ces interactions: induction de l'apoptose des lymphocytes T, transcription de *MMP-9* et inhibition de la transcription des gènes cibles de Smad2/3. Compilation de sources diverses (Demers *et al.*, 2005, Inagaki *et al.*, 2008, Kopitz *et al.*, 2003, Labrie *et al.*, 2014, Villeneuve *et al.*, 2011)

3.6 Expression et fonctions dans les différents cancers

La galectine-7 peut avoir un rôle anti ou pro-tumoral, selon sa localisation tissulaire (St-Pierre *et al.*, 2012). La liste complète des tissus et cellules cancéreuses qui expriment la galectine-7 se retrouve dans les tableaux 4 et 5 de l'annexe I. Voici donc la description des études qui démontrent l'impact, ainsi que la fonction de la galectine-7 dans le cancer.

3.6.1 Rôle anti-tumoral

L'expression de la galectine-7 a été initialement rapportée en tant que gène induit par le facteur de transcription p53, dans une lignée cellulaire du cancer du côlon (Polyak *et al.*, 1997). Son rapport précis avec l'apoptose a été rapporté que quelques années plus tard par Kuwabara et ses collègues. Brièvement, les cellules du cancer du côlon (DLD-1) et du cancer du col de l'utérus (HeLa) qui expriment la galectine-7 constitutivement, c'est-à-dire des transfectants

stables d'un vecteur codant pour cette protéine, sont plus sensibles à l'apoptose induite par rayons ultraviolets et par l'actinomycine D (Kuwabara *et al.*, 2002). L'activation de c-jun NH₂-terminal kinase (JNK), ainsi que l'augmentation de l'activité de caspase-3, du clivage de PARP et de la relâche du cytochrome c mitochondrial sont observés en présence de galectine-7. Pour faire suite à ces résultats qui suggèrent un rôle pro-apoptotique pour la galectine-7 dans le cancer du côlon, ce même groupe a voulu démontrer le processus *in vivo* (Ueda *et al.*, 2004). Suite à la confirmation de la sensibilité au processus apoptotique, augmentée par la présence de galectine-7 ectopique, ils ont établi que la protéine pouvait également diminuer la croissance de ces cellules. L'injection sous-cutanée des cellules dans un modèle de souris immunodéficientes combinées sévères (SCID) a permis d'observer cet effet sur la croissance dans un modèle vivant, indépendamment de l'apoptose. La fonction anti-tumorale de la galectine-7 pourrait être reliée à une diminution de la prolifération cellulaire et de l'angiogenèse, dans le carcinome colorectal.

Le neuroblastome est également un cancer où la galectine-7 semble jouer un rôle suppressif (Kopitz *et al.*, 2003). Telle que mentionné précédemment, la liaison entre la galectine-7 et le ganglioside GM1 à la surface du neuroblastome entraîne la diminution de la croissance cellulaire. Sans aucune apparence de processus de mort cellulaire programmée, cet effet anti-prolifératif est bloqué par la galectine-3, ce qui attribue cette fonction spécifique à la galectine-7.

Matsui et ses collègues, quant à eux, ont démontré l'impact de la galectine-7 dans le cancer urothélial (Matsui *et al.*, 2007). Ils ont d'abord induit l'expression de la galectine-7 dans des lignées cellulaires du cancer de la vessie par un agent chimiothérapeutique, le cis-diamminedichloroplatinum (CDDP). L'expression ectopique de la galectine-7 tend à diminuer la viabilité de ces cellules, suite au traitement CDDP. Le mécanisme suggéré par Matsui et ses collègues est une augmentation de la phosphorylation de JNK par la galectine-7, ce qui aurait pour conséquences l'activation des caspases et le clivage de PARP. En amont de cette voie, la galectine-7 aurait également la capacité de générer la production de ROS. Des résultats préliminaires indiquent la possibilité d'utiliser la galectine-7 en tant que biomarqueur prédictif de la sensibilité à la chimiothérapie, dans le cancer urothélial humain.

Les cancers de la tête et du cou comprennent ceux de la muqueuse buccale, c'est-à-dire les carcinomes épidermoïdes de la bouche (OSCC). Une étude sur les carcinomes de la langue a su mettre l'emphase sur la présence de certaines galectines dans ces tumeurs, dont la galectine-7 (Alves *et al.*, 2011). Une grande proportion de cas, environ 74%, expriment la galectine-7. Cette lectine est présente dans la majorité des tumeurs de bas grade (95.5%) et dans un peu plus de la moitié des carcinomes de haut grade (62.8%). Ces résultats ont également été observés dans une seconde étude des cancers de la tête et du cou, en plus

d'associer la galectine-7 à des tumeurs plus différenciées, donc moins agressives (Cada *et al.*, 2009). Matsukawa et ses collègues ont, par la suite, défini la diminution de l'expression de la galectine-7 en tant que prédicteur de la résistance à la chimiothérapie et la radiothérapie (Matsukawa *et al.*, 2014). Plus précisément, la localisation intracellulaire cytosolique serait associée à l'augmentation de la sensibilité des OSCC pour les traitements avant chirurgie. Pour déterminer le rôle de la galectine-7 dans ces carcinomes, la surexpression de cette protéine a été induite. Conséquemment, la viabilité de ces lignées cellulaires OSCC a été réduite significativement, en présence ou non d'agents chimiothérapeutiques. De par ces résultats, la présence de la galectine-7 dans les OSCC semble être anti-tumorale et surtout bénéfique pour la réponse aux traitements néo-adjuvants.

La suppression de la galectine-7 est également observée dans la progression du cancer de l'estomac (S. J. Kim *et al.*, 2013b). De plus, une forte expression de la galectine-7 dans ces tumeurs est associée à une meilleure survie des patients. Son mécanisme, lors d'une surexpression de la galectine-7 dans les cellules du cancer de l'estomac, semble être la diminution de la prolifération, la migration et l'invasion. Ces résultats sont appuyés par l'observation des xénogreffes où la galectine-7 empêche la formation de tumeurs. De par l'utilisation d'un agent déméthylant sur différentes lignées de cellules du cancer de l'estomac, ils ont observé une augmentation de l'expression de la *galectine-7*. De plus, l'analyse de tissus de tumeurs de l'estomac a démontré la méthylation du gène *galectine-7*. Ces chercheurs ont alors émis l'hypothèse que l'expression de la galectine-7 est réprimée dans le cancer de l'estomac par l'hyperméthylation de l'ADN.

Notre plus récente étude sur le rôle de la galectine-7 dans le cancer a porté sur la prostate (Labrie *et al.*, 2015). Bien que très fortement exprimée par les cellules basales de la glande prostatique normale, la galectine-7 est totalement absente des carcinomes de la prostate. Lorsque surexprimée dans les lignées de cellules du cancer de la prostate, cette lectine sensibilise les cellules à l'apoptose, en présence ou non d'agents chimiothérapeutiques. De plus, la motilité et l'invasion de ces cellules sont réprimées par la galectine-7. Bien que ces données *in vitro* semblent toutes CRD-indépendantes puisqu'identiques pour la galectine-7 mutante au niveau du CRD, nos résultats *in vivo* ont démontrées que ce mutant est pro-tumoral. Brièvement, la taille des tumeurs de cellules injectées sous-cutanées est réduite en présence de galectine-7. Par contre, la galectine-7 qui ne possède plus la capacité de lier les sucres augmente considérablement la croissance des tumeurs. Nos résultats suggèrent que le domaine fonctionnel de la galectine-7 est essentiel pour son activité anti-tumorale, au sein d'un microenvironnement, dans le cancer de la prostate.

3.6.2 Rôle pro-tumoral

Bien que la fonction suppressive sur les tumeurs soit bien établie pour la galectine-7, plusieurs études ont su démontrer son rôle opposé pour d'autres types de cancer. Une première étude, réalisée par notre groupe, consistait à déterminer le transcriptome de lymphomes métastatiques et non-métastatiques (Moisan *et al.*, 2003). Pour ce faire, nous avons utilisé la lignée cellulaire 164T2, un lymphome murin, pour effectuer plusieurs passages *in vivo*. Au 19^e passage, une matrice différentielle d'ADN complémentaire nous a permis d'observer que la *galectine-7* était le gène le plus fortement régulé à la hausse. Pour déterminer la fonction pro-tumorale possible pour la galectine-7 dans le lymphome, nous avons induit la surexpression ectopique de la galectine-7 dans une lignée non-agressive de lymphome T murin (Demers *et al.*, 2005). Les résultats, suite à l'injection intrathymique de ces cellules dans un modèle de souris, indiquent que la présence de la galectine-7 accélère le développement du lymphome. De plus, l'agressivité de ce cancer est également augmentée puisque, suite à une injection intraveineuse, les métastases rénales et hépatiques sont plus nombreuses. En complément, l'inhibition de l'expression de galectine-7 dans des cellules de lymphome hautement métastatiques, à l'aide d'un antisens, a eu pour effet de diminuer la croissance et la dissémination du cancer (Demers *et al.*, 2007). Le mécanisme moléculaire suggéré est l'induction d'un gène pro-métastatique: *MMP-9*.

Une implication diagnostique a également été suggérée pour la galectine-7 dans les tumeurs de la thyroïde (Rorive *et al.*, 2002). Bien que la galectine-7 soit présente dans toutes les cellules du goître multinodulaire, comparable à un tissu normal, elle est plus faiblement exprimée dans les différents variants d'adénomes comparativement aux plus fortes expressions retrouvées dans les carcinomes. De plus, le marquage immunohistochimique de la galectine-7 semble d'intensité plus importante pour les carcinomes de la thyroïde. De par ces résultats, Rorive et ses collègues suggèrent l'utilisation de la galectine-7 en tant que biomarqueur de tumeurs de la thyroïde. De plus, ils ont voulu combiner, à la galectine-7, un marqueur diagnostique déjà établi pour ce type de cancer: CK19. Brièvement, une faible expression de la galectine-7 et de CK19 est une caractéristique des adénomes microfolliculaires (tumeur bénigne) qui peut être distinguée des carcinomes papillaires de la thyroïde (tumeur maligne) par l'expression élevée de la galectine-7 et CK19.

Saussez et ses collègues ont su démontrer l'importance de la galectine-7 dans les cancers de la tête et du cou. En premier lieu, ils ont observé que l'expression de la galectine-7 dans le carcinome de l'hypopharynx de stade 4, révélée par immunohistochimie sur 81 carcinomes, est associée à une survie sans maladie plus courte (Saussez *et al.*, 2006). En second lieu, l'expression de la galectine-7 serait augmentée dans les lésions cancéreuses lorsque

comparée à l'hypopharynx normal ou encore à une dysplasie (Saussez *et al.*, 2008). De plus la localisation nucléaire serait principalement retrouvée dans la dysplasie comparativement au tissu normal et au cancer, où elle serait exclusivement cytoplasmique. L'expression de MMP-9 corrèle également avec celle de la galectine-7, spécifiquement dans les carcinomes du larynx (Saussez *et al.*, 2009). De plus amples études permettront d'associer l'expression de la galectine-7 à la transcription de *MMP-9*, telle que démontré pour le lymphome (Demers *et al.*, 2007). Ces données sont à l'opposé de l'étude de Matsuwaka et ses collègues sur le cancer de la tête et du cou OSCC puisqu'elles suggèrent un rôle pro-tumoral pour la galectine-7. Ceci met l'accent sur l'importance de distinguer la localisation tissulaire du cancer de la tête et du cou pour l'utilisation de la galectine-7 en tant que biomarqueur.

Le carcinome œsophagien fait partie des cancers gastro-intestinaux. Lors de la recherche de nouveaux biomarqueurs pour ce type de cancer, Zhu et ses collègues ont trouvé une protéine plus fortement exprimée dans les carcinomes œsophagiens comparativement aux tissus normaux (X. Zhu *et al.*, 2010). De plus, une localisation majoritairement restreinte au noyau est retrouvée dans l'œsophage. En présence de cellules cancéreuses, une expression membranaire, cytosolique et nucléaire est observée. Par contre, la galectine-7 se retrouve principalement dans les carcinomes bien et modérément différenciés. Cette protéine semble perdue par le cancer de l'œsophage peu différencié, ce qui fait de la galectine-7 un biomarqueur potentiel pour la différenciation de ce type de carcinome.

Dans le cas du cancer de l'ovaire, la galectine-7 est retrouvée plus fréquemment dans les tumeurs de haut grade, ainsi que dans les métastases, à l'inverse du tissu normal où elle est absente (Labrie *et al.*, 2014). Son expression en ARNm serait associée à une diminution de la survie, selon une analyse *in silico*. Tels que pour le lymphome, nos résultats démontrent une augmentation de l'invasion des cellules du cancer ovarien qui surexpriment la protéine, ce qui pourrait être associé à l'induction du gène *MMP-9*. De plus, l'attachement de la galectine-7 à la surface des cellules du système immunitaire pourrait être un mécanisme d'immunosuppression qui favoriserait le rôle pro-tumoral de la galectine-7 dans le cancer de l'ovaire. Selon une autre étude, la prolifération cellulaire pourrait également être un mécanisme par lequel la galectine-7 favoriserait la progression de cette maladie (H. J. Kim *et al.*, 2013a).

De son rôle distinct dans le cancer selon le tissu affecté, la galectine-7 est parfois associée à des fonctions opposées pour le même cancer. C'est le cas pour l'étude de Park et ses collègues où les cellules du cancer du col de l'utérus, HeLa, expriment *MMP-9* suite à l'induction de la galectine-7 ectopique (J. E. Park *et al.*, 2009). L'invasion est également augmentée pour ces cellules et serait dû à l'activation de p38 par la galectine-7. Par contre, ces résultats sont contradictoires de ceux présentés par l'équipe de Fu-Tong Liu qui a démontré une sensibilité plus accrue à l'apoptose en présence de la galectine-7 (Kuwabara *et*

al., 2002). D'autres études ont permis d'appuyer ce rôle anti-tumoral attribué à la galectine-7 puisqu'elle est associée à l'augmentation de la survie des patientes atteintes du cancer du col de l'utérus et confère une protection contre l'invasion et la viabilité des cellules cancéreuses (C. J. Tsai *et al.*, 2013, H. Zhu *et al.*, 2013).

Notre groupe a également présenté de tels résultats pour le cancer de la peau (Biron-Pain *et al.*, 2013). L'expression de la galectine-7 diminue selon la progression de la maladie, plus spécifiquement, elle est pratiquement absente dans les mélanomes. Lorsqu'induite de façon exogène dans une lignée de mélanome murin, elle diminue le potentiel de migration. Par contre, elle induit l'augmentation de la résistance à l'apoptose et l'expression d'EGR-1. Lorsque ces cellules sont injectées dans un modèle de souris, elle ne module pas la croissance tumorale, ni même la dissémination aux poumons.

Enfin, le cancer du sein est également une maladie dans laquelle la galectine-7 semble jouer un rôle pro-tumoral.

3.7 La galectine-7 dans le cancer du sein

La première étude indiquant un possible rôle pro-tumoral pour la galectine-7 dans le cancer du sein a été réalisée il y a presque 20 ans, par le groupe de Henry J. Thompson (Lu *et al.*, 1997). L'analyse de l'expression des gènes suite à l'induction chimique de carcinomes mammaires chez le rat a révélé une surexpression de galectine-7. Brièvement, une injection du 1-méthyl-nitrosourea (MNU) intrapéritonéale a été administrée aux rates âgées de 21 jours. Suite à ce traitement, le gène homologue du gène *galectine-7* humain chez le rat, est exprimé dans les carcinomes mammaires, mais n'est pas détecté dans la glande mammaire normale. Ces résultats ont été confirmés dans les tumeurs mammaires de rates gavées par un autre carcinogène, le 7-12-diméthylbenz[a]anthracène (DMBA). Lu et ses collègues ont alors émis l'hypothèse de l'utilisation de la galectine-7 comme biomarqueur du cancer du sein.

Chez l'humain, l'étude qui a établi les sous-types moléculaires du cancer du sein a également révélé une forte expression du gène *galectine-7* dans plusieurs lignées de cellules myoépithéliales de la glande mammaire (Perou *et al.*, 2000). De plus, ce gène a été associé de façon spécifique aux cellules myoépithéliales par une technique de purification et d'analyse génétique des deux types cellulaires de l'épithélium du sein normal (Jones *et al.*, 2004).

Suite aux résultats de ces différentes études, nous avons voulu investiguer l'expression protéique de la galectine-7 dans la glande mammaire et le cancer du sein humain, ce qui n'avait encore jamais été fait (Demers *et al.*, 2010). Nous avons, tout d'abord, coloré une coupe

histologique de sein normal par immunohistochimie en utilisant un anticorps anti-galectine-7 humain. Cette technique a révélé la spécificité de la protéine pour les cellules myoépithéliales de la glande mammaire, ainsi que sa localisation cytoplasmique et nucléaire. En contraste, aucune cellule épithéliale luminale n'exprime la galectine-7 (Figure 1 de l'annexe II). La même réaction immunohistochimique a ensuite été réalisée sur 213 carcinomes mammaires humains, à l'aide de la technique de micromatrices tissulaires. Brièvement, les micromatrices tissulaires sont confectionnées par l'insertion de biopsies en un seul bloc de paraffine. Cette technique permet l'analyse d'un très grand nombre de tissus de façon très rapide et économique. L'expression très variable de la galectine-7 dans les différents carcinomes mammaires (Figure 2 de l'annexe II) nous a révélé une spécificité pour les carcinomes de haut grade, ainsi que pour les sous-types moléculaires les plus agressifs: HER-2 positif et de phénotype basal (Tableau I de l'annexe II). Sa présence corrèle inversement avec les marqueurs de meilleur pronostic tels qu'ER, PR et GATA-3, tous associés au sous-type moléculaire luminal. De plus, toutes les patientes dont le carcinome mammaire est double positif pour HER-2 et la galectine-7 présentent des métastases ganglionnaires (Tableau 2 de l'annexe II), ce qui nous a permis d'émettre l'hypothèse suivante: le processus métastatique du cancer du sein implique la galectine-7. Pour vérifier cette hypothèse, des transfectants stables qui surexpriment la galectine-7 ont été générés à partir de deux lignées de carcinomes mammaires murins, soient les cellules 4T1 et 66c14. La présence de la galectine-7 dans les cellules 4T1, suite à leur injection dans la glande mammaire des souris BALB/c, a pour effet d'accélérer la progression métastatique aux poumons, d'augmenter le nombre de nodules pulmonaires et de diminuer la survie (Figure 3 de l'annexe II). Les cellules 66c14, lignée reconnue pour ne pas métastaser aux os, ont été injectées par voie intracardiaque. Les résultats observés sont que la surexpression de la galectine-7, dans les cellules 66c14, augmente le potentiel métastatique aux os, ainsi que la taille des lésions ostéolytiques (Figure 4 et 5 de l'annexe II). Des résultats préliminaires indiquent que la galectine-7 serait impliquée dans l'inhibition de l'apoptose (Figure 6 de l'annexe II).

Nos plus récents travaux ont démontré l'implication de trois facteurs de transcription clés pour la régulation transcriptionnelle de la *galectine-7* dans le cancer du sein: p53, NF- κ B et C/EBP β -2 (Figure 1.20) (Campion *et al.*, 2014, Campion *et al.*, 2013, Uhlen *et al.*, 2015, Uhlen *et al.*, 2010). De plus, plusieurs études démontrent l'implication de ces facteurs de transcription dans la progression du cancer du sein (Bundy *et al.*, 2003, Petitjean *et al.*, 2007, Shostak *et al.*, 2011). Ces différentes découvertes mettent en lumière l'importance de la galectine-7 dans le cancer du sein et doivent être poursuivies pour déterminer les mécanismes moléculaires pro-tumoraux impliqués.

HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DU PROJET DE THÈSE

Mise en contexte: Notre précédente étude a démontré l'importance de l'expression protéique de la galectine-7 dans le cancer du sein (Demers *et al.*, 2010). Cependant, le mécanisme d'action de la galectine-7, dans le cancer du sein, n'a pas été identifié. De plus, l'évaluation de l'expression de l'ensemble des galectines pour l'étude d'une maladie, telle que le cancer du sein, est importante. Les galectines peuvent être compensatoires ou antagonistes de par leur structure à la fois similaire globalement et distincte en régions précises.

But de l'étude: Déterminer l'expression et les fonctions des galectines dans le cancer du sein.

Hypothèses:

- La fonction pro-tumorale de la galectine-7 s'effectue par un mécanisme moléculaire qui confère une résistance à l'apoptose
- Les galectines ont une expression distincte en ARNm et en protéine, dans le cancer du sein.

Objectifs:

- Confirmer l'activité anti-apoptotique de la galectine-7 dans les cellules du cancer du sein humain et dévoiler ses partenaires d'interaction.
- Déterminer la localisation intracellulaire de la galectine-7 dans les cellules du cancer du sein humain.
- Générer des mutants de délétions et ponctuels de la galectine-7 pour définir les régions importantes pour ses fonctions biologiques.
- Définir les signatures de galectines dans les différents sous-types du cancer du sein.

CHAPITRE 2

LA GALECTINE-7 CYTOSOLIQUE PERTURBE LES FONCTIONS DE P53 ET INDUIT LA CHIMIORÉSISTANCE DANS LES CELLULES DU CANCER DU SEIN

Article publié: *BMC Cancer* 2014, 14:801

RÉSUMÉ

Introduction: La résistance à l'apoptose par les agents chimiothérapeutiques est un obstacle majeur dans le traitement des formes agressives du cancer du sein. Récemment caractérisée dans la glande mammaire, l'expression de la galectine-7 est spécifique au sous-type du cancer du sein humain de phénotype basal, mais absente dans le sous-type luminal.

Méthodologie: Nous avons généré une forme mutante de la galectine-7 (R74S). L'arginine 74 est l'équivalent structural de l'arginine 186 retrouvée dans la galectine-3 humaine. Précédemment, il a été démontré que la mutation R186S abolit les fonctions biologiques de la galectine-3.

Résultats: La mutation de l'arginine 74 induit seulement des changements locaux et limités pour le repliement de la galectine-7. L'efficacité à former des dimères en solution est équivalente entre la protéine recombinante galectine-7 de type sauvage et mutée R74S. L'analyse des paramètres thermodynamiques par calorimétrie isotherme à titration indique, par ailleurs, que la liaison de la galectine-7 au lactose est inhibée par la mutation R74S. Par l'utilisation de la microscopie électronique, nous avons confirmé l'expression de la galectine-7 dans les compartiments nucléaire et cytosolique des cellules du cancer du sein et la capacité de la galectine-7 à se localiser à la mitochondrie. La mutation en position 74, par ailleurs, réduit considérablement l'expression de la galectine-7 dans les compartiments nucléaire et mitochondrial. Par contre, les cellules qui expriment la galectine-7 mutée sont également, sinon plus résistantes à l'apoptose induite par un agent chimiothérapeutique, comparativement aux cellules qui expriment la galectine-7 de type sauvage. Nous avons aussi observé que la galectine-7 normale et mutée inhibent le clivage de PARP-1 induit par la doxorubicine, ainsi que l'expression protéique de p53. L'inhibition de p53 corrèle avec la diminution de l'expression de p21 en ARNm et protéique. De plus, l'analyse des fractions nucléaires et cytoplasmiques démontrent que la galectine-7 de type sauvage et le mutant R74S inhibent la translocation nucléaire de p53, possiblement par l'augmentation de la dégradation de p53 cytosolique.

Conclusions: Ces observations remettent en question le paradigme qui a guidé la confection d'inhibiteurs de galectines spécifiques pour le traitement du cancer. Cette étude suggère que cibler la galectine-7 cytosolique de façon CRD-indépendante dans les cellules du cancer du sein pourrait être une stratégie valable pour le traitement de cette maladie. Notre étude est pertinente à l'amélioration de la sélection des agents anti-cancéreux ciblés.

CONTRIBUTION DES AUTEURS

La conception des expériences a été effectuée par Yves St-Pierre, Nicolas Doucet, Louis Gaboury et moi. J'ai réalisé la majorité des expériences de cet article: construction et caractérisation des micromatrices tissulaires, immunohistochimie, séparation des constituants cellulaires (cytosol, noyaux, mitochondries), culture de lignées de cellules du cancer du sein, immunobuvardage de type western, construction de plusieurs vecteurs d'expression de la galectine-7 humaine normale et mutée R74S (bactérien et eucaryote), production et préparation de galectine-7 recombinante normale et mutée R74S pour les expériences de RMN, gel natif et coloration au bleu de Coomassie, calorimétrie isotherme à titration, génération de clones de cellules MCF-7 transfectées stables pour l'expression de la galectine-7 humaine normale et mutée R74S, microscopie immuno-électronique, traitements (doxorubicine, étoposide, chlorure de cobalt, MG-132), isolement de l'ARN, RT-PCR et co-immunoprécipitation. J'ai également effectué ou participé, lorsque je n'ai pas réalisé l'expérience, à l'analyse des données. Marilyne Labrie a réalisé les expériences de cytométrie en flux et interprété les données obtenues. Donald Gagné a effectué les expériences de RMN et interprété les données de RMN et de calorimétrie isotherme à titration. Maria Claudia Vladoiu a réalisé des expériences d'isolement de constituants cellulaires et d'immunobuvardage de type western et a également participé à l'analyse des données. Yves St-Pierre et moi avons écrit l'article. Tous les auteurs ont révisé et approuvé le manuscrit final.

Cytosolic galectin-7 impairs p53 functions and induces chemoresistance in breast cancer cells

Andrée-Anne Grosset^{1,2}

Email: andree-anne.grosset@iaf.inrs.ca

Marilyne Labrie¹

Email: marilyne.labrie@iaf.inrs.ca

Donald Gagné¹

Email: donald.gagne@iaf.inrs.ca

Maria-Claudia Vladoiu¹

Email: maria-claudia.vladoiu@iaf.inrs.ca

Louis Gaboury²

Email: louis.gaboury@umontreal.ca

Nicolas Doucet¹

Email: nicolas.doucet@iaf.inrs.ca

Yves St-Pierre^{1*}

* Corresponding author

Email: yves.st-pierre@iaf.inrs.ca

¹ INRS-Institut Armand-Frappier, 531 Blv. des Prairies, Laval, Quebec H7V 1B7, Canada

² IRIC | Université de Montréal, 2950 Chemin de Polytechnique, Montreal, Quebec H3T 1J4, Canada

Abstract

Background

Resistance to apoptosis induced by anti-cancer drugs is a major obstacle for the treatment of aggressive forms of breast cancer. Galectin-7 (gal-7) was recently shown to be specifically expressed in basal-like but not in luminal subtypes of human breast cancer.

Methods

We generated a mutant form of gal-7 (R74S). Arginine 74 is the structural equivalent of arginine 186 found in human galectin-3. Mutation R186S was previously shown to abolish the biological function of galectin-3.

Results

Mutation of arginine 74 induced only limited and local changes to the gal-7 fold. Recombinant forms of R74S and wtgal-7 were also equally effective at forming dimers in solution. Analysis of the thermodynamic parameters by isothermal titration calorimetry (ITC) indicated, however, that binding of lactose to gal-7 was inhibited by the R74S mutation. Using confocal microscopy and electron microscopy, we confirmed the expression of gal-7 in the cytosolic and nuclear compartments of breast cancer cells and the ability of gal-7 to translocate to mitochondria. The mutation at position 74, however, greatly reduced the expression of gal-7 in the nuclear and mitochondrial compartments. Interestingly, cells expressing mutated gal-7 were equally if not even more resistant to drug-induced apoptosis when compared to cells expressing wtgal-7. We also found that both wtgal-7 and R74S inhibited dox-induced PARP-1 cleavage and p53 protein expression. The inhibition of p53 correlated with a decrease in p21 protein expression and *CDKN1A* mRNA. Furthermore, analysis of nuclear and cytoplasmic fractions showed that both wild type and R74S mutant gal-7 inhibited p53 nuclear translocation, possibly by increasing degradation of cytosolic p53.

Conclusions

These findings pose a challenge to the paradigm that has guided the design of galectin-specific inhibitors for the treatment of cancer. This study suggests that targeting CRD-independent cytosolic gal-7 in breast cancer cells may be a valuable strategy for the treatment of this disease. Our study will thus complement efforts towards improving selectivity of targeted anticancer agents.

Keywords

Galectin-7, Localization, Apoptosis, p53, Breast cancer

Background

Members of the galectin family are characterized by their ability to bind β -galactosides via a highly conserved carbohydrate recognition domain (CRD). They play an important role in several physiological processes, including embryonic development, intercellular adhesion, host-pathogen interactions, cell migration, and immune response (Di Lella *et al.*, 2011). They are normally classified according to their structural organization. Galectins containing only one CRD are called proto-type and include galectins 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 and 15. Those with two distinct CRDs in tandem connected by a linker region (tandem-repeat type) are galectins 4, 6, 8, 9 and 12. Galectin-3 is the only member of the third group and is a chimera-type protein with one CRD connected to an unusual non-lectin domain rich in proline and glycine.

Historically, galectins have been known as small extracellular soluble that bind cell surface glycans, helping organizing membrane domains and regulating the signaling threshold and the receptor residency time (Brewer *et al.*, 2002). Galectins, however, exhibits a wide range of subcellular localizations, being found in both intracellular and extracellular compartments. Intracellularly, they have been reported to be exclusively/predominantly cytosolic, nuclear, mitochondrial, or distributed between the distinct subcellular compartments. Finally, even within a specific organelle, they appear to be distributed diffusely or to form aggregates or punctate structures. Such wide subcellular distribution significantly complicate galectin-targeted anticancer therapy since the pro- and the anti-tumoral functions of galectins differ according their subcellular localization (Vladoiu *et al.*, 2014).

Galectin-7 (gal-7) is a prototype galectin that forms homodimers (Leonidas *et al.*, 1998). Gal-7 is preferentially expressed in stratified epithelia, including epidermis, cornea, oral cavity, esophagus and rectal epithelium (Magnaldo *et al.*, 1998). It is also expressed in mammary myoepithelial cells in tissues of normal individuals (Demers *et al.*, 2010). Its level of expression, however, is significantly altered in various types of cancer (St-Pierre *et al.*, 2012). For example, gal-7 is expressed at higher levels in aggressive molecular subtypes of breast carcinoma, most notably in basal-like breast cancer with an ER/PR/HER-2 negative status (Demers *et al.*, 2010). Exogenous expression of gal-7 in breast cancer cell lines that express low or undetectable levels of gal-7 resulted in an increased metastatic behavior to the lung and bone and larger osteolytic lesions. Such pro-tumoral function of gal-7 has been largely attributed to its ability to protect cancer cells from pro-apoptotic signals (Campion *et al.*, 2013, Demers *et al.*, 2010). Like other galectins, however, gal-7 is preferentially expressed intracellularly, most notably in cytosolic, nuclear and mitochondrial compartments (Cada *et al.*, 2009, Inagaki *et al.*, 2008, Vander Ghinst *et al.*, 2012, Villeneuve *et al.*, 2011). Whether the resistance of breast cancer cells to apoptosis is dependent on the intracellular localization of gal-7 remains unknown. In the present work, we have addressed this question by generating a mutant form of gal-7

(R74S) with altered subcellular localization and tested its ability to mediate resistance of breast cancer cells to drug-induced cell death.

Methods

Tissue microarrays and immunohistochemistry

Representative specimens from our previous TMA analysis were immunostained for gal-7 using the Discovery XT automated immunostainer (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) (Demers *et al.*, 2010). Deparaffinized sections were incubated in Cell Conditioning 1 (pH 8.0) for antigen retrieval and then stained for 60 min with the anti-human gal-7 polyclonal antibody (R&D Systems, Minneapolis, MN) using a 1:150 dilution. The slides were counterstained with hematoxylin and bicarbonate. Each section was scanned at a high resolution using the Nanozoomer Digital Pathology System (Hamamatsu, Bridgewater, NJ). The study was approved by the research ethics committee of the research center at the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (approval No. SL 05.019).

Cell lines and reagents

The MCF-7 and MDA-MB-468 cell lines were provided by Dr. Peter Siegel (Rosalind and Morris Goodman Cancer Research Centre, McGill University, Montreal, QC, Canada) and maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) FBS, 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES buffer and 1 mM sodium pyruvate. SKBR3 cells, obtained from Dr. Sylvie Mader (Institute for Research in Immunology and Cancer, University of Montreal, Montreal, QC, Canada), were grown in McCoy's 5A Medium supplemented with 10% (v/v) FBS, 2 mM L-glutamine and 10 mM HEPES buffer at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. MCF10A and MCF12A protein extracts were provided by Dr. Isabelle Plante (INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, QC, Canada). All cell culture products were purchased from Life Technologies (Burlington, ON, Canada). Cobalt chloride and lactose were purchased from Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada). MG-132 was from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). All other reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), unless otherwise indicated.

Generation of stable transfectants expressing gal-7 and gal-7 R74S

To obtain stable MCF-7 breast carcinoma transfectants expressing gal-7, the cDNA encoding the human gal-7 (provided by Dr. Thierry Magnaldo) was cloned in *src* eukaryotic expression

vector (kind gift of Dr. François Denis) using *SpeI* and *BamHI* restriction enzymes. The replacement of arginine 74 to serine (R74S) was introduced by oligo-directed site-specific mutagenesis using the forward (5'-GGC CGC GAG GAG TCC GGG CCG GGC GTT CCT- 3') and reverse (5' –GGC CGC GAG GAG TCC GGG CCG GGC GTT CCT- 3') primers. Controls were generated using MCF-7 breast carcinoma cells transfected with the empty *sra* vector. Transfection was carried out using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions (Life Technologies). After 48 h of culture, transfected cells were allowed to grow in complete medium containing 1 µg/ml of puromycin. Individual colonies were expanded and gal-7 expression was monitored by Western blot analysis. All experiments were conducted with at least two independent clones expressing either wild type or mutant gal-7.

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 *p53* (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 *p21* (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') 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 25 to 35 cycles of the following: 94°C for 40 seconds, 60°C for 40 seconds, and 72°C for 40 seconds, followed by a final extension step at 72°C for 10 min. PCR was performed in a thermal cycler (Eppendorf, Mississauga, ON, Canada). The amplified products were analyzed by electrophoresis using 1.5% agarose gels and SYBR Safe (Life Technologies) staining and UV illumination.

Co-immunoprecipitation

MCF-7 stable transfectants expressing exogenous gal-7 and R74S mutant and MCF10A were transfected with vectors encoding wild type p53 (Origene, Burlington, MA). After 24 hrs, the cells were lysed in immunoprecipitation (IP) buffer containing 2% (v/v) CHAPS, 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA and protease inhibitors (Roche, Laval, QC, Canada). Equal amounts of whole cell protein extracts were used for each IP. Rabbit anti-p53 antibody (FL393; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) or IgG control antibody (2 µg) were incubated 10 min at room temperature with Dynabeads Protein G (Life Technologies). The Dynabeads-

antibody complex was incubated with proteins overnight at 4°C. After several washes in IP buffer, the protein complexes were resuspended in Laemmli loading buffer. Immunoprecipitated proteins were separated on a 15% SDS-PAGE gel and analyzed by Western blotting using anti-gal-7 and anti-p53 as described below.

Western blot analysis

Whole cell extracts were suspended using RIPA lysis buffer (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) and protease inhibitors (Roche). Mitochondria and nuclear proteins were extracted using a kit (Thermo Fisher Scientific; Sigma-Aldrich) following the manufacturer's instructions. Protein concentrations were measured using a protein assay reagent (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada). Equal amounts of proteins were separated on SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories). The membranes were first blocked with 5% (v/v) milk in PBS/0.05% Tween 20 for 1 h and subsequently blotted overnight at 4°C with primary antibodies: goat anti-human gal-7 polyclonal antibody (1:1000; R&D Systems, Minneapolis, MN), rabbit anti-p53 (FL393; 1:1000; Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-p21 (1:1000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA), rabbit anti-poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)-1 (p25) monoclonal antibody (1:10000; Epitomics, Burlingame, CA), rabbit anti-COX IV polyclonal antibody (1:1000; Cell Signaling Technology), mouse anti-lamin A/C monoclonal antibody (1:1000; Cell Signaling Technology), rabbit anti- β -tubulin monoclonal antibody (1:10000; Cell Signaling Technology), and mouse anti- β -actin monoclonal antibody (1:20000; Sigma-Aldrich). Secondary antibodies consisted of horseradish peroxidase conjugated donkey anti-goat (R&D Systems), anti-rabbit or anti-mouse (GE Healthcare, Buckinghamshire, England). Detection was performed by the enhanced chemiluminescence method (GE Healthcare).

Immuno-electron microscopy

Cells were fixed in a 0.1% (v/v) glutaraldehyde and 4% (v/v) paraformaldehyde solution and embedded in the low viscosity embedding Spurr media. Ultrathin sections were cut, placed on nickel grids and incubated in sodium metaperiodate. Samples were blocked in 1% (v/v) BSA for 5 min, incubated 60 min in a goat anti-human gal-7 polyclonal antibody (1:150) and 60 min in a rabbit anti-goat 10 nm gold-conjugated secondary antibody (1:20, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA). Each section were counterstained with uranyl acetate and lead citrate and visualized using a Hitachi 7100 transmission electron microscope.

Apoptosis detection by flow cytometry

The percentage of apoptotic cells was measured by two-color flow cytometry using Alexa Fluor 488 annexin V conjugate (Life Technologies) and propidium iodide (PI). Briefly, 1.75×10^5 cells were treated with 150 μM cobalt chloride overnight at 37°C without serum. Cells were then harvested, stained and analyzed by flow cytometry using a FACS Calibur (BD Biosciences, San Jose, CA).

Production of recombinant gal-7

Each of the DNA fragments coding for gal-7 and R74S was cloned into pET-22b(+) using *Nde*I and *Hind*III restriction enzymes. Recombinant proteins were expressed in *E. coli* BL21(DE3) at 37°C following addition of 1 mM IPTG at an $\text{OD}_{600 \text{ nm}} = 0.6-0.7$ and an incubation of 4 h. Bacterial pellets were resuspended in lysis buffer (0.7 mg/mL lysozyme, 10 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT and protease inhibitor cocktail), incubated for 1 h at 37°C and centrifuged for 30 min at 15 000 g (4°C). The supernatant was then filtered and applied to a lactose-agarose column and the protein was eluted in one mL fractions with 150 mM lactose. Fractions were analyzed by SDS-PAGE. Gal-7 and R74S were dialyzed against 20 mM potassium phosphate at pH 7.2 for all subsequent characterization experiments. ^{15}N -labeled samples were prepared by growing *E. coli* BL21(DE3) in M9 minimal medium as previously described (Doucet *et al.*, 2009).

Solution NMR experiments

Proteins were at a concentration of 535 μM for gal-7 and 200 μM for gal-7 R74S. A 10% (v/v) D_2O solution was added to the protein samples for NMR spin-lock purposes. Protein concentration was determined by UV-vis spectrophotometry using an extinction coefficient of 8030 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ at 280 nm (Morris *et al.*, 2004). ^1H - ^{15}N HSQC spectra were acquired at 800 MHz on a Varian (Agilent) NMR spectrometer equipped with a triple resonance probe and pulsed-field gradients. All spectra were acquired at 310 K as calibrated with a standard methanol sample. The ^1H - ^{15}N HSQC experiments were conducted with 256 t_1 and 8192 t_2 points with proton and nitrogen spectral widths of 3000 and 8000 Hz, respectively. Spectra were processed using NMRPipe (Delaglio *et al.*, 1995) and further analysed using Sparky (Kneller *et al.*, 1993). The ^1H - ^{15}N composite chemical shift differences ($\Delta\delta$) were calculated between wild-type and mutant enzymes according to the following equation (Grzesiek *et al.*, 1996): $\Delta\delta$ (ppm) = $[(\Delta\delta_{\text{HN}}^2 + \Delta\delta_{\text{N}}^2/25)/2]^{1/2}$. Only chemical shift variations showing $\Delta\delta > 0.02$ ppm were considered significant.

Isothermal titration calorimetry (ITC)

Lactose was reconstituted in a 20 mM potassium phosphate buffer at pH 7.2. Gal-7 and R74S were dialyzed in the same buffer after purification. All experiments were performed in a Nano ITC microcalorimeter (TA Instruments, New Castle, DE) at 25°C with a stirring rate of 250 rpm. Pre-equilibrated solutions of 200 μ M protein and 6 mM ligand were used for each assay. A control experiment was performed by titrating lactose into protein-free buffer. Each experiment consisted of 20 injections of 2 μ L ligand into protein, with an interval of 130 seconds between injections. All experiments were performed at least in triplicate. Data was analyzed and fitted using the NanoAnalyze software v2.3.6 (TA Instruments).

FITC conjugation and galectin-7 binding assay

Briefly, 10 μ l of a 2 mg/ml fluorescein isothiocyanate (FITC)/DMSO solution was added to 300 μ l of 1.7 μ g/ μ l recombinant wtgal-7 or R74S in a 0.1 M NaHCO₃ pH 9.2 solution and incubated for 2 hrs at room temperature on a roller. FITC-conjugated wtgal-7 or R74S was then purified using a PD-10 sepharose column (GE healthcare) and eluted with PBS containing 0.01% [v/v] sodium azide (PBA). To measure FITC-wtgal-7 or R74S binding to cell surface, 2.5×10^5 cells were incubated for 30 min with the indicated concentrations. Cells were washed 2 times with PBA and resuspended in 500 μ l PBA. Samples were analyzed by FACSCalibur (BD Biosciences).

Results

Subcellular localization of gal-7 in human breast cancer cells

Analysis of gal-7 expression in normal mammary epithelium shows positive gal-7 staining in both the nuclear and cytoplasmic compartments of myoepithelial cells (Figure 2.1A). A similar pattern of expression was observed in tissue sections obtained from patients with breast cancer, most notably in sections from patients with basal-like breast cancer, where gal-7 is preferentially expressed (Demers *et al.*, 2010). The expression of gal-7 in cytosolic and nuclear compartments was also confirmed by western blot analysis of subcellular fractions isolated from MDA-MB-468 cells, which constitutively express gal-7 (Figure 2.1B-D). We also confirmed the ability of gal-7 to translocate to mitochondria in breast cancer cells, as recently observed in human colon carcinoma cells (Villeneuve *et al.*, 2011).

Generation of the R74S mutant

Site-directed mutagenesis was used to generate mutants of gal-7. A special attention was paid to arginine 74, the structural equivalent of arginine 186 in human galectin-3. Mutation R186S was previously shown to abolish the biological function of galectin-3 (Salomonsson *et al.*, 2010). The replacement of arginine 74 to serine (R74S) was thus introduced in the human gal-7 gene by oligo-directed site-specific mutagenesis. To verify the integrity and structural perturbations caused by the R74S mutation, we used solution NMR spectroscopy, which provides a fast and highly sensitive assessment of structural perturbations caused by point mutations in proteins. For this purpose, the wild-type gal-7 (wtgal-7) and variant R74S were isotopically labeled, overexpressed in *E. coli* BL21(DE3) and purified to homogeneity. Their two-dimensional heteronuclear single quantum coherence spectra (^1H - ^{15}N HSQC) were then acquired and overlaid (Figure 2.2A). Our ^1H - ^{15}N HSQC spectral analysis showed that the R74S mutation induced only limited and local changes to the gal-7 fold (Figure 2.2A-D). Recombinant forms of R74S and wtgal-7 were also equally effective at forming dimers in solution (Figure 2.2E). Analysis of the thermodynamic parameters of the proteins by isothermal titration calorimetry (ITC) indicated, however, that binding of lactose to gal-7 was partially inhibited by the R74S mutation, with a K_d value of 720 μM for the R74S variant relative to 378 μM for the wild-type protein. A typical titration profile is shown in Additional file 1: Figure S2.1. This finding was corroborated by our flow cytometric analysis showing that binding of recombinant R74S to glycan receptors on the surface of Jurkat T cells was significantly lower than that observed with the wild-type protein (Additional file 2: Figure S2.2).

Functional characterization of the R74S mutant

Because MCF-7 cells have been extensively used as a model system for human breast cancer, we have used this cell line to express and further characterize the R74S mutant. The relevance of MCF-7 model for our studies was first established by expressing the wild-type form of gal-7 (wtgal-7). Western blotting analysis of stable transfectants showed that wtgal-7 was present in cytosolic, nuclear, and mitochondrial extracts of MCF-7 cells transfected with an expression vector encoding wtgal-7 (Figure 2.3A-B), a pattern similar to that found in MDA-MB-468 cells. Immunogold immunohistochemistry by electron microscopy (EM) confirmed the presence of gal-7 in these subcellular compartments (Figure 2.3C-F). The gold beads labeled mitochondria on the outer membrane and inside the organelle. In all cases, gal-7 was expressed in clusters, mostly being found inside the mitochondria (Additional file 3: Figure S2.3). MCF-7 expressing wtgal-7 was also more resistant to apoptosis induced by doxorubicin (dox) as compared to control MCF-7 cells transfected with a (empty) control vector (Figure 2.3G). These results corroborated our previous data using the mouse 4T1 breast cancer cells (Demers *et al.*, 2010).

We thus examined whether the R → S mutation at position 74 induced a change in the subcellular localization of gal-7. Our Western blot analyses showed that this mutation greatly reduced the expression of gal-7 in the nucleus and mitochondria (Figure 2.4A-B). This effect was confirmed by EM studies (Figure 2.4C-F). Interestingly, however, we found that MCF-7 cells expressing wild-type and R74S forms of gal-7 were equally resistant to apoptosis induced by cobalt chloride, a hypoxia mimicking agent (Figure 2.5A-B), and by other anticancer drugs, such as etoposide and doxorubicin (dox) (Figures 2.5C and 2.6A). In fact, MCF-7 cells expressing R74S were more resistant to apoptosis induced by etoposide and dox.

Gal-7 reduces p53-induced p21 expression

Because MCF-7 cells express a wild-type form of p53 and that DNA damage response induced by dox is known to increase the cyclin-independent kinase inhibitor p21 via a p53-dependent pathway, we took this opportunity to examine the expression of p21 and p53 in MCF-7 cells expressing wtgal-7 and R74S. We found that both wtgal-7 and R74S inhibited dox-induced PARP-1 cleavage and p53 protein expression (Figure 2.6A-B). The inhibition of p53 correlated with a decrease in p21 protein expression and *CDKN1A* mRNA (Figure 2.6B-C). Again, the inhibition by R74S was stronger than that observed with the wild-type form of gal-7. Furthermore, analysis of nuclear and cytoplasmic fractions showed that wild type and R74S mutant gal-7 inhibited p53 nuclear translocation (Figure 2.7A). Treatment of cells with MG-132, a well-known proteasome inhibitor, restored the p53 expression, suggesting that both forms of gal-7 promote degradation of cytosolic p53 (Figure 2.7B). This possibility is supported by our data showing that both forms of gal-7 co-precipitate with p53 (Figure 2.7C-D). The ability of endogenous gal-7 to co-precipitate with p53 was further confirmed using MCF10A cells (Additional file 4: Figure S2.4).

Discussion

There is an increasing interest in the development of galectin-specific inhibitors for the treatment of cancer. Because galectins exert both intracellular and extracellular functions, a better understanding of their subcellular localization in cancer cells is critical to promote the development of new anti-cancer therapies directed at these proteins.

Gal-7 is highly expressed at both the mRNA and protein levels in tissues of patients with aggressive forms of cancer, including basal-like breast cancer subtype (Chung *et al.*, 2002, Demers *et al.*, 2010, Jones *et al.*, 2004). Experimentally, gal-7 has been shown to increase the metastatic behavior of cancer cells while its suppression reduces their metastatic behavior (Demers *et al.*, 2007, Demers *et al.*, 2005, Demers *et al.*, 2010). Like other members of the

galectin family, however, gal-7 has been shown to have a dual role in cancer. While it promotes cancer progression in many types of cancer, it may exert an anti-tumor activity in other types of cancer, such as urothelial carcinoma and colon cancer. In all cases, the role of gal-7 in apoptosis was associated with its intracellular localization, as shown by the strong cytosolic and nuclear immunoreactivity with anti-gal-7 antibodies (Demers *et al.*, 2010, Kuwabara *et al.*, 2002). Our model system with the R74S mutant will thus be useful to determine whether translocation to mitochondria and nucleus modulates the ability of gal-7 to modulate apoptosis in other cancer cell types.

Because R74 is located in the vicinity of the CRD, it is not surprising that a mutation at this position reduces the affinity to lactose or the binding to cell surface glycoproteins. It may also affect the fine specificities of ligand recognition in the ligand binding groove, as suggested by the tridimensional structure of gal-7 (Leonidas *et al.*, 1998). We expect, however, that the R74S mutation will not affect the protein-protein interactions that Gal-7 displays with proteins such as Bcl-2 and Smad3 (Inagaki *et al.*, 2008, Villeneuve *et al.*, 2011). Similarly to galectin-3 that utilizes synexin for its translocation to the perinuclear mitochondrial membranes, gal-7 might also require the aid of similar transport proteins for its translocation (Yu *et al.*, 2002). As such, the cytosolic presence of the R74S mutant is potentially due to the loss of the interaction between gal-7 and its transport proteins resulting in its pronounced cytosolic localization. Alternatively, the mutation at the R74 promoting the cytosolic sequestration of gal-7 may allow enhanced binding to cytosolic proteins increasing as such various cytoplasmic signaling pathways. Nevertheless, future studies will be needed to determine the specific mechanism by which gal-7 translocates to mitochondria and to the nucleus.

Our results suggest that gal-7 may be involved in the regulation of p21 expression. These results may thus provide a new mechanism underlying the functions of gal-7 in apoptosis and warrant further investigation. Specifically, we found that the R74S mutation does not alter the proliferation rate of breast cancer cells (Additional file 5: Figure S2.5). Rather, our data obtained using the proteasome inhibitor and the co-immunoprecipitation of gal-7 with p53 suggests that gal-7 may help to stabilize cytosolic p53, possibly by modulating its interaction with MDM2. Whether gal-7 directly binds to p53 or belongs to the p53 multimolecular complex is currently unknown. Although glycosylation of p53 has been reported (Bode *et al.*, 2004, Shaw *et al.*, 1996, W. H. Yang *et al.*, 2006) and that some p53-interacting proteins are glycosylated (Lui *et al.*, 2013), our observation that R74S also co-immunoprecipitates with p53 suggests that such interaction could be CRD-independent. Such CRD-independent function for galectins is not uncommon, especially for intracellular galectins (Vladoiu *et al.*, 2014). Another possibility that may explain lower levels of nuclear p53 protein and reduced p21 activation is that galectin-7 may be part of a complex network of interrelated mechanisms that

regulate the nucleo-cytoplasmic transport of p53 following cellular stress. These possibilities are currently under investigation.

Conclusions

In the present work, we have shown that: 1) a mutation at position 74 inhibited translocation of gal-7 to the mitochondria and the nucleus, sequestering gal-7 to the cytosolic compartment; 2) such decrease of gal-7 expression in the nucleus and mitochondria does not impair the ability of gal-7 to drug-induced apoptosis; in fact, the R74S mutant protected even more cells from apoptosis induced by anti-cancer drugs, and 3) sequestration of gal-7 to the cytosol impaired the translocation of p53 to the nucleus and the upregulation of p21. Taken together, these results suggest that targeting cytosolic gal-7 in breast cancer cells may be a valuable strategy for the treatment of this disease.

Abbreviations

gal-7, Galectin-7; wtgal-7, Wild-type galectin-7; CRD, Carbohydrate recognition domain; dox, Doxorubicin

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

Conceived and designed the experiments: AAG, YSP, ND and LG. Performed the experiments and analyzed the data: AAG, ML, MCV and DG. Wrote the paper: AAG and YSP. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors thank Diane Tremblay, Isabelle Plante, and Micheline Letarte (INRS) for their excellent technical support, as well as Sameer Al-Abdul-Wahid from the Québec/Eastern Canada High Field NMR Facility for his excellent NMR technical assistance.

Supported in part by grants to Y.S-P. from the Canadian Institute for Health Research (Grant No. MOP-89697) and a Discovery grant to N.D. from the Natural Sciences and Engineering

Research Council of Canada (RGPIN 402623–2011). A.A.G. and M.L. are supported by a Ph.D. studentship and N.D. by a Research Scholar Career Award (Junior 1) from the Fonds de Recherche du Québec-Santé (FRQS). D.G. is supported by a Ph.D. studentship from the Fondation universitaire Armand-Frappier de l'INRS. N.D. also acknowledges support from the FRQNT Strategic Cluster Regroupement Québécois de Recherche sur la Fonction, la Structure et l'Ingénierie des Protéines (PROTEO) and the FRQS Strategic Cluster Groupe de Recherche Axé sur la Structure des Protéines (GRASP).

Figure legends

Figure 2.1 Expression of gal-7 in human mammary cancer tissues and cell lines. (A) Typical expression patterns of gal-7 in normal mammary tissues (myoepithelial cells) and in basal-like tumors collected from patients. Detailed immunohistochemical analysis in different types of breast cancer patients have been reported previously [6]. Scale bars, 300 μm (left) and 25 μm (right). **(B)** Cytosolic and nuclear fractions were purified from basal-like breast cancer cells MDA-MB-468. Expression of endogenous gal-7 was measured in both fractions by Western blotting. β -tubulin and lamin A/C are shown as positive cytoplasmic and nuclear expression controls, respectively. **(C)** Similar analysis showing expression of gal-7 in purified mitochondrial fractions. β -tubulin and COX IV are shown as positive cytoplasmic and mitochondrial expression controls, respectively. **(D)** Gal-7 in human breast cancer cell lines. Expression was measured by Western blot analysis from whole cell lysates. β -actin is shown as a positive expression control.

Figure 2.2 Structural analysis of wild-type gal-7 and the R74S mutant. (A) Superimposed ^1H - ^{15}N HSQC spectra of wild-type (green) and R74S (red) gal-7 at 310 K and 800 MHz. **(B)** ^1H - ^{15}N chemical shift differences $\Delta\delta$ (ppm) caused by the R74S mutation mapped on the primary sequence of gal-7. The ^1H - ^{15}N weighted average composite chemical shift differences ($\Delta\delta$) were calculated between WT and variant R74S according to the following equation [17] : $\Delta\delta$ (ppm) = $[(\Delta\delta_{\text{HN}}^2 + \Delta\delta_{\text{N}}^2/25)/2]^{1/2}$. **(C)** Three-dimensional structure of gal-7 showing the general β -sheet topology of the carbohydrate recognition domain (CRD) and the position of the carbohydrate binding site, as delineated by residues H49, N51, R53, N62, W69, E72 and R74. **(D)** Mapping of ^1H - ^{15}N chemical shift variations ($\Delta\delta$) between wtgal-7 and variant R74S on the 3D structure of gal-7 [PDB: 3ZXF]. Residues with chemical shift variations $\Delta\delta > 0.05$ ppm are plotted on the structure of gal-7 (in blue). The position of the R74 residue is shown in purple. **(E)** Immunoblots showing soluble monomeric and dimeric forms of recombinant gal-7 in a native gel

Figure 2.3 Subcellular distribution of gal-7 in MCF-7 cells. (A) Cytosolic and nuclear fractions were purified from control (sr α) cells and MCF-7 cells expressing gal-7. Expression of gal-7 was measured in both fractions by Western blotting. β -tubulin and lamin A/C are shown as positive cytoplasmic and nuclear expression controls, respectively. (B) Similar analysis showing expression of gal-7 in purified mitochondrial fractions. β -tubulin and COX IV are shown as positive cytoplasmic and mitochondrial expression controls, respectively. (C-F) Subcellular localization of gal-7 in MCF-7 as measured by electron microscopy. Scale bars, 500 nm (C) and 100 nm (D-F). (G) Effect of gal-7 on induction of apoptosis by doxorubicin. Stable transfectants of MCF-7 cells expressing gal-7 were treated with 50 nM doxorubicin for 72 hrs at 37°C. Cells were then harvested and PARP-1 cleavage levels were assayed by Western blotting.

Figure 2.4 Subcellular distribution of the R74S mutant. The effect of the R74S mutation on the (A) nuclear and (B) mitochondrial localization of gal-7, as measured by Western blot analysis of subcellular fractions. Membrane blots were incubated with anti-gal-7, anti-lamin A/C, anti-COX-IV and anti- β -tubulin. Lamin A/C, COX-IV and β -tubulin were used as nuclear, mitochondrial and cytosolic markers, respectively. (C) Whole MCF-7 cell and distribution of galectin-7 R74S mutant in (D) cytoplasm, (E) nucleus and (F) mitochondria, as measured by electron microscopy. Scale bars, 500 nm (C) and 100 nm (D-F).

Figure 2.5 Anti-apoptotic function of gal-7 is not altered by R74S mutation. Effect of wild-type and mutated gal-7 on (A) PARP-1 cleavage and (B) Annexin V positive cells induced upon treatment with 150 μ M CoCl₂. (C) Western blot analysis of PARP-1 cleavage for increasing doses of etoposide for 24 hrs at 37°C. Controls included stable MCF-7 cells transfected with the empty (sr α) expression vector.

Figure 2.6 Gal-7 and its R74S variant suppress PARP-1 cleavage, p53 expression and p21 transcription induced by doxorubicin. (A) Stable transfectants of MCF-7 cells expressing wild type or R74S mutant gal-7 were treated with 50 nM doxorubicin for 72 hrs at 37°C and immunoblotted with cleaved PARP-1-specific antibody. (B) Western blot analysis showing p53, p21 and gal-7 protein expression following doxorubicin treatment for 24 hrs. (C) mRNA levels of *p53* and *p21* were assayed by semi-quantitative RT-PCR. β -actin and GAPDH were used as loading controls.

Figure 2.7 Decreased of p53 nuclear translocation through proteasomal degradation induced by cytoplasmic gal-7. (A) Cytosolic and nuclear fractions were purified from control (srα) cells and MCF-7 cells expressing wild type or mutated gal-7 after doxorubicin treatment. Expression of p53, p21 and gal-7 was measured in both fractions by Western blotting. β-tubulin and lamin A/C are shown as positive cytoplasmic and nuclear expression controls, respectively. **(B)** Cells were treated with 10 μM MG-132 for 0, 2, and 6 hrs. Total cellular extracts were subjected to Western blot analysis for p53, gal-7 and β-actin. Immunoprecipitation (IP) experiments showing p53 interaction with **(C)** wild type and **(D)** R74S mutant of gal-7 in MCF-7 cells. Whole-cell lysates were made from MCF-7 cells transfected with a construct expressing p53. Lysates were immunoprecipitated with anti-p53 or a control IgG antibody, and immunoblot analysis was performed with anti-gal-7.

Figure 2.1

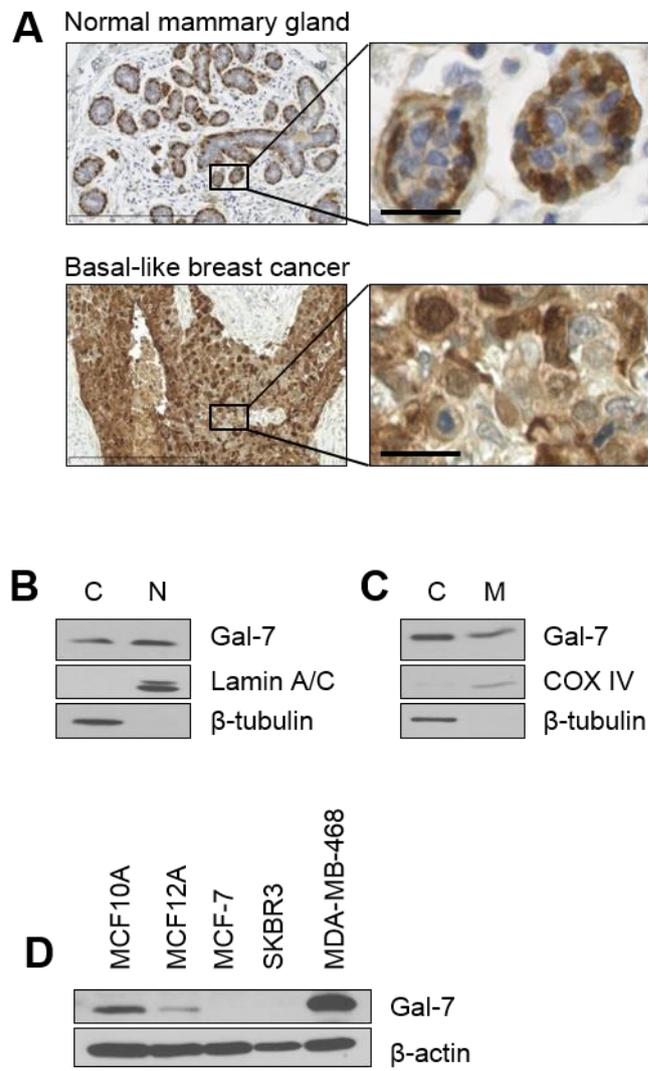


Figure 2.2

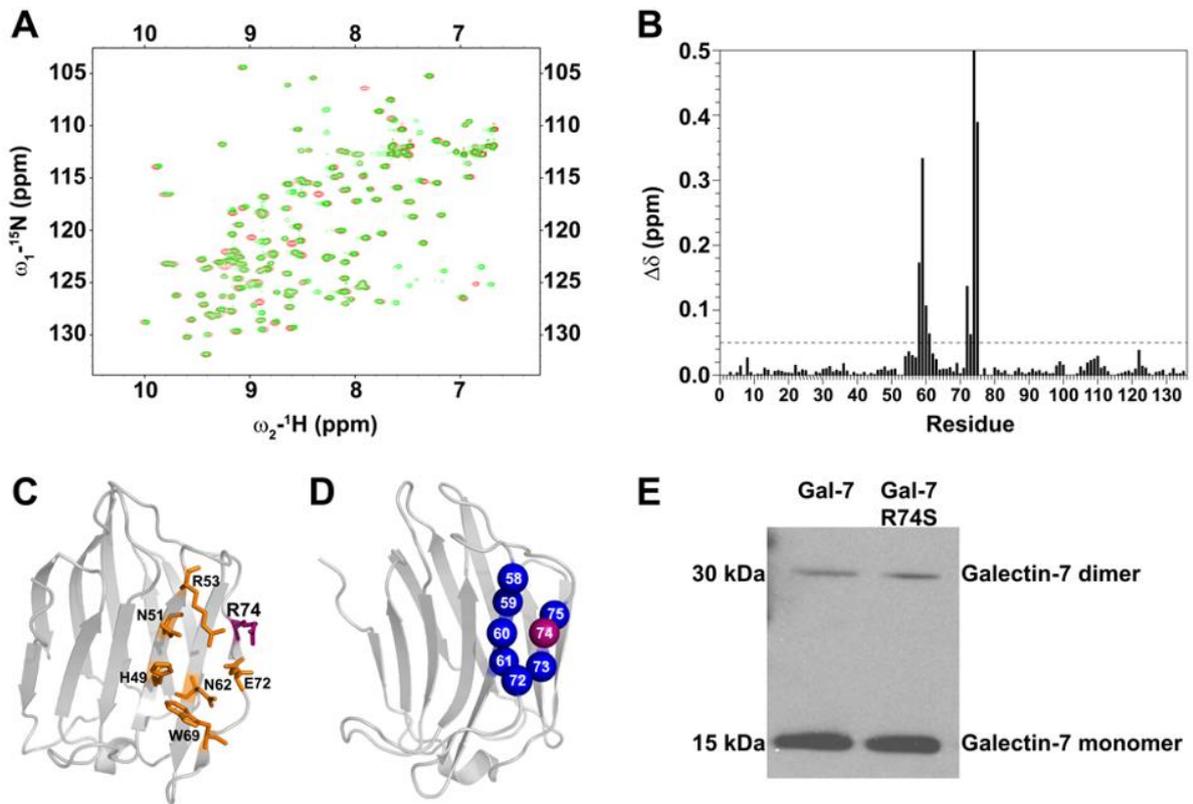


Figure 2.3

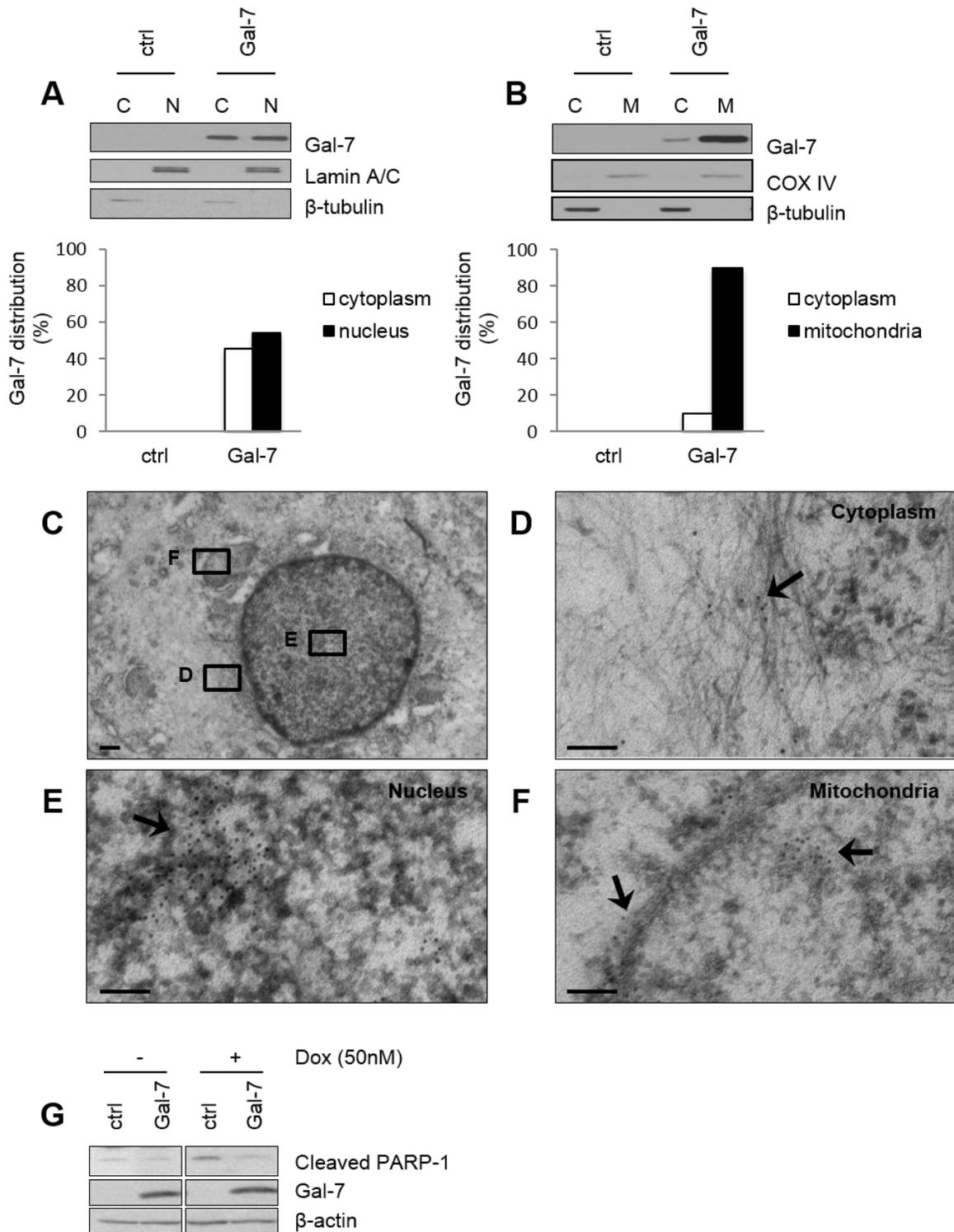


Figure 2.4

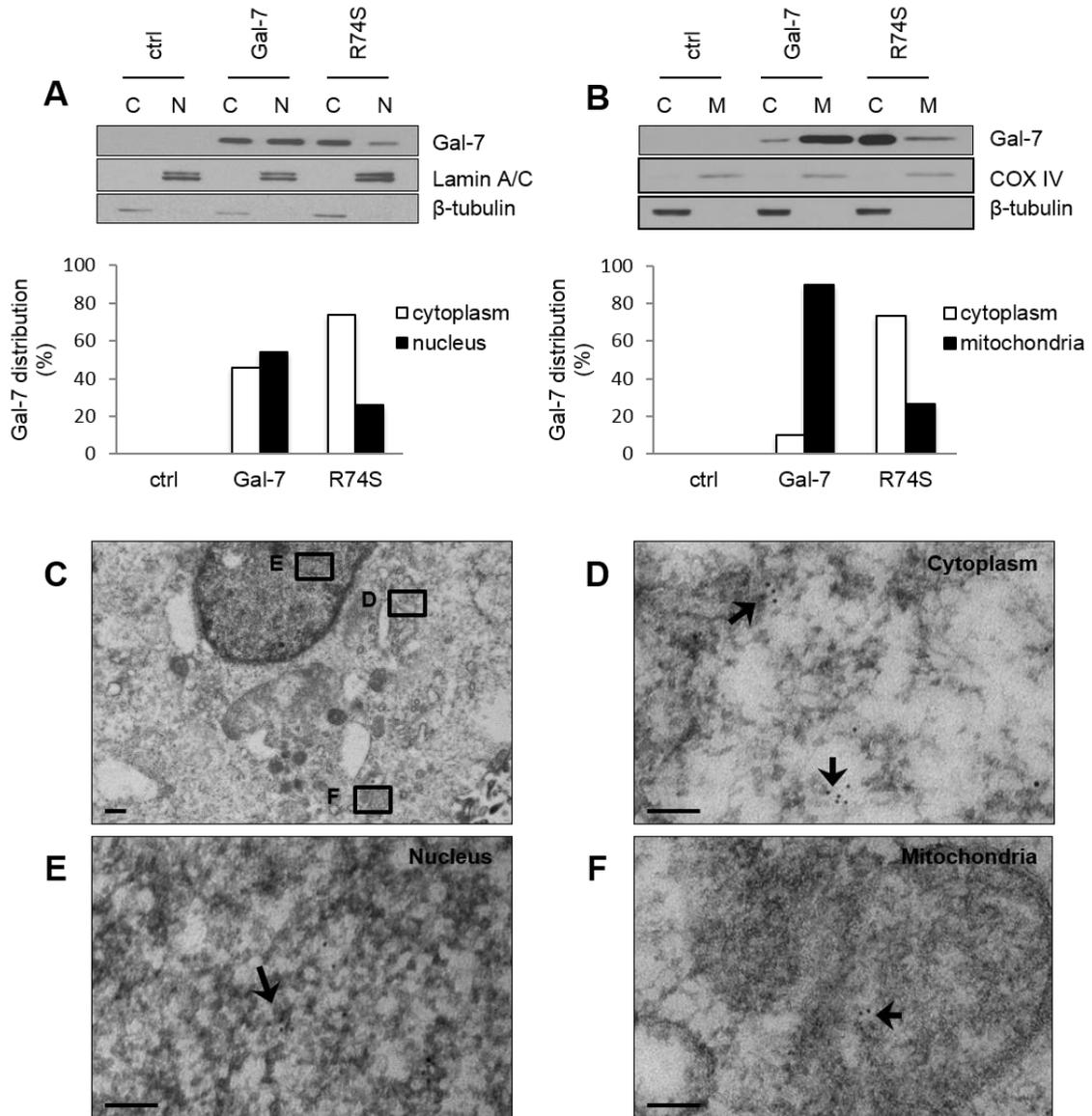


Figure 2.5

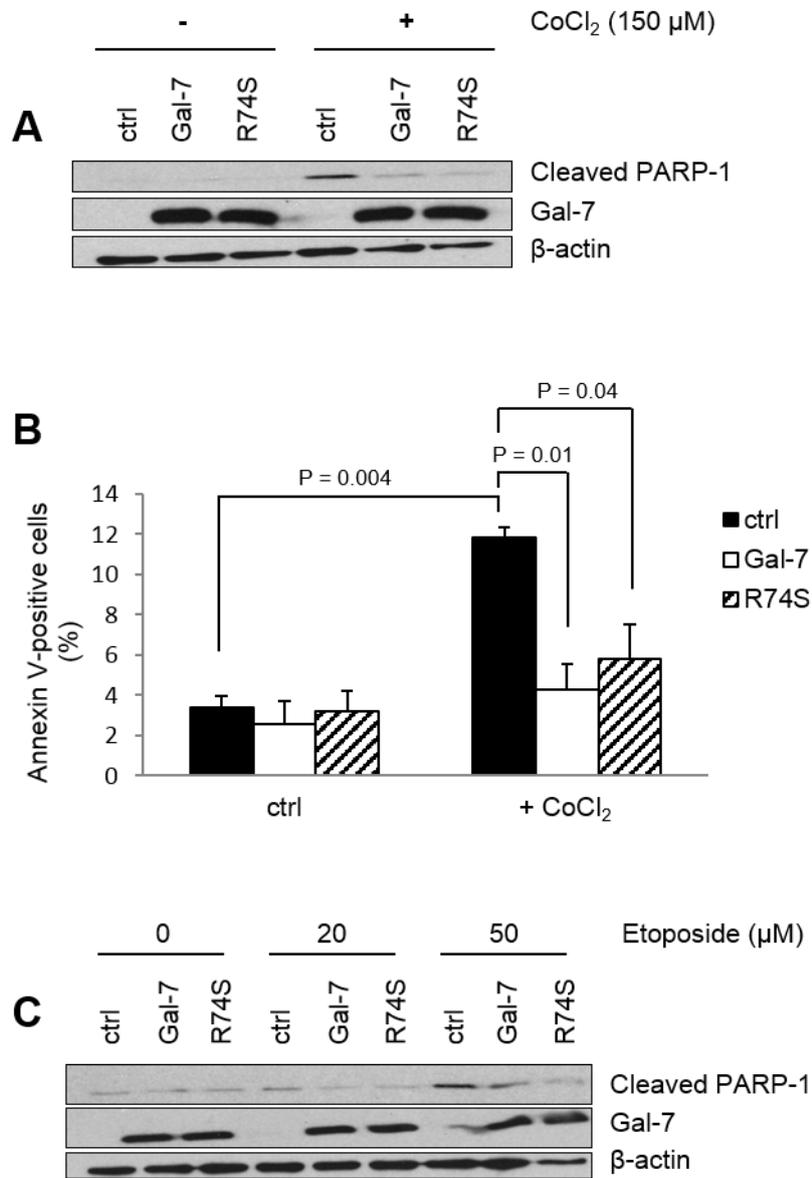


Figure 2.6

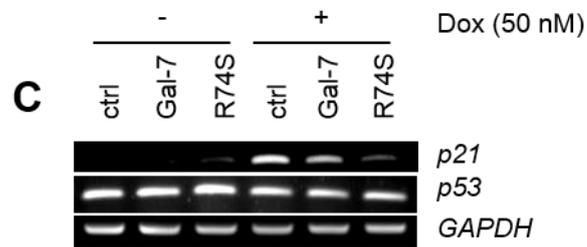
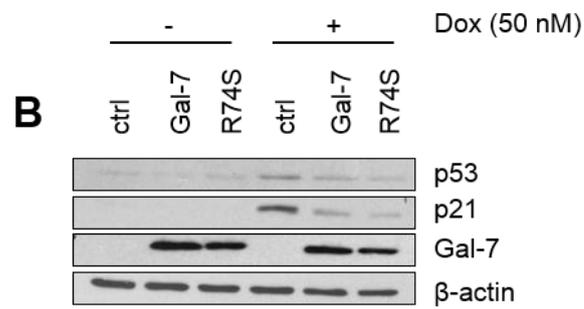
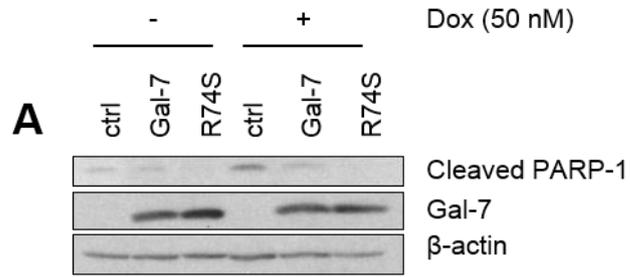
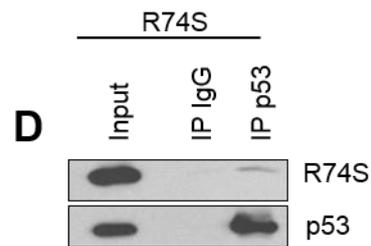
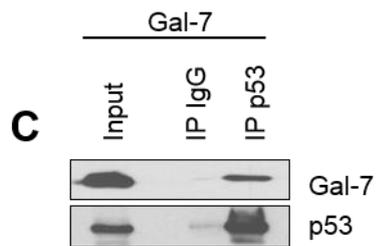
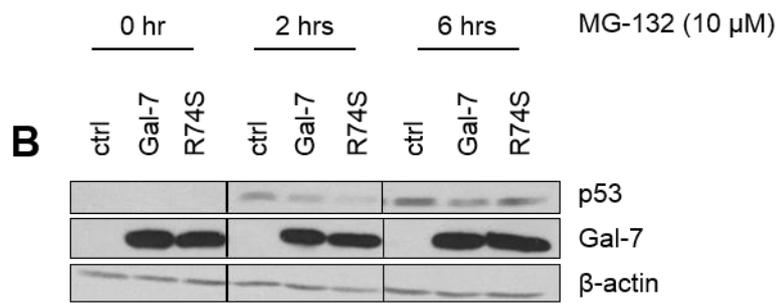
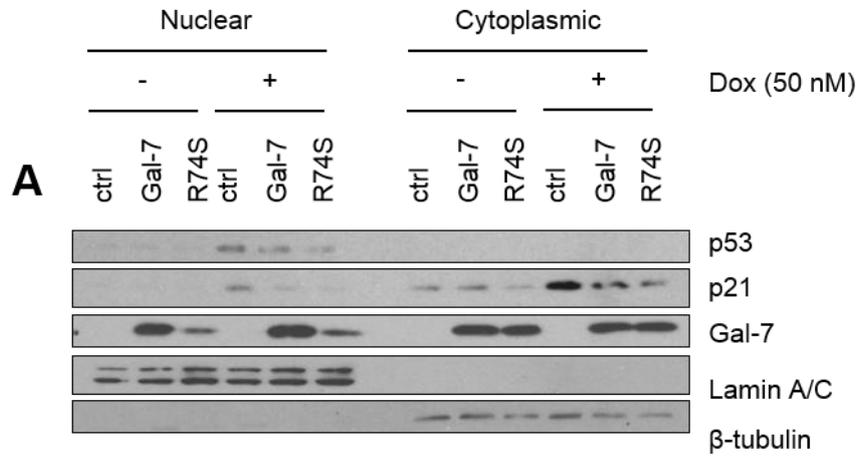


Figure 2.7



Supplementary figure legends

Figure S2.1 Isothermal calorimetric titration of gal-7 with lactose. (Top) Typical ITC experiment carried out by adding 2 μ l aliquots of 6 mM lactose to 200 μ M wtgal-7 or R74S. (Bottom) Heat released per mole of lactose injected as a function of the sugar / protein molar ratio. The titration was obtained at 25°C in 20 mM potassium phosphate buffer, pH 7.2.

Figure S2.2 Binding of recombinant wtgal-7 and R74S to Jurkat T cells. Increasing concentrations of recombinant FITC-labeled wtgal-7 or R74S were added to Jurkat T cells. Binding was measured by flow cytometry after 30 min of incubation at 4°C.

Figure S2.3 Clusters of gal-7 in MCF-7 cells observed by electron microscopy. Transmission electron micrographs showing gal-7 clusters (arrows) in (A) the cytoplasm, (B) nucleus, and (C) mitochondria of MCF-7 stable transfectants expressing gal-7. In (D), quantitative assessment of the number of immunogold particles per clusters as measured from transmission electron micrographs.

Figure S2.4 Interaction of endogenous gal-7 with p53 in MCF10A cells. Immunoprecipitation (IP) experiments showing p53 interaction with endogenous gal-7 in MCF10A cells. Whole-cell lysates were made from MCF10A cells transfected with a construct expressing p53. Lysates were IP with anti-p53 or a control IgG antibody, and immunoblot analysis was performed with anti-gal-7.

Figure S2.5 Cellular proliferation of MCF-7 is not significantly affected by gal-7 and R74S variant. Stable transfectants of MCF-7 cells expressing empty vector (ctrl), wild type or R74S mutant gal-7 were seeded at 5000 cells per well in E-Plates 96 and observed for a period of 72 h. Dynamic proliferation assay was achieved via xCELLigence real-time cell analyzer.

Figure S2.1

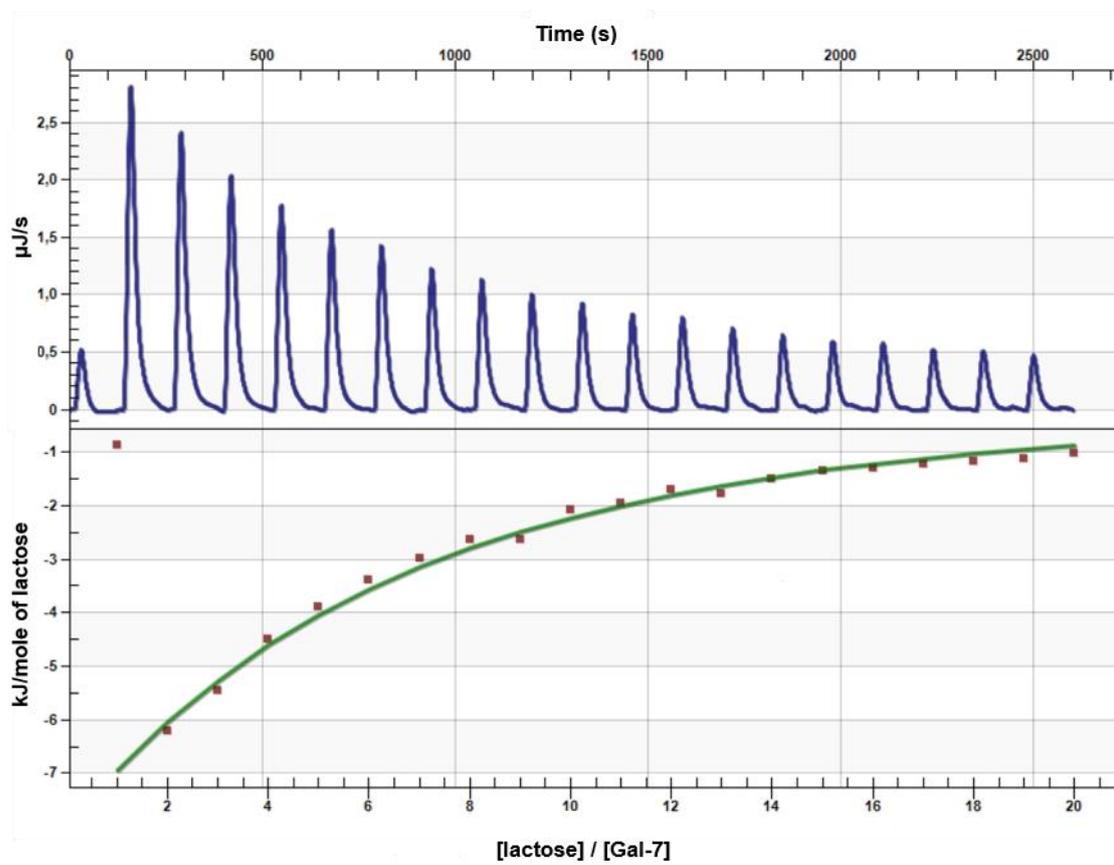


Figure S2.2

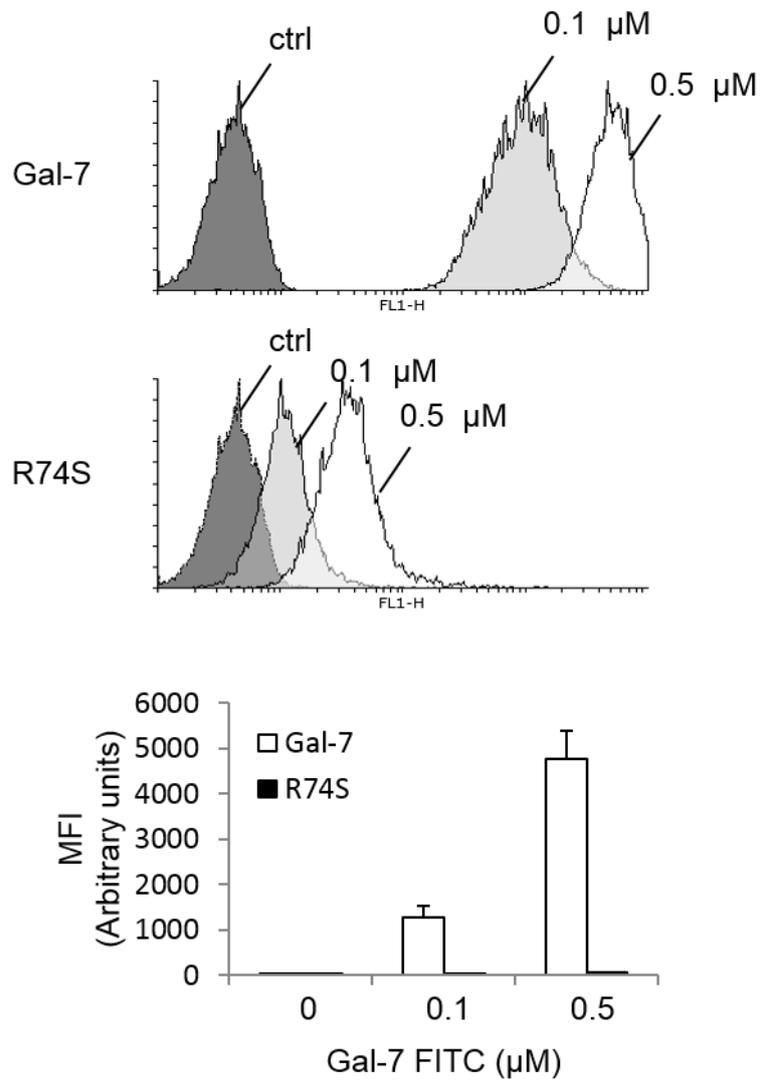


Figure S2.3

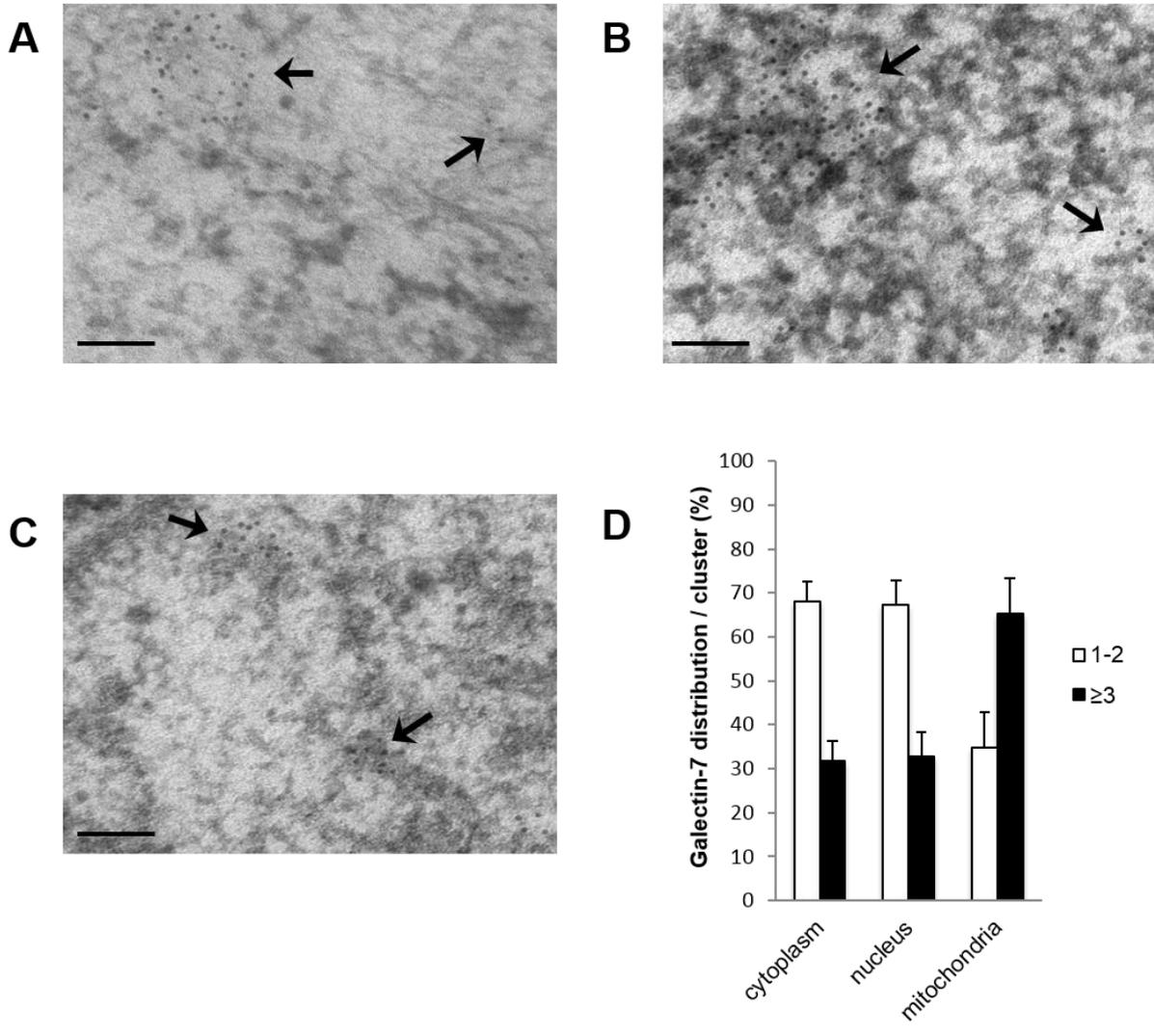


Figure S2.4

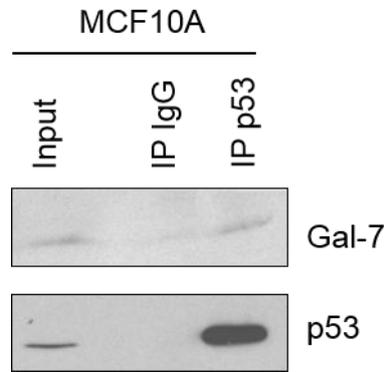
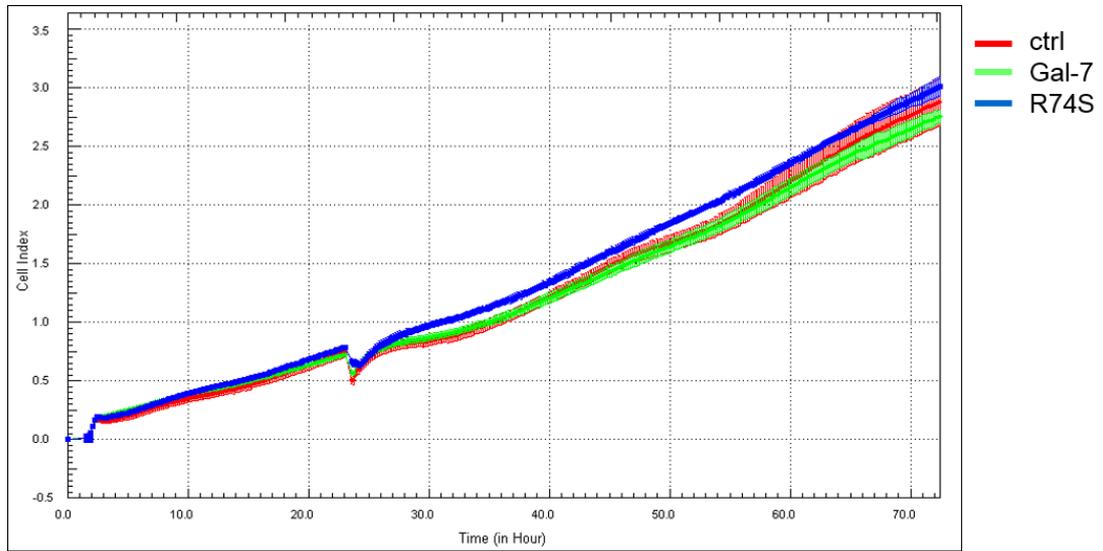


Figure S2.5



CHAPITRE 3

LA SIGNATURE DES GALECTINES CONTRIBUE À L'HÉTÉROGÉNÉITÉ DU CANCER DU SEIN ET FOURNIT DE L'INFORMATION PRONOSTIQUE ADDITIONNELLE ET DE NOUVELLES CIBLES THÉRAPEUTIQUES

Article publié: *Oncotarget* 2016, doi: [10.18632/oncotarget.7784](https://doi.org/10.18632/oncotarget.7784)

RÉSUMÉ

Les interactions dépendantes des glucides sont critiques pour les processus physiologiques, ainsi que pour les fonctions pathologiques. Dans le cancer, ces interactions dépendantes des glucides sont médiées en grande partie par les galectines. Des études précédentes ont démontré que de cibler les galectines offre une possibilité pour le développement d'une nouvelle classe de médicaments anti-cancéreux, particulièrement pour les cancers de sous-types agressifs pour lesquels les options de traitement sont limitées. Malheureusement, la plupart de ces études portent sur les galectines 1 et 3 seulement. Nous devons obtenir la signature des galectines dans les cellules cancéreuses, ainsi que dans le microenvironnement. Le but de cette étude était de fournir la première analyse détaillée de la signature des galectines dans les sous-types moléculaires du cancer du sein. L'expression de la signature des galectines a été obtenue en ARNm et protéine. Une attention particulière a été portée au marquage stromal vs épithélial, ainsi qu'aux compartiments intracellulaires. Chez les patientes atteintes du cancer du sein triple-négatif (TN) et HER-2 positif, nous avons observé qu'une forte expression de *Igals1* et *Igals3* corrèle avec une diminution de la survie totale. Pour les protéines, cependant, les données diffèrent complètement pour plusieurs galectines. L'analyse de la signature stromale a démontré que le stroma positif pour les galectines 1, 3 et 9 est préférentiellement trouvé dans le cancer du sein TN et HER-2 positif. Dans les cellules du cancer du sein, les galectines 1, 3, 8 et 9 ont un patron d'expression double, c'est-à-dire cytosolique ou cytosolique et nucléaire. Dans le cancer du sein TN, les patientes avec de la galectine-8 nucléaire présentent une meilleure survie sans maladie ($p = 0.0243$), sans maladie à distance ($p = 0.0019$) et totale ($p = 0.0292$). En contraste, une forte expression de la galectine-1 nucléaire corrèle avec une faible survie sans maladie à distance ($p = 0.0080$) et totale ($p = 0.0294$). Les patientes atteintes du cancer du sein TN qui possèdent les galectines 1 et 8 au noyau ont une survie sans maladie et sans maladie à distance à 5 ans de 100%, ce qui indique une dominance pour le phénotype de la galectine-8. Dans l'ensemble, les résultats indiquent que la signature d'expression des galectines est hétérogène dans les sous-types agressifs du cancer du sein. Nos données suggèrent que les galectines ont une utilité clinique en tant qu'indicateurs de la progression de la maladie et cibles thérapeutiques dans les sous-types agressifs du cancer du sein.

CONTRIBUTION DES AUTEURS

La conception des expériences a été effectuée par Yves St-Pierre, Louis Gaboury et moi. J'ai réalisé l'ensemble des expériences de cet article: construction et caractérisation des micromatrices tissulaires, immunohistochimie et évaluation du marquage immunohistochimique (score). Einas Yousef et moi avons récolté les données cliniques des patientes. J'ai également effectué l'analyse des données *in silico* et du marquage immunohistochimique. Marilyn Labrie a participé aux analyses statistiques. Maria Claudia Vladiu a récolté des données *in silico*. Yves St-Pierre et moi avons écrit l'article. Tous les auteurs ont révisé et approuvé le manuscrit final.

Galectin signatures contribute to the heterogeneity of breast cancer and provide new prognostic information and therapeutic targets

Andrée-Anne Grosset ^{1,2}, Marilyne Labrie ¹, Maria Claudia Vladoiu ¹, Einas M Yousef ², Louis Gaboury ² and Yves St-Pierre ¹

¹ INRS-Institut Armand-Frappier, 531 Blv des Prairies, Laval, Quebec H7V 1B7, Canada.

² IRIC | Université de Montréal, 2950 Chemin de Polytechnique, Montreal, Quebec H3T 1J4, Canada.

Corresponding Author: Yves St-Pierre, INRS-Institut Armand-Frappier, 531 Blv des Prairies, Laval, Quebec H7V 1B7, Canada. Phone: (450) 686-5354; Fax: (450) 686-5501; E-mail: yves.st-pierre@iaf.inrs.ca

E-mail addresses:

andree-anne.grosset@iaf.inrs.ca

marilyne.labrie@iaf.inrs.ca

maria-claudia.vladoiu@iaf.inrs.ca

enasesawy@hotmail.com

louis.gaboury@umontreal.ca

yves.st-pierre@iaf.inrs.ca

Keywords: breast cancer; triple negative, galectins; tissue microarrays, immunohistochemistry.

ABSTRACT

Because of their ability to induce local immunosuppression and to confer cancer cells with resistance to apoptosis, members of the galectin family are emerging as a new class of actionable targets in cancer. Unfortunately, we have yet to obtain a clear picture of the galectin signatures in cancer cells and the surrounding tumor microenvironment. The aim of this study was to provide the first detailed analysis of the galectin signature in molecular subtypes of breast cancer. Expression signatures of galectins were obtained at the mRNA and protein levels. A particular attention was paid to stromal versus epithelial staining and to subcellular compartmentalization. Analysis of the stromal signature showed that gal-1, -3, -9-positive stroma were preferentially found in triple-negative (TN) and HER2 subtypes. In cancer cells, gal-1, -3, -8, and -9 showed a dual expression pattern, being found either in the cytosol or in the cytosol and the nucleus. TN patients with gal-8-positive nuclei had significantly better disease-free survival (DFS), distant-disease-free survival (DDFS), and overall survival (OS). In contrast, high expression of nuclear gal-1 correlated with poor DDFS and OS. TNBC patients who were positive for both nuclear gal-1 and gal-8 had 5-year DFS and DDFS of 100%, suggesting a dominance of the gal-8 phenotype. Overall, the results indicate that specific galectin expression signatures contribute to the phenotypic heterogeneity of aggressive subtypes of breast cancer. Our data also suggest that galectins have clinical utility as indicators of disease progression and therapeutic targets in aggressive molecular subtypes of breast cancer.

INTRODUCTION

Gene profiling studies have greatly helped at better classifying breast cancer into at least four generally recognized molecular subtypes. Clinically, these molecular subtypes are identified based on the immunohistochemical expression of the estrogen (ER) and progesterone (PR) receptors and of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2), a member of the epidermal growth factor receptor family. These molecular subtypes include luminal A and B, HER2-positive, and triple negative breast cancer (TNBC; ER-, PR-, and HER2-negative tumor) (Perou *et al.*, 2000, Sorlie *et al.*, 2003). Because they lack actionable targets, TNBC and HER2-positive subtypes are thus untreatable with hormone therapies and have a very poor prognosis. The heterogeneity of HER2 and TNBCs at the molecular and cellular levels represents, however, a formidable obstacle to the development of new treatment modalities of these aggressive subtypes (Bedard *et al.*, 2013, Marusyk *et al.*, 2014). Such challenge is further complicated by the complexity of the tumor microenvironment (TME) which plays a critical role in the disease progression (Junttila *et al.*, 2013).

Carbohydrate-dependent interactions are critical in many physiological processes as well as in pathological abnormalities, most notably in cancer. Outside the cells, these interactions are well known to facilitate intercellular communications, increasing the stability of growth receptors via lattice formation, and modulating the immune response following binding to cell surface receptors (Garner *et al.*, 2008). Inside the cells, they modulate signaling cascades, direct trafficking of proteins or contribute to the regulation of gene expression by binding to transcription factors or proteins involved in mRNA splicing (Vladoiu *et al.*, 2014).

In cancer, such carbohydrate-dependent interactions are mediated in a large part by galectins, an evolutionarily ancient family of soluble proteins that bind N-linked and O-linked beta-galactosides via a conserved Carbohydrate Recognition Domain (CRD). Galectins were first isolated from chick muscle and calf heart and lungs and have since been named in the order of discovery (Barondes *et al.*, 1994a, Levi *et al.*, 1981). The 15 members of the family are generally classified according to the number and structure of their CRD. Galectins are therefore divided into tandem, dimeric and chimeric galectins. Dimeric galectins (galectins-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 and -15) have two identical CRD subunits while tandem ones (galectins-4, -6, -8, -9 and -12) have two distinct CRD subunits. Galectin-3 is the only chimeric galectin discovered in mammals thus far. Galectins-5 and -6 are found only in rodents. There is compelling evidence, however, that prototypic galectins might have non-carbohydrate binding partners and functions (reviewed in Vladoiu *et al.*, 2014). These CRD-independent functions represent a paradigm shift in our understanding of galectin functions.

Our knowledge on the role of galectins in cancer and as biomarkers of disease progression has attracted the interest of many, most notably because these small molecular weight proteins undergo significant changes in their pattern of expression during progression of cancer. Their role in cancer progression, however, is not lacking in subtlety (Liu *et al.*, 2005). While cancer progression is accelerated by some galectins, others clearly inhibit tumor growth and/or formation of metastasis. Moreover, there is increasing evidence that galectins function as alarmins (Than *et al.*, 2009). In response to aggression, they are released via a non-classical secretion pathway in the extracellular space where they play a critical role in controlling the immune response. Such complexity in their behavior represents a true challenge when developing galectin inhibitors or use their expression pattern as predictive biomarkers. Moreover, while most studies have examined one galectin at a time, focusing largely on galectin-1 and galectin-3, it is now well established that normal and tumor cells express more than one galectins, and that multiple galectins could be released in the tumor microenvironment (TME) (Cerliani *et al.*, 2015, Demotte *et al.*, 2014). Defining a galectin signature for specific subtypes is thus critical to identify new therapeutic targets in concert with companion diagnostics and/or molecular signatures to guide therapeutic decisions. In the

present work, we have examined the expression of seven galectins in breast cancer tissues by immunohistochemistry and correlated their expression with the different molecular subtypes of breast cancer.

RESULTS

***In silico* analysis of galectin mRNA expression in breast cancer tissues**

We first used the prognostic module of the Breast Cancer Gene-Expression Miner v3.1 (bc-GenExMiner) public database to investigate galectin expression at the mRNA level among breast cancer molecular subtypes. For each subtype, an expression map containing the percentage of patients with low, intermediate, and high gene expression for *gal-1*, *-2*, *-3*, *-4*, *-7*, *-8*, and *-9* was retrieved. Gene expression values were being beforehand split in order to form three equal groups so that “high expression” represents the 1/3 of the patients with highest expression of a gene and “low expression” is the lower 1/3 of the patients. For example, a representative schematic diagram for *Igals1* shows that *Igals1* expression measured in 1260 samples is at its highest in 41% of patients with basal-like breast and HER2 subtypes of breast cancer (Fig. 3.1A). The diagrams for other members of the galectin family are shown in supplementary figure S3.1. Overall, we found that the relative expression of galectins among the different molecular subtype had a similar distribution, although the percentage of patients with the highest expression of *Igals8*, and to a lesser extent *Igals3*, were lower in patients with a basal-like subtype (Fig. 3.1B).

We next performed an mRNA survival analysis for each galectin using the Breastmark RNA expression database and algorithm that facilitate investigation of prognostic markers in the context of disease-free survival (DFS), distant disease-free survival (DDFS) and overall survival (OS) (Madden *et al.*, 2013). An initial search was performed for breast cancer as a whole, independently of the lymph node status and across the molecular subtypes classified according the PAM50 molecular classifier (Parker *et al.*, 2009). Generation of Kaplan-Meier surviving plots showed no significant differences of DFS between groups of patients with high or low expression level of genes encoding *gal-2*, *-3*, *-4*, *-7*, *-8*, and *-9* (Fig. S3.2). The only notable difference was seen in patients with higher expression of mRNA level of *Igals1*. These patients had a significantly lower ($p = 0.016$) DFS than patients with negative/low levels of *Igals1*, consistent with previous observations that galectin-1 expression correlates with a poor prognosis in breast cancer (E. J. Jung *et al.*, 2007). High expression of *Igals1* is indeed a poor prognostic factor for both lymph node (LN)-positive and negative breast cancer (Table 3.1).

We next focused on aggressive molecular subtypes for which new prognostics are needed. In the case of HER2 molecular subtype, we found that patients with high *Igals3* gene

expression had a significantly ($p = 0.031$) lower OS than patients with lower levels of *Igals3* (Fig. 3.2). In contrast, high *Igals2* expression was associated with a good DFS, although the difference fell just short of the traditional definition of statistical significance (0.064). A similar trend was observed for *Igals2* and *Igals9* in patients with triple-negative breast cancer (Fig. 3.3). High expression levels of *Igals2* ($p = 0.031$), *Igals4* ($p = 0.061$) and *Igals9* ($p = 0.008$) were all good prognostic factors for LN-negative patients (Table 2). *Igals9* ($p = 0.004$) was also a good prognostic factor for patients with luminal B subtype. Similar results were obtained using the ssp2006 as a classifier (Hu *et al.*, 2006) (*Data not shown*). Overall, these results indicate that expression of galectins at the mRNA level can be either a good or bad prognostic markers for patients with aggressive subtypes of breast cancer.

Galectin protein signature in normal and cancerous breast tissues

We next studied the expression of galectins at the protein level by immunohistochemistry (IHC) using tissue microarrays (TMAs) constructed from 213 human breast cancer tumor tissues representative of each molecular subtypes of breast cancer defined based on ER/PR/HER2 status and with clinical data. We first validated the specificity of the IHC reactivity of the commercial antibodies using information from the Human Protein Atlas (Uhlen *et al.*, 2015, Uhlen *et al.*, 2010) and a review of the literature (Supplementary Table 1). Representative positive IHC staining of tissues for each selected antibody showed a complete agreement with the predictions (Supplementary figure S3.3). Once validated, the antibodies were used to examine expression of galectins in normal breast tissues. Our results showed that gal-2 and gal-4 were only weakly expressed in normal breast tissues, with very weak cytoplasmic staining in luminal cells (Fig. 3.4). Also in normal tissues, we found a moderate/high cytoplasmic and/or nuclear staining for all galectins except gal-7, which showed its typical cytoplasmic and nuclear staining in myoepithelial cells (Demers *et al.*, 2010) (Table 3.3). Gal-9 staining revealed a cytoplasmic staining in luminal epithelial cells. Some isolated stromal and epithelial cells were also strongly reactive in the nucleus. These patterns of expression in normal breast tissue were, for most galectins, significantly altered in breast cancer tissues. High levels of galectin expression were observed across all molecular subtypes, except for gal-7, which staining was restricted to HER2 and triple-negative breast cancer (TNBCs). Gal-1-positive staining was also preferentially expressed in TNBCs subtype whereas expression of gal-2, -3, -4, -8, and -9 showed an almost equal distribution in all subtypes, although we could not find any gal-9 positive luminal B samples (Table 4). High levels of gal-1 also showed a significant correlation with Ki-67-positive ($p = 0.048$) staining. Generation of Kaplan-Meier surviving plots showed that high expression levels of gal-3 ($p = 0.0548$) and gal-7 ($p = 0.0786$) were associated with a worse DFS across the molecular subtypes although the differences

barely missed the commonly acceptable statistical significance of $p = 0.05$ (Fig. 3.5). In the case of gal-3, however, this difference was statistically significant ($n = 68$, $p = 0.0327$) for TNBC (*data not shown*). Moreover, high expression levels of gal-3 in TNBC patients correlated ($p < 0.05$) with recurrence (Supplementary Table 2).

Cellular localization of galectins in breast cancer cells

Because previous studies have shown that galectin functions depends on its subcellular localization (Boileau *et al.*, 2008, Takenaka *et al.*, 2004), we examined the subcellular distribution of galectins in breast cancer cells and its association with tumor progression. We found that gal-1, -3, -8, and -9 have a dual expression patterns in breast cancer cells. Their expression is either restricted to the cytoplasmic compartments or found in the cytoplasm and the nucleus in the same cell (Fig. 3.6). We found no evidence of nuclear localization of gal-2 and gal-4, in contrast to gal-7, which is almost always found in both nuclear and cytoplasmic compartments in the same cell (Fig. 3.4).

Prognostic values of subcellular galectins

In the case of gal-1 and gal-2, their respective nuclear and membrane localization correlated with TNBCs (Table 5). In contrast, gal-8 nuclear expression was preferentially found in low grade breast tumor and significantly ($p < 0.0001$) less frequent in TNBCs. Membrane-associated gal-2 ($p = 0.039$) also correlated with high expression of Ki-67. In fact, in TNBC, patients with gal-8-positive nuclear staining had significantly better DFS ($p = 0.0243$), DDFS ($p = 0.0019$), and OS ($p = 0.0292$) (Fig. 3.7). Such correlation was also observed independently of the molecular subtype (Supplementary figure S3.4). In contrast, high expression of nuclear gal-1 correlated with a worst DDFS ($p = 0.0080$) and OS ($p = 0.0294$) in TNBC (Fig. 3.8). Interestingly, patients who were positive for both nuclear gal-1 and nuclear gal-8 had an actual 5-year DFS and DDFS of 100%.

Stromal galectin expression in stromal cells of the tumor microenvironment.

There is increasing evidence that the tumor microenvironment is a key contributor to tumor progression (Junttila *et al.*, 2013). We have thus examined whether galectins are expressed in stromal cells of the tumor microenvironment. We found that gal-1, -3, and -9 are commonly found in cells surrounding the tumor, while expression of other galectins were mostly associated with epithelial cancer cells (Fig. 3.9A). In many cases, staining for gal-1, -3, or -9 were found in both epithelial and stromal cells (approximately 50% in the case of gal-1 and

gal-9 and 75% in the case of gal-3). In other cases, we could clearly distinguish two clear patterns of staining with these galectins, i.e. that gal-1, -3, and -9 expression were either strictly found in epithelial tissues or in stromal cells. Gal-1, -3, -9-positive stroma were preferentially found in tumours from TN and HER2 patients (Fig. 3.9B) and correlated with EGFR-positive, Ki67-positive, and mutated p53 (Table 6). Overall, we found that 22 patients were positive for all three galectins (Table 7). All were high grade tumors or were classified as TNBC/HER2 molecular subtypes. We also found a statistically significant positive correlation between expressions of these galectins (Fig. 3.10).

DISCUSSION

Triple-negative breast cancer is among the most aggressive breast cancer subtypes. To date, there is no clinically available targeted therapy for patients diagnosed with TNBC and approximately 30% of TNBC patients eventually experience distant relapse. The heterogeneity of TNBC makes predicting treatment difficult and remains a major obstacle for the development of TNBC-specific therapeutic targets. In this study, we report that specific galectin expression signatures at the mRNA and protein levels contribute to the phenotypic heterogeneity of TNBC and segregate subsets of aggressive breast cancer into clinically meaningful subtypes.

Gene or protein expression signatures of cancer tissues are generally obtained from whole tumor homogenates, thus reflecting the expression from all cell types present in the tumor. Given the critical role stromal cells in cancer progression, several groups have thus looked at defining signatures that reflects expression profiles of for both cancer and stromal cells (Finak *et al.*, 2008). Such strategy has shown, for instance, that the molecular signature of an immune response is an important prognostic marker in breast cancer and in other cancer forms (Farmer *et al.*, 2009, Finak *et al.*, 2008). Overall, we found that breast cancer stroma was rarely positive for gal-2, -4, -7, and 8. In contrast, gal-1, -3, and -9-positive stroma were frequent, most notably in aggressive molecular subtypes. Interestingly, when released in the extracellular space, these galectins have been shown to contribute induce immune tolerance in various physiological and pathological processes. Such a role as alarmins for galectins has been well documented in pre-eclampsia for several members for the galectin family, including gal-1, -3, and -9 which have been shown to be up-regulated preeclamptic placentas (G. Barrientos *et al.*, 2014, Jeschke *et al.*, 2013, Jeschke *et al.*, 2007, Miko *et al.*, 2013, Than *et al.*, 2009). Galectins are also well known for key role in modulating local and systemic anti-tumor responses in cancer (Rabinovich *et al.*, 2009). This has been particularly well described for gal-1, induces apoptosis of IFN- γ -producing cells and skews the tumor microenvironment toward a Th2 cytokine profile (Juszczynski *et al.*, 2007, Perillo *et al.*, 1995, Rubinstein *et al.*,

2004, Stillman *et al.*, 2006). Gal-1 also contributes to the infiltration of IL-10-producing Treg1 cells to promote the tumor evasion (Cedeno-Laurent *et al.*, 2012). In fact, we found that in some patients (n = 22), all three galectins are expressed in the stroma. Such triple-positive signature was exclusively found in high grade BC and in TNBC (77%) or HER2 (23%) molecular subtypes. Not surprisingly, 75% (16/22) were expressing high levels of Ki-67-positive cells. These results suggest that stromal expression of gal-1, -3, -9 is associated with the most aggressive forms of breast cancer. This possibly explains why absence of gal-3 in preclinical mouse models of breast cancer does not alter tumor progression (Eude-Le Parco *et al.*, 2009). Future analyses with a higher number of patients will be needed to determine whether TNBC/HER2 patients that do express all three galectins in their stroma have a worst prognosis as patients than patients who do not express any or less than three of these galectins. It will also be interesting to identify stromal cells that express galectins and whether they do contribute to the presence of galectins in the extracellular space. Although our IHC staining does not allow to determine which galectins are released in the extracellular space and which cells are responsible for this secretion, historically, the presence of extracellular galectins has been attributed to cancer cells. We cannot exclude the possibility, however, that normal and/or cancer-associated stromal cells release soluble galectins. The presence of circulating levels of galectins in normal individuals certainly supports this possibility. However, given the increasing evidence that intracellular galectins have many cellular functions and the strong cytosolic and nuclear staining that we observed in both cancer and stromal cells, we need to pay a particular attention to their role inside the cells. The emerging evidence that galectins have critical CRD-independent and intracellular functions certainly calls for a refocusing of our efforts on the development of new galectin-specific antagonists.

It is now well established that it is important to distinguish between stromal and tumor cell signatures to help in defining the heterogeneity of TNBCs and to identify new predictive tools and therapeutic targets. In our study, we have pushed this reasoning one step further by examining the subcellular compartmentalization of a galectins. Our approach was motivated by previous reports showing that members of the galectin family are well known for their heterogeneous pattern of expression and their wide range of biological functions, most notably as modulator of the immune response (Rabinovich *et al.*, 2009). Overall, we found that galectins can be potential biomarkers of good and bad prognosis. Gal-1, -3, and -9 expressions in stroma or in tumor cells were all associated with a bad prognosis. Expression of gal-7 was also associated with a bad prognosis, as we previously reported (Demers *et al.*, 2010). In contrast to gal-1, -3, and -9, gal-7-positive staining was strictly found in the cytosol and nucleus of epithelial cells of approximately 25% of TNBC and HER2 molecular subtypes. It was not found in luminal A or B subtypes. In the case of gal-2, positive staining was found in all

molecular subtypes but its membrane-associated form was also associated with a bad prognosis, as shown by its preferential association with TNBCs and Ki-67-positive staining. Gal-8 was the only galectin that we found was associated with a good prognosis. This association was observed when we took into consideration its nuclear localization in epithelial cells, which correlated with negative/low Ki-67 staining. Overall, these signatures are clearly different from that recently reported in the case of prostate cancer (Laderach *et al.*, 2013). The authors found that gal-1 was the most abundantly expressed galectin in prostate cancer tissue. In contrast, other galectins (including gal-3, -4, -9, and 12) were expressed at lower levels whereas expression of gal-8 remained unchanged. Although the authors have not examined whether changes in subcellular localization or in the stromal cells occurred, these differences suggest that galectin signatures in cancer are tissue-specific and contributes to the heterogeneity of cancer (Fig. 3.11).

Our results showing that nuclear gal-8 is associated with a good prognosis and that nuclear gal-1 is associated with a negative prognosis are eloquent examples of the importance of taking into account the subcellular localization of proteins with a wide range of subcellular localization. Interestingly, in patients that expressed both nuclear gal-1 and gal-8, the phenotype of gal-8 was clearly dominant. Despite having nuclear gal-1, the 5-year survival rate of patients expressing nuclear gal-8 was 100%. Such dominance for gal-8 also suggests that both galectins have distinct (and contradictory) nuclear functions and that nuclear galectins undergo profound changes during cancer progression. These results uncover the clinical significance of nuclear gal-8 suspected from previous observations in normal and breast tissues (Danguy *et al.*, 2001). Historically, gal-8 has been mostly recognized “matricellular extracellular protein” that mediates cell-matrix adhesion following binding to cell-surface integrins (Levy *et al.*, 2001). Although our approach is not sensitive enough to confirm the presence of gal-8 outside the cell surface, our data showing strong nuclear and cytosolic gal-8 is consistent with other reports that have shown that gal-8 shuttles between the nucleus and the cytosol in cancer cells (Elola *et al.*, 2014). Although the molecular mechanism regulating gal-8 (and gal-1) trafficking in the nucleus is currently unknown, it will be interesting to test whether karyopherins are involved. These proteins have been shown to regulate nucleus-cytoplasm transport of galectin-3 (Nakahara *et al.*, 2006). Gal-8, however, is possibly not the only members of the galectin family to be associated with a good prognosis in breast cancer. Preliminary *in silico* analysis using the bc-GenExMiner database shows that high expression of *Igals12*, *Igals13*, and *Igals14* correlates with a good prognosis in LN-negative and luminal B patients (Supplementary figure S3.5). Future work will be needed, however, to determine their expression patterns and the good prognostic potential at the protein level.

Our study is the first study that provides a detailed analysis of the galectin protein signature in

molecular subtypes of breast cancer. This signature is clearly different from the mRNA signatures obtained from *in silico* analyses of public databases (Miwa *et al.*, 2013). For example, our analysis using the bc-GenExMiner database shows that gal-1, -2, -3, -4, -7, -8, and -9 were all expressed at the mRNA level in breast tumor tissues and had a relatively similar distribution among the molecular subtypes. While such databases clearly help in our understanding of breast cancer and facilitate the identification of novel intrinsic subtypes, caution should be exercised when evaluating the prognostic or therapeutic potential of a given gene, especially genes encoding multifunctional proteins like galectins. A case in point is the relevance of measuring cytoplasmic versus nuclear gal-8 or gal-1 staining. This is a critical issue given that a considerable amount of efforts are underway for the development of galectin inhibitors for the treatment of cancer.

MATERIAL AND METHODS

In silico analysis

The prognostic module of bc-GenExMiner v3.1 (Breast Cancer Gene-Expression Miner v3.1) (Jezequel *et al.*, 2012) was used to correlate survival with each member of the galectin family. Gene expression maps represent the percentage of patients with low, intermediate and high gene expression according to molecular subtypes. Kaplan-Meier survival curves (disease free, distance disease free and overall survival) of 4738 patients were obtained from the algorithm BreastMark (Madden *et al.*, 2013) and the classifier PAM50 (Parker *et al.*, 2009).

Patients and tumor materials

A cohort of 213 patients diagnosed with primary breast cancer between 2003 and 2008 at the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) was used for the study. Tumors were selected on the basis of the histological diagnosis according to the classification of the Modified Scarff-Bloom-Richardson-Elston-Ellis grading system (SBR-EE) (Elston *et al.*, 1991). The cohort consisted of both low-grade and high-grade ductal carcinomas and of carcinomas with medullary features. Estrogen receptor status was positive in all low-grade carcinomas. This study was approved by the research ethics committee (CÉR) of the research centre at the CHUM (study SL05.019), in accordance with the Tri-Council Policy Statement on Research with Human Subjects. Consents directly from patients were not required in this study as per Ethics Board guidelines.

Tissue microarrays and Immunohistochemistry

Formalin-fixed paraffin-embedded material from each primary tumor sample was used to construct tissue microarrays with an automated arrayer design to construct high-density tissue micro-array blocks (ATA-27 Beecher Instruments, Sun Prairie, WI). To that end, triplicate 1 mm cores from each tumor and control tissues were punched out and arrayed into six recipient blocks. For immunohistochemical analysis, three-micrometer thick sections were prepared from each TMA. Immunostaining reactions for each galectin were carried out using the Discovery XT automated immunostainer (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). Deparaffinized sections were incubated in cell conditioning pH 8, except for anti-galectin-2 (pH 6), for antigen retrieval and then with primary antibodies for 1 to 3 hrs: mouse monoclonal anti-galectin-1 (1:50; Novocastra, Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, United Kingdom), rabbit polyclonal anti-galectin-2 (1:100; Proteintech Group, Chicago, IL, USA), rabbit monoclonal anti-galectin-3 (1:1000; Abcam, Cambridge, MA, USA), goat polyclonal anti-galectin-4 (1:200; Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA), goat polyclonal anti-galectin-7 (1:1000; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), rabbit polyclonal anti-galectin-8 (1:50; Abcam) and rabbit polyclonal anti-galectin-9 (1:100; Abcam). The slides were counterstained with hematoxylin and bicarbonate. Each section was scanned at a high resolution using the Nanozoomer Digital Pathology (Hamamatsu, Bridgewater, NJ). The validation of antibodies specificity was assessed using a tissue microarray of 21 different human normal tissues. Positive and negative controls were evaluated according to publications. The omission of the primary antibody was also used as a negative control. All antibodies were validated by their respective company and anti-galectin-1, 2, 3, 4 and 7 were used in previous publications (de Vasconcelos Carvalho *et al.*, 2013, Demers *et al.*, 2010, J. H. Jung *et al.*, 2012, Tripodi *et al.*, 2009, L. P. Wang *et al.*, 2013).

Evaluation of immunohistochemical staining

The percentage of staining was scored from 0 to 4 according to the percentage of positive cells displaying galectins expression within a sample (0 (0-9%); 1 (10-25%); 2 (26-50%); 3 (51-75%); 4 (76-100%). The intensity of staining was also scored from 0 to 4, with a score of 0 representing no staining and a score of 4 representing the strongest staining observed. Histological scores were calculated by adding both scores and a strong expression was defined by a score of 6 to 8. This scoring system is somewhat comparable to the Allred score (Allred *et al.*, 1998, Mohsin *et al.*, 2004).

Statistical analysis

Kaplan-Meier curves and relationship between proteins expression were assessed using GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, San Diego, CA). For Fisher's exact test, chi-square test and spearman analysis, SPSS Statistics (IBM Corporation, Armoncon, NY) was used. A P value of 0.05 or less was considered statistically significant.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Julie Hinsinger, Micheline Fortin, Mirela Birlea and Romain Sabina for their technical support at IRIC's histology core facility and Hugues Richard for assistance with statistical analyses.

GRANT SUPPORT

Supported by grants to Y.S-P. from the National Science and Engineering Research Council of Canada (Grant No. 298215-2013). A.A.G. and M.L. are supported by a Ph.D. studentship from the Fonds de Recherche du Québec-Santé (FRQS).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

FIGURE LEGENDS

Figure 3.1: Gene expression map of *Igals1* in PAM50 molecular subtypes of breast cancer using bc-GenExMiner database. A. The map shows the percentage of patients with low, medium and high expression of *Igals1* mRNA in each molecular subtype: Basal-like (ER-, HER-2-), HER-2E (HER-2 enriched), Luminal A (ER+, HER-2-, low proliferation) and Luminal B (ER+, HER-2-, high proliferation). The number of patients for each subtypes is shown. **B.** The distribution for *Igals1*, *Igals2*, *Igals3*, *Igals4*, *Igals7*, *Igals8*, and *Igals9* in each molecular subtypes.

Figure 3.2: Prognostic role of galectin genes in HER2 breast cancer. Kaplan-Meier estimates of overall survival in HER2 patients expressing low or high galectin expression. These figures were generated using BreastMark public database.

Figure 3.3: Prognostic role of galectin genes in triple-negative breast cancer. Kaplan-Meier estimates of OS in TNBC patients expressing low or high galectin expression. These figures were generated using BreastMark public database.

Figure 3.4: Galectins expression in normal mammary gland and breast cancer tissues. *Left panels*, representative images of galectin expression in normal mammary and breast cancer tissues. The histograms on the right represent the percentage of molecular subtypes expressing high levels for each galectin: TN (triple-negative; ER-, PR-, HER-2-), H2 (HER-2 positive; ER-, PR-, HER-2+), LA (Luminal A; ER+, HER-2-), LB (Luminal B; ER+, HER-2+). LG (low grade). All scale bars 25 μ m.

Figure 3.5: Prognostic potential of galectin in across molecular subtypes of breast cancer. Kaplan-Meier estimates of 5-year DFS in breast cancer patients with low or high galectin expression independently of the molecular subtype.

Figure 3.6: Subcellular localization of galectins in breast cancer tissues. Representative IHC stainings of galectin expression in breast cancer tissues. All scale bars, 25 μ m. The lower circle graphs show the percentage of galectin-positive staining in the cytosol only (C), at the membrane (M) and in the cytosol and nuclei (C/N).

Figure 3.7: Prognostic potential of nuclear galectin-8 in TNBC. Kaplan-Meier estimates of 5-year DFS, DDFS, and OS in TNBC breast cancer patients expressing cytosolic (C) or cytosolic and nuclear (C/N) galectin-8.

Figure 3.8: Prognostic potential of nuclear galectin-1 and -8. *Upper histograms*, Kaplan-Meier estimates of 5-year DDFS and OS in TNBC breast cancer patients expressing cytosolic (C) or cytosolic and nuclear (C/N) galectin-1. *Lower histograms*, Kaplan-Meier estimates of 5-year DDFS and DFS in breast cancer patients expressing nuclear galectin-1 and/or galectin-8.

Figure 3.9: Stromal expression of galectins. **A.** Representative IHC staining of galectin-1, -3, and -9 expression in epithelial (E) and stromal (S) cells in breast cancer tissues. All scale bars, 50 μ m. **B.** Bar histograms showing the percentage of cases with high levels of expression of stromal galectin-1, -3, and 9 in molecular subtypes. **C.** Correlation between galectin-1, -3, and -9 expression in breast cancer tissues measured across the molecular subtypes.

Figure 3.10: Correlation between galectin-1, -3, and -9 expression in breast cancer tissues. Correlations were measured across the molecular subtypes.

Figure 3.11: Schematic diagram highlighting galectin expression patterns in breast cancer tissues.

Table 3.1 High mRNA expression as a poor prognostic factor for DFS using the pam50 classifier

	Across		LN-pos		LN-neg		Lum A		Lum B		HER2		Basal	
	n	P	n	P	n	P	n	P	n	P	n	P	n	P
<i>Lgals1</i>	2652	0.016	744	0.049	1183	0.044	823	0.410	1013	0.614	286	0.452	424	0.047
<i>Lgals3</i>	2601	0.031	714	0.546	1161	0.100	811	0.663	998	0.313	275	0.031	412	0.637
<i>Lgals7</i>	455	0.245	173	0.163	173	0.864	153	0.038	146	0.200	66	0.965	72	0.220
<i>Lgals8</i>	2497	0.726	672	0.218	1105	0.613	783	0.699	950	0.604	273	0.294	407	0.794

Table 3.2 High mRNA expression as a good prognostic factor for DFS using the pam50 classifier

Gene	Across		LN-pos		LN-neg		Lum A		Lum B		HER2		Basal	
	n	P	n	P	n	P	n	P	n	P	n	P	n	P
<i>Lgals2</i>	2952	0.558	719	0.998	1155	0.031	807	0.795	987	0.732	275	0.064	419	0.085
<i>Lgals4</i>		0.281	744	0.537	1183	0.061	823	0.449	1013	0.353	286	0.685	424	0.253
<i>Lgals9</i>	2652	0.350	744	0.393	1183	0.008	823	0.562	1013	0.004	286	0.679	424	0.083

Table 3.3 Galectins distribution, cellular localization and intensity in normal mammary gland

	Breast epithelial cells			Stroma	
	Luminal cells	Myoepithelial cells	Intensity	Localization	Intensity
Gal-1	-	c, n	moderate	e, c, n	high
Gal-2	c	-	weak	e, c	moderate
Gal-3	c	c	high	e, c, n	high
Gal-4	c	-	weak	c	weak
Gal-7	-	c, n	moderate	-	-
Gal-8	c	c	moderate	e, c	moderate
Gal-9	c	c, n	moderate	e, c, n	high

Abbreviations: c, cytoplasmic; n, nuclear; e, extracellular

Table 3.4 Histoclinical correlations of breast cancers according to galectins expression in cancer cells

	Gal-1 % (n)		Gal-2 % (n)		Gal-3 % (n)		Gal-4 % (n)		Gal-7 % (n)		Gal-8 % (n)		Gal-9 % (n)	
	Neg/ Low	High	Neg/ Low	High	Neg/ Low	High	Neg/ Low	High	Neg/ Low	High	Neg/ Low	High	Neg/ Low	High
Molecular subtype	P = 0.001													
Triple neg	14(26)	25(47)	6(12)	33(62)	9(16)	30(56)	4(8)	36(66)	29(54)	10(18)	12(21)	29(52)	21(39)	18(33)
HER-2	10(18)	7(13)	4(8)	14(26)	3(6)	15(28)	4(7)	15(27)	13(24)	5(9)	3(6)	15(27)	10(18)	8(15)
Luminal A	26(48)	13(24)	11(21)	26(49)	11(20)	27(50)	4(7)	33(62)	39(71)	0(0)	8(15)	29(52)	20(37)	18(33)
Luminal B	3(6)	1(2)	2(3)	3(5)	2(3)	3(5)	0(0)	4(8)	4(8)	0(0)	2(3)	3(5)	4(8)	0(0)
SBR-EE Grade	P = 0.006													
I (low)	14(24)	5(8)	8(13)	11(18)	1(2)	16(28)	2(3)	15(26)	18(31)	0(0)	5(8)	12(21)	11(19)	7(12)
III (high)	39(67)	42(72)	17(29)	65(112)	23(39)	60(102)	9(15)	74(127)	66(113)	16(27)	21(36)	62(104)	46(78)	36(62)
Age, yr	P = 0.017													
≤45	9(16)	11(20)	5(9)	15(27)	4(8)	15(27)	4(7)	16(30)	16(30)	4(7)	3(5)	16(29)	12(22)	8(15)
>45	44(81)	36(66)	19(35)	62(114)	20(37)	61(111)	8(15)	72(132)	69(126)	11(20)	22(39)	59(107)	43(79)	36(66)
Tumor volume	P = 0.02													
≤10 cm ³	31(52)	26(44)	14(23)	42(72)	12(20)	44(75)	8(14)	47(80)	49(84)	7(12)	13(21)	45(75)	31(52)	25(43)
>10 cm ³	21(36)	22(37)	10(17)	35(59)	14(24)	30(52)	4(7)	41(70)	37(62)	7(12)	13(21)	30(51)	23(39)	21(35)
Lymph node metastasis	P = 0.004													
Negative	32(58)	32(58)	13(23)	51(93)	15(26)	49(87)	6(11)	57(102)	56(101)	7(13)	15(27)	48(85)	35(62)	28(50)
Positive	20(35)	16(28)	11(19)	25(46)	9(16)	28(50)	6(11)	31(56)	29(52)	7(13)	9(15)	28(49)	20(35)	17(31)
ER	P = 0.004													
Neg/ Low	27(50)	34(62)	12(22)	51(94)	12(22)	50(92)	8(15)	55(101)	47(86)	15(27)	17(31)	45(82)	34(62)	27(50)
High	26(48)	13(24)	12(22)	26(48)	13(23)	26(47)	4(7)	34(62)	39(71)	0(0)	8(14)	30(54)	22(40)	17(31)
PR	P = 0.034													
Neg/ Low	43(79)	43(79)	20(38)	66(123)	22(40)	65(119)	10(19)	76(141)	72(132)	15(27)	22(40)	65(118)	49(90)	37(67)
High	10(19)	4(7)	3(6)	10(19)	3(5)	11(20)	2(3)	12(22)	14(25)	0(0)	3(5)	10(18)	7(12)	8(14)
HER-2	P = 0.048													
Neg/ Low	41(74)	38(69)	17(32)	60(110)	19(35)	58(105)	8(15)	69(126)	68(123)	10(18)	20(36)	57(102)	41(74)	37(66)
High	13(24)	8(15)	6(11)	17(31)	5(9)	18(33)	4(7)	19(35)	18(32)	5(9)	5(9)	18(32)	14(26)	8(15)
Ki-67	P = 0.032													
Neg/ Low	36(66)	24(44)	17(31)	43(79)	14(25)	46(85)	9(17)	50(92)	54(99)	6(11)	16(29)	43(76)	35(63)	25(46)
High	18(32)	22(40)	7(12)	34(63)	11(20)	29(53)	3(5)	38(70)	31(56)	9(16)	9(16)	32(58)	21(38)	19(35)

Fisher's exact test and chi-square test

Table 3.5 Histoclinical correlations of breast cancers according to galectins localization in cancer cells

Characteristics	Gal-1 % (n)		Gal-2 % (n)		Gal-3 % (n)		Gal-8 % (n)		Gal-9 % (n)	
	C	C/N	C	M	C	C/N	C	C/N	C	C/N
Age, yr										
≤45	14 (12)	9 (8)	9 (13)	10 (14)	3 (4)	17 (23)	10 (14)	11 (15)	5 (4)	14 (11)
>45	41 (35)	36 (31)	31 (43)	50 (71)	11 (15)	69 (96)	27 (37)	52 (70)	27 (22)	54 (44)
Tumor volume							P = 0.002			
≤10 cm ³	33 (27)	21 (17)	24 (32)	31 (40)	8 (10)	51 (65)	16 (20)	44 (55)	14 (11)	41 (32)
>10 cm ³	24 (19)	22 (18)	14 (19)	31 (40)	7 (9)	34 (43)	22 (28)	18 (23)	17 (13)	28 (22)
Lymph node metastasis							P = 0.043			
Negative	37 (32)	30 (26)	25 (34)	42 (59)	6 (8)	58 (79)	22 (29)	42 (56)	21 (17)	41 (33)
Positive	18 (15)	15 (13)	16 (22)	17 (24)	8 (11)	28 (39)	16 (22)	20 (27)	11 (9)	27 (22)
SBR-EE Grade			P < 0.0001				P = 0.024			
I (low)	6 (5)	4 (3)	12 (15)	2 (3)	1 (1)	21 (27)	2 (3)	15 (18)	1 (1)	15 (11)
III (high)	46 (37)	44 (35)	28 (36)	58 (76)	14 (18)	64 (84)	35 (44)	48 (60)	30 (22)	54 (40)
Molecular subtypes	P = 0.019		P < 0.0001				P < 0.0001			
Triple negative	22 (19)	33 (28)	7 (10)	37 (52)	7 (10)	33 (46)	24 (33)	14 (19)	17 (14)	23 (19)
HER-2 positive	9 (8)	6 (5)	11 (15)	8 (11)	4 (5)	16 (23)	6 (8)	14 (19)	6 (5)	12 (10)
Luminal A	22 (19)	6 (5)	20 (29)	14 (20)	3 (4)	33 (46)	7 (10)	31 (42)	9 (7)	32 (26)
Luminal B	1 (1)	1 (1)	2 (3)	1 (2)	0 (0)	4 (5)	0 (0)	4 (5)	0 (0)	0 (0)
ER expression	P = 0.007		P = 0.007				P = 0.0003			
Neg/ Low	33 (28)	40 (34)	21 (30)	45 (64)	11 (15)	55 (77)	30 (41)	30 (41)	23 (19)	38 (31)
High	22 (19)	6 (5)	19 (27)	15 (21)	3 (4)	31 (43)	7 (10)	33 (44)	9 (7)	30 (24)
PR expression			P = 0.042							
Neg/ Low	50 (43)	42 (36)	32 (45)	55 (78)	12 (17)	73 (102)	35 (47)	52 (71)	28 (23)	54 (44)
High	5 (4)	3 (3)	8 (12)	5 (7)	1 (2)	13 (18)	3 (4)	10 (14)	4 (3)	14 (11)
HER-2 expression			P = 0.023							
Neg/ Low	43 (36)	39 (33)	27 (38)	51 (72)	10 (14)	66 (91)	31 (42)	45 (60)	26 (21)	56 (45)
High	11 (9)	7 (6)	13 (18)	9 (13)	4 (5)	20 (28)	6 (8)	18 (24)	6 (5)	12 (10)
EGFR expression	P = 0.008						P = 0.044			
Neg/ Low	49 (42)	28 (24)	35 (49)	46 (65)	12 (16)	66 (90)	26 (35)	54 (72)	26 (21)	53 (42)
High	6 (5)	17 (14)	6 (8)	13 (19)	2 (3)	20 (28)	11 (15)	9 (12)	6 (5)	15 (12)
Ki-67 expression			P = 0.039				P = 0.002			
Neg/ Low	33 (28)	19 (16)	27 (38)	29 (41)	8 (11)	54 (74)	15 (20)	42 (56)	16 (13)	41 (33)
High	21 (18)	26 (22)	13 (19)	31 (44)	6 (8)	33 (45)	23 (31)	20 (27)	16 (13)	27 (22)

Fisher's exact test and chi-square test

Table 3.6 Histoclinical correlations of breast cancers according to galectins expression in cancer-associated stroma

Characteristics	Gal-1 % (n)		Gal-3 % (n)		Gal-9 % (n)	
	Neg/Low	High	Neg/Low	High	Neg/Low	High
Age, yr						
≤45	16 (30)	3 (6)	15 (28)	4 (7)	15 (27)	6 (10)
>45	57 (104)	24 (43)	61 (112)	20 (36)	54 (98)	26 (47)
Tumor volume						
≤10 cm ³	43 (72)	14 (24)	42 (71)	14 (24)	39 (66)	17 (29)
>10 cm ³	29 (49)	14 (24)	35 (59)	10 (17)	29 (49)	15 (25)
Lymph node metastasis						
Negative	48 (85)	17 (31)	48 (85)	16 (28)	42 (74)	21 (38)
Positive	25 (45)	10 (18)	29 (51)	8 (15)	26 (47)	11 (19)
SBR-EE Grade	P < 0.0001		P = 0.003		P < 0.0001	
I (low)	19 (32)	0 (0)	17 (29)	1 (1)	18 (30)	1 (1)
III (high)	54 (92)	28 (47)	60 (102)	23 (39)	51 (87)	31 (53)
Molecular subtypes	P = 0.0001		P = 0.0516		P < 0.0001	
Triple negative	23 (43)	16 (30)	26 (48)	13 (24)	19 (35)	20 (37)
HER-2 positive	11 (20)	6 (11)	14 (26)	4 (8)	11 (21)	7 (12)
Luminal A	35 (64)	4 (8)	33 (60)	5 (10)	34 (63)	4 (7)
Luminal B	4 (8)	0 (0)	4 (7)	1 (1)	4 (7)	1 (1)
ER expression	P < 0.0001		P = 0.031		P < 0.0001	
Neg/ Low	38 (70)	23 (42)	44 (81)	18 (33)	34 (63)	27(49)
High	35 (65)	4 (7)	33 (60)	5 (10)	34 (63)	4 (8)
PR expression	P = 0.017				P = 0.0005	
Neg/ Low	60 (111)	26 (47)	65 (119)	22 (40)	55 (101)	31 (56)
High	13 (24)	1 (2)	12 (22)	2 (3)	14 (25)	1 (1)
HER-2 expression						
Neg/ Low	58 (105)	21 (38)	58 (106)	19 (34)	53 (96)	24 (44)
High	15 (28)	6 (11)	18 (33)	5 (9)	16 (28)	7 (13)
EGFR expression	P = 0.016		P = 0.007		P < 0.0001	
Neg/ Low	63 (114)	19 (34)	65 (119)	15 (28)	61 (110)	19 (35)
High	10 (18)	8 (15)	11 (20)	8 (15)	7 (13)	12 (22)
Ki-67 expression	P = 0.027		P = 0.007		P = 0.001	
Neg/ Low	48 (87)	13 (23)	50 (92)	10 (18)	47 (85)	13 (24)
High	25 (46)	14 (26)	26 (48)	14 (25)	22 (40)	18 (33)
p53 expression	P = 0.024		P = 0.05		P = 0.013	
Neg/ Low	57 (103)	16 (29)	59 (107)	14 (26)	53 (96)	18 (33)
High	17 (30)	11 (20)	18 (33)	9 (17)	16 (29)	13 (24)

Fisher's exact test and chi-square test

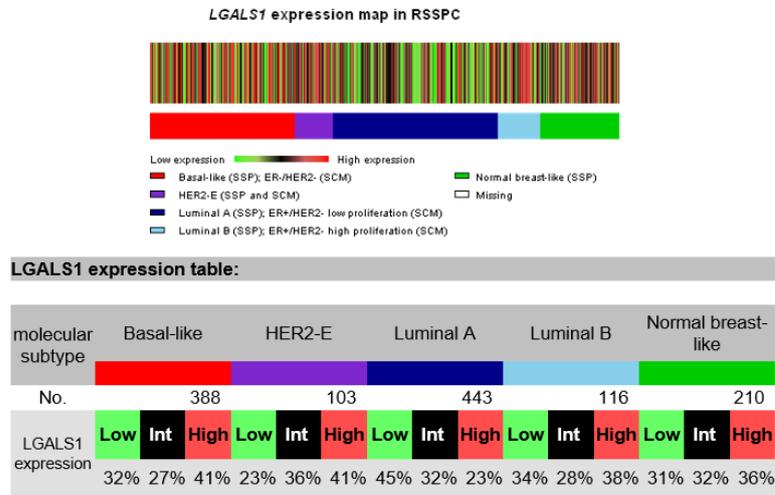
Table 3.7 Histoclinical correlations of breast cancers according to galectins expression in cancer-associated stroma

Characteristics	Gal-1 / Gal-3 / Gal-9 stromal expression		P
	Negative n=104	Triple positive n=22	
Age, yr			0.562
≤45	18% (22)	2% (3)	
>45	65% (81)	15% (19)	
Tumor volume			0.466
≤10 cm ³	48% (55)	9% (10)	
>10 cm ³	34% (39)	10% (11)	
Lymph node metastasis			1.000
Negative	52% (63)	12% (14)	
Positive	30% (36)	7% (8)	
SBR-EE grade			0.003
I (low)	24% (28)	0% (0)	
III (high)	58% (67)	18% (21)	
Molecular subtype			< 0.0001
Triple negative	23% (29)	13% (17)	
HER-2 positive	12% (15)	4% (5)	
Luminal A	42% (53)	0% (0)	
Luminal B (HER-2+)	5% (7)	0% (0)	
ER expression			< 0.0001
Neg/ Low	41% (51)	17% (22)	
High	42% (53)	0% (0)	
PR expression			0.023
Neg/ Low	66% (83)	17% (22)	
High	17% (21)	0% (0)	
HER-2 expression			1.000
Neg/ Low	64% (80)	14% (17)	
High	18% (22)	4% (5)	
EGFR expression			0.0003
Neg/ Low	72% (89)	9% (11)	
High	10% (13)	9% (11)	
Ki-67 expression			0.0005
Neg/ Low	57% (71)	5% (6)	
High	26% (32)	13% (16)	
p53 expression			0.003
Neg/ Low	65% (81)	8% (10)	
High	18% (22)	10% (12)	

Fisher's exact test and chi-square test

Figure 3.1

A



B

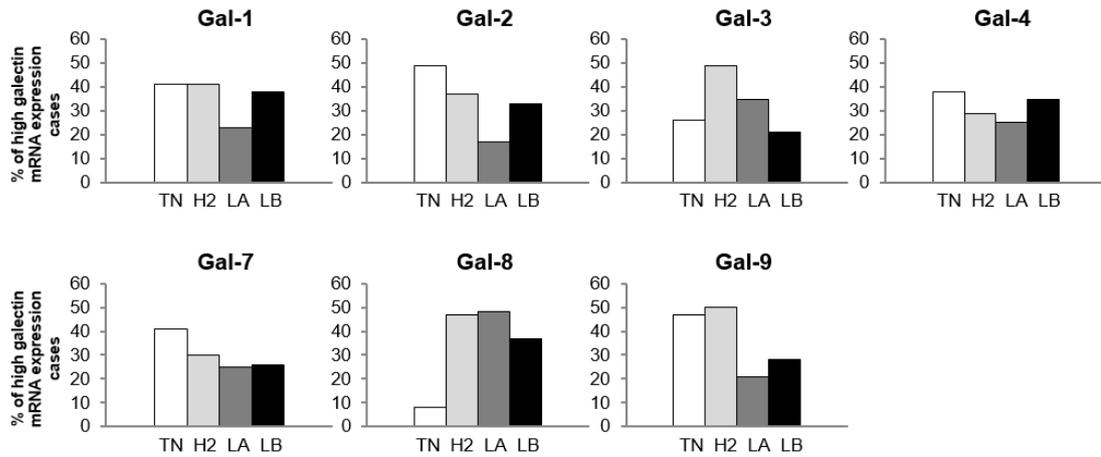


Figure 3.2

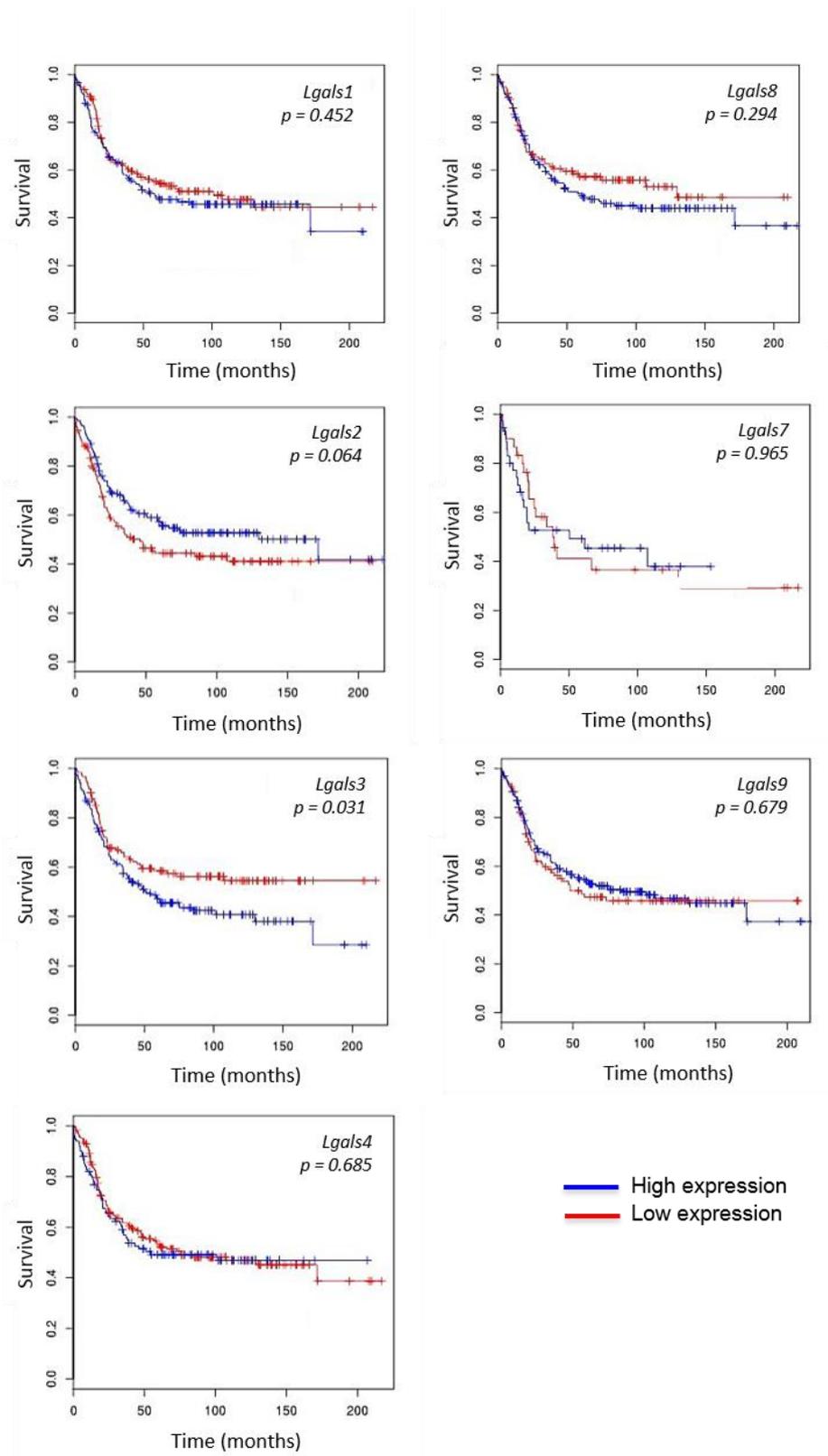


Figure 3.3

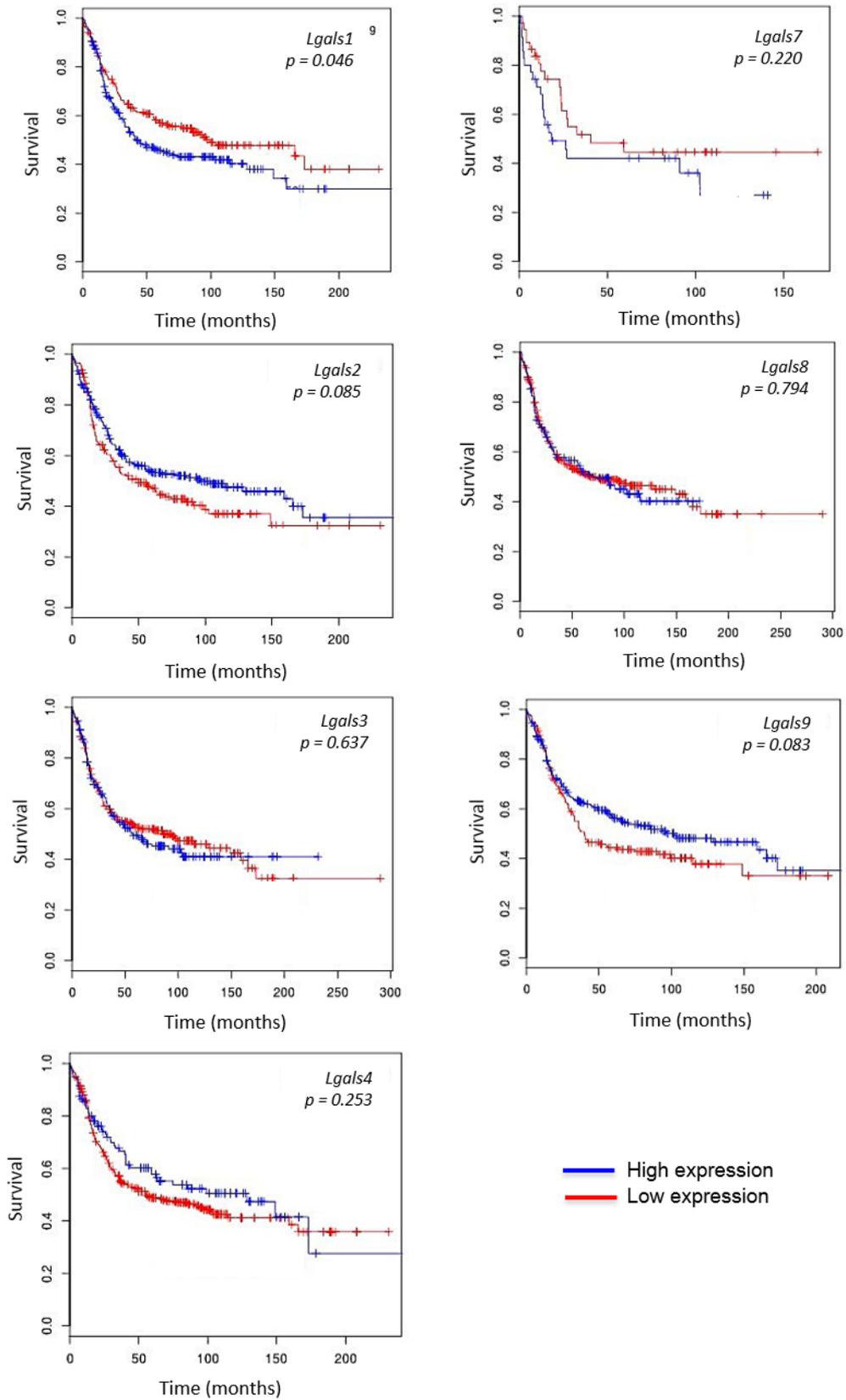


Figure 3.4

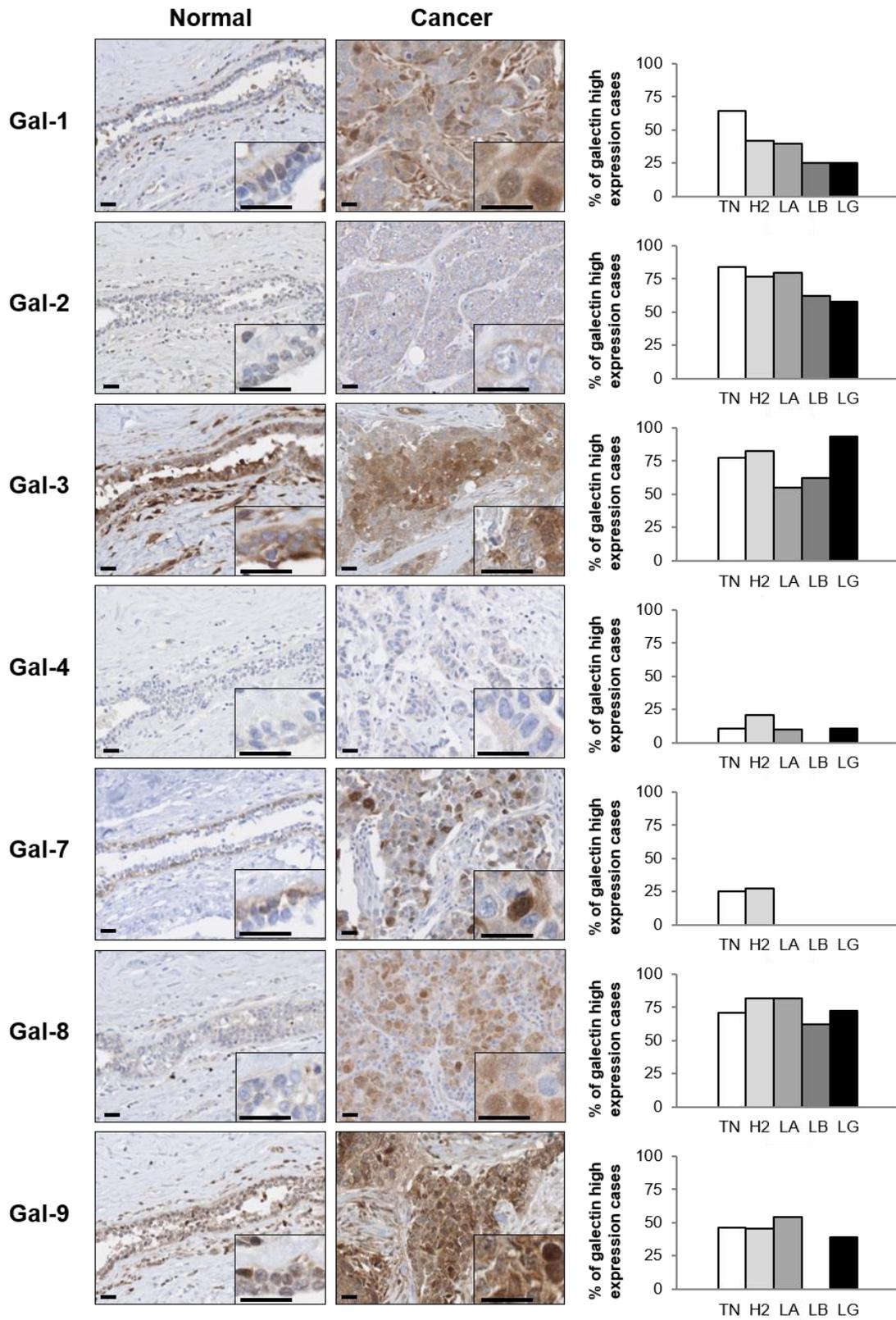


Figure 3.5

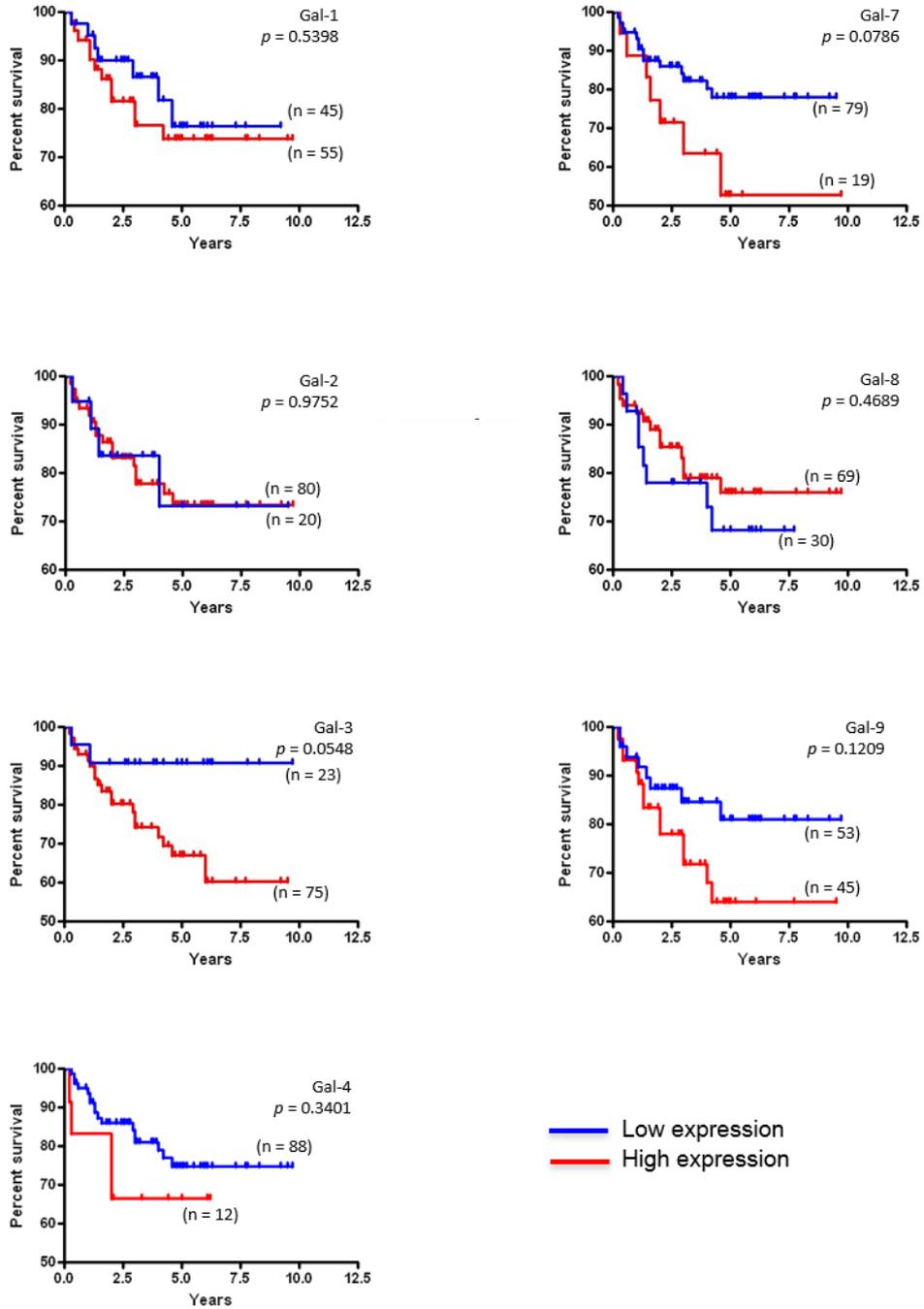


Figure 3.6

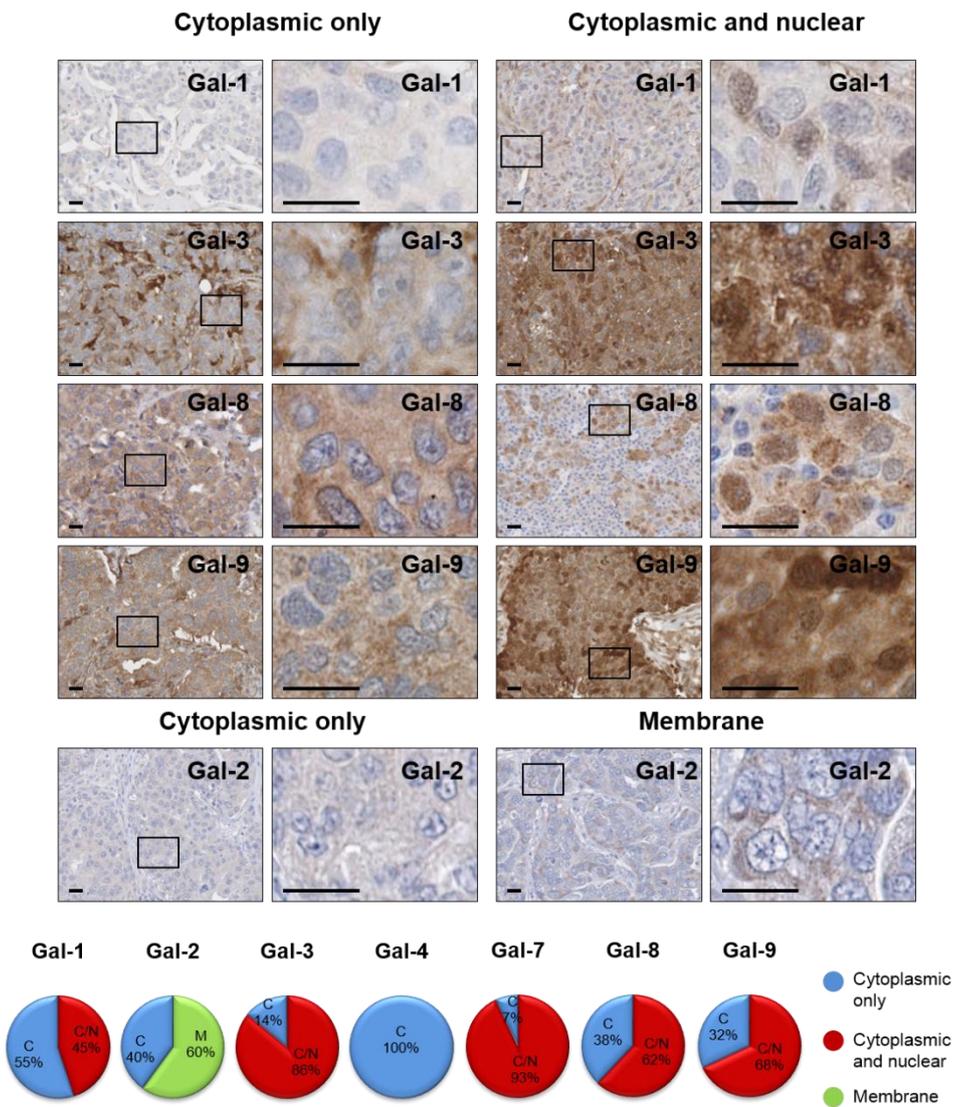


Figure 3.7

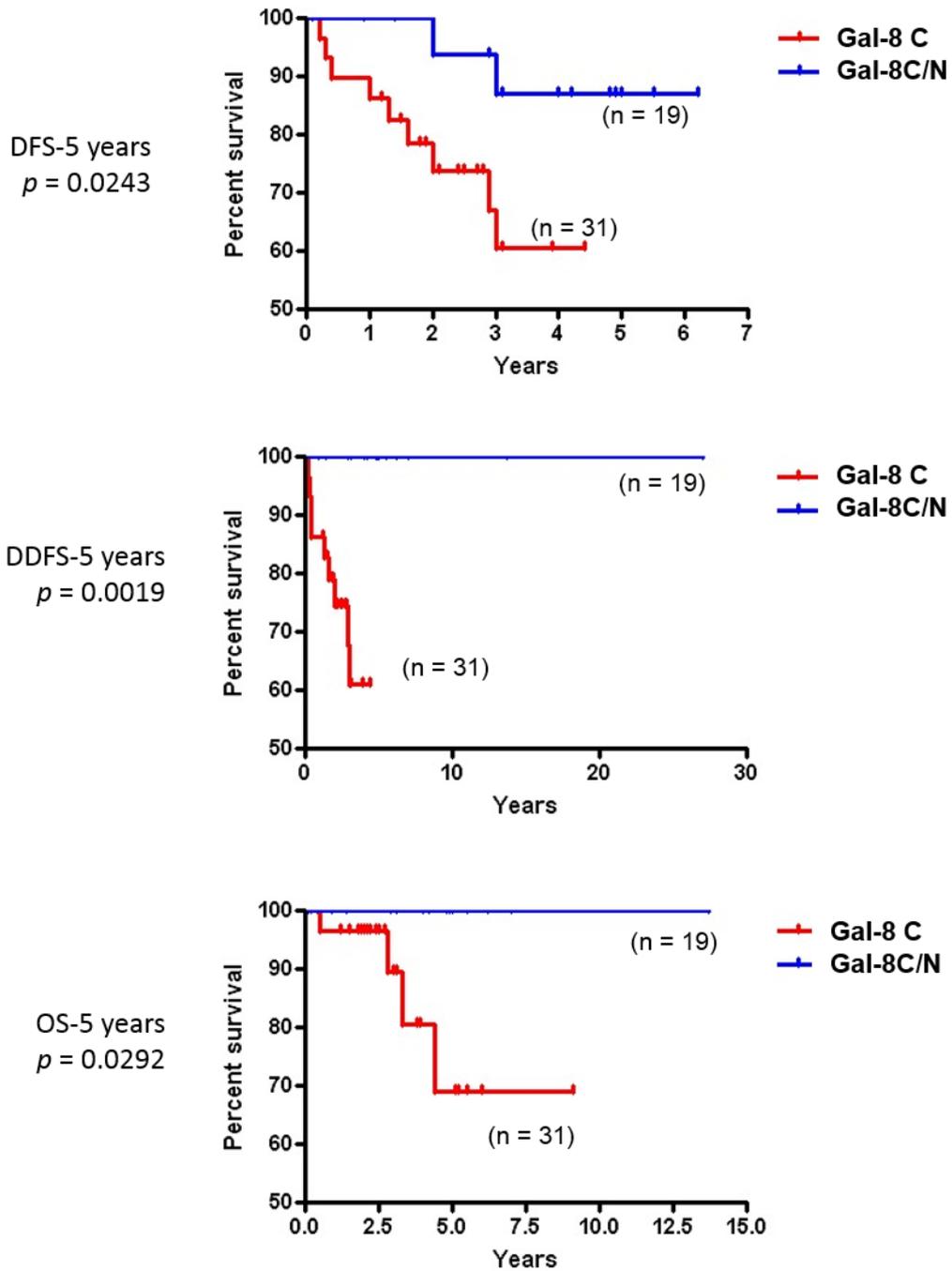


Figure 3.8

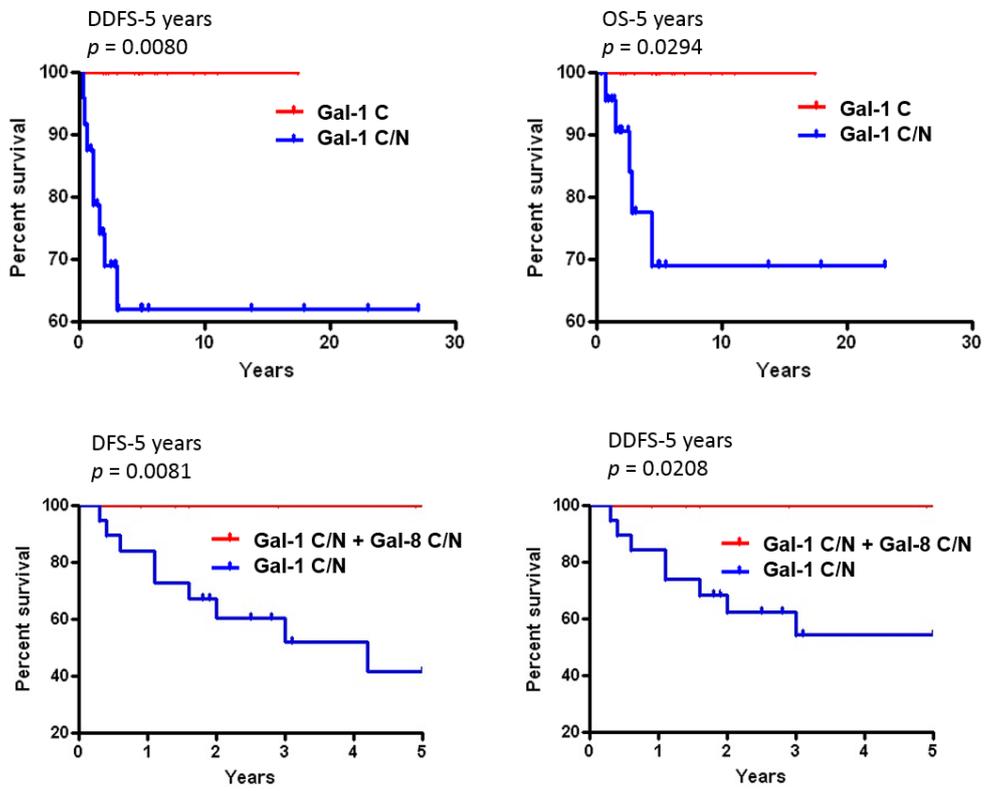


Figure 3.9

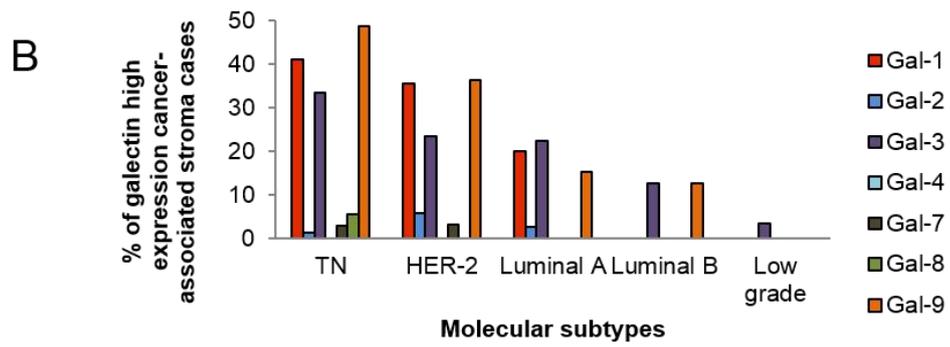
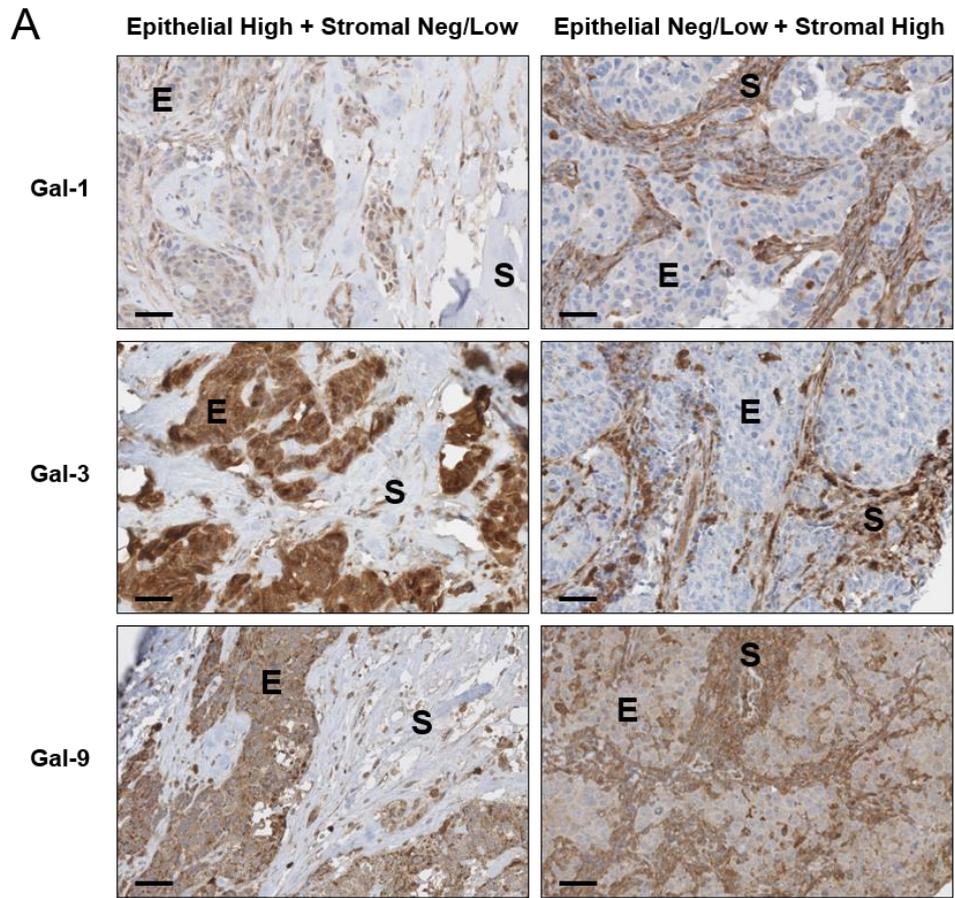


Figure 3.10

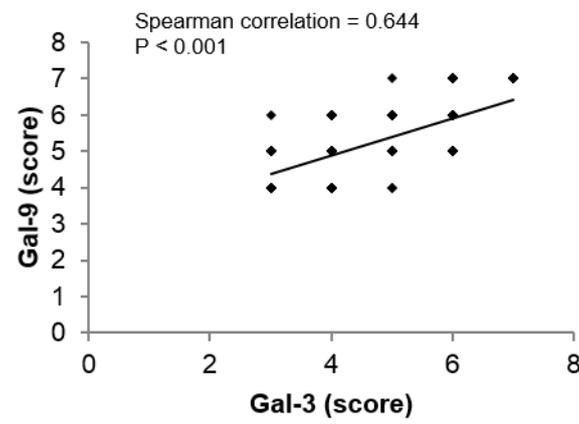
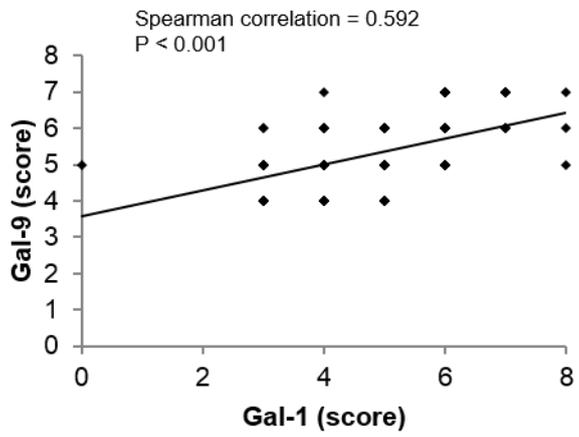
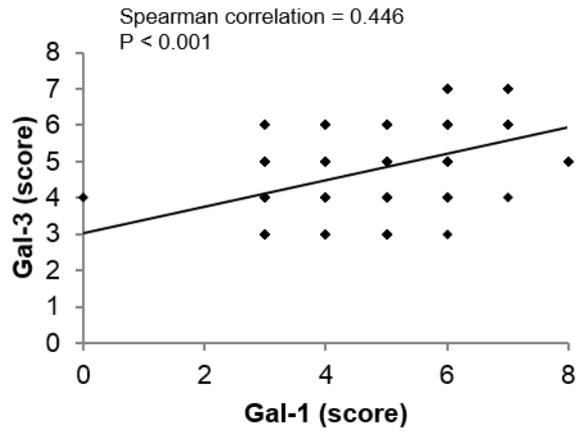
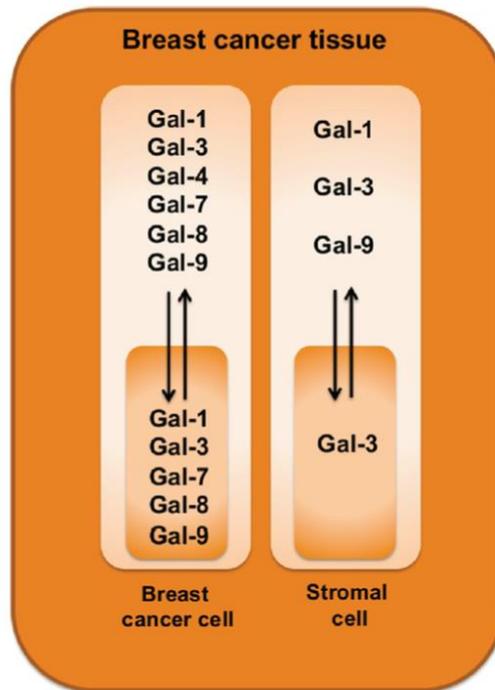


Figure 3.11



SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Figure S3.1: *In silico* analysis of galectins mRNA expression of human breast cancer (bc-GenExMiner). Each map shows the percentage of patients with low, medium and high expression of *lgals2*, 3, 4, 7, 8 and 9 mRNA in each molecular subtype: Basal-like (ER-, HER-2-), HER-2E (HER-2 enriched), Luminal A (ER+, HER-2-, low proliferation) and Luminal B (ER+, HER-2-, high proliferation).

Figure S3.2: Effect of *galectin* gene expression on disease-free survival (DFS) of patients with breast cancer, independently of the LN status and across the molecular subtypes. Kaplan-Meier estimates of overall survival in breast cancer patients expressing low or high *galectin* expression. These figures were generated using BreastMark public database.

Figure S3.3: Representative IHC staining showing positive controls of galectins expression in normal tissues.

Figure S3.4: Prognostic potential of galectin in across molecular subtypes of breast cancer. Kaplan-Meier estimates of 5-year DFS, DDFS and OS in breast cancer patients expressing cytosolic (C) or cytosolic and nuclear (C/N) galectin-8 independently of the molecular subtype.

Figure S3.5: Prognostic potential of *galectin-12*, *-13* and *-14* genes in breast cancer. Kaplan-Meier estimates of overall survival in breast cancer patients expressing low or high *galectin* expression. These figures were generated using BreastMark public database.

Table S3.1 Antibodies validation

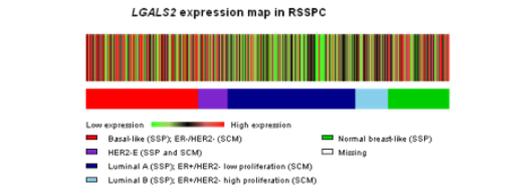
	Company	Validation	Reference
Gal-1	Novocastra	Prostate	Ellerhorst <i>et al</i> , 1999
Gal-2	Proteintech Group	Gallbladder	Saal <i>et al</i> , 2005
Gal-3	Abcam	Endometrium	Brustmann <i>et al</i> , 2003
Gal-4	Santa Cruz	Colon	Huflejt <i>et al</i> , 2004
Gal-7	R&D Systems	Skin	Magnaldo <i>et al</i> , 1998
Gal-8	Abcam	Placenta	Kolundzic <i>et al</i> , 2011
Gal-9	Abcam	Lung	Matsumoto <i>et al</i> , 2013

Table S3.2 Histoclinical correlations of triple negative breast cancers according to galectins expression in cancer cells

	Gal-1 %(n)		Gal-2 %(n)		Gal-3 %(n)		Gal-4 %(n)		Gal-7 %(n)		Gal-8 %(n)		Gal-9 %(n)	
	Neg/ Low	High	Neg/ Low	High	Neg/ Low	High	Neg/ Low	High	Neg/ Low	High	Neg/ Low	High	Neg/ Low	High
Age, yr														
≤45	7(5)	15(11)	4(3)	19(14)	3(2)	19(14)	16(12)	7(5)	18(13)	6(4)	4(3)	18(13)	13(9)	11(8)
>45	29(21)	49(36)	12(9)	65(48)	19(14)	58(42)	73(54)	4(3)	57(41)	19(14)	25(18)	53(39)	42(30)	35(25)
P = 0.013														
Tumor volume														
≤10 cm ³	18(12)	30(20)	7(5)	38(26)	10(7)	35(24)	38(26)	7(5)	36(24)	10(7)	13(9)	34(23)	24(16)	22(15)
>10 cm ³	18(12)	34(23)	9(6)	46(31)	13(9)	41(28)	50(34)	4(3)	42(28)	12(8)	16(11)	37(25)	30(20)	24(16)
Lymph node metastasis														
Negative	29(21)	45(33)	8(6)	65(48)	17(12)	54(39)	66(49)	5(4)	56(40)	17(12)	18(13)	53(39)	36(26)	35(25)
Positive	7(5)	19(14)	8(6)	19(14)	6(4)	24(17)	23(17)	5(4)	19(14)	8(6)	11(8)	18(13)	18(13)	11(8)
P = 0.021														
Recurrence														
No	30(21)	32(23)	7(5)	53(38)	19(13)	41(29)	56(40)	4(3)	46(32)	14(10)	14(10)	45(32)	34(24)	26(18)
Yes	7(5)	31(22)	8(6)	32(23)	3(2)	37(26)	35(25)	6(4)	30(21)	10(7)	16(11)	25(18)	19(13)	21(15)
P = 0.019														
Distant metastasis														
No	31(22)	48(34)	10(7)	67(48)	20(14)	56(39)	69(50)	7(5)	57(40)	19(13)	24(17)	52(37)	40(28)	36(25)
Yes	6(4)	16(11)	6(4)	18(13)	1(1)	23(16)	21(15)	3(2)	19(13)	6(4)	6(4)	18(13)	13(9)	11(8)
Death														
No	34(24)	51(36)	8(6)	75(54)	19(13)	64(45)	74(53)	10(7)	63(44)	20(14)	24(17)	59(42)	43(30)	40(28)
Yes	3(2)	13(9)	7(5)	10(7)	3(2)	14(10)	17(12)	0(0)	13(9)	4(3)	6(4)	11(8)	10(7)	7(5)
P = 0.015														
Ki-67														
Neg/ Low	8(6)	21(15)	5(4)	23(17)	6(4)	24(17)	24(18)	4(3)	21(15)	8(6)	15(11)	14(10)	21(15)	8(6)
High	27(20)	44(32)	11(8)	61(45)	17(12)	54(39)	65(48)	7(5)	54(39)	17(12)	14(10)	58(42)	33(24)	38(27)
P = 0.009														

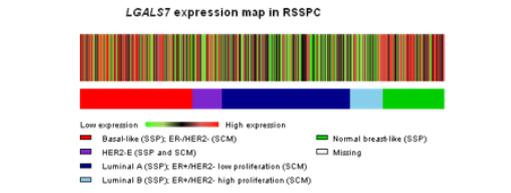
Fisher's exact test and chi-square test

Figure S3.1



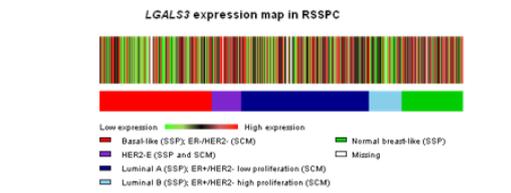
LGALS2 expression table:

molecular subtype	Basal-like			HER2-E			Luminal A			Luminal B			Normal breast-like		
No.	388			102			443			116			210		
LGALS2 expression	Low	Int	High	Low	Int	High	Low	Int	High	Low	Int	High	Low	Int	High
	23%	28%	49%	29%	33%	37%	46%	38%	17%	28%	30%	33%	22%	37%	41%



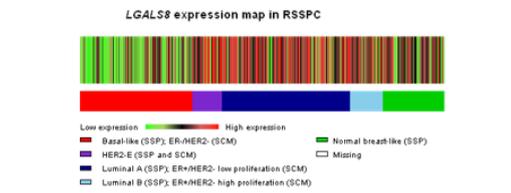
LGALS7 expression table:

molecular subtype	Basal-like			HER2-E			Luminal A			Luminal B			Normal breast-like		
No.	388			103			440			115			209		
LGALS7 expression	Low	Int	High	Low	Int	High	Low	Int	High	Low	Int	High	Low	Int	High
	29%	30%	41%	35%	35%	30%	34%	41%	25%	45%	29%	26%	15%	20%	56%



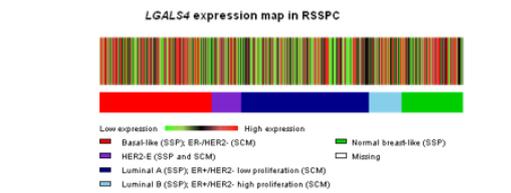
LGALS3 expression table:

molecular subtype	Basal-like			HER2-E			Luminal A			Luminal B			Normal breast-like		
No.	374			99			429			113			207		
LGALS3 expression	Low	Int	High	Low	Int	High	Low	Int	High	Low	Int	High	Low	Int	High
	42%	33%	26%	13%	37%	49%	28%	36%	35%	55%	24%	21%	18%	35%	47%



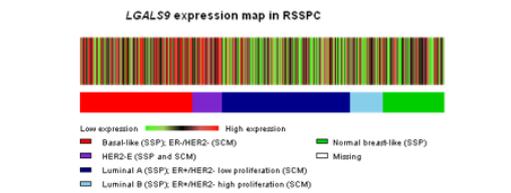
LGALS8 expression table:

molecular subtype	Basal-like			HER2-E			Luminal A			Luminal B			Normal breast-like		
No.	387			103			440			115			210		
LGALS8 expression	Low	Int	High	Low	Int	High	Low	Int	High	Low	Int	High	Low	Int	High
	71%	21%	8%	25%	28%	47%	18%	35%	48%	27%	36%	37%	30%	42%	20%



LGALS4 expression table:

molecular subtype	Basal-like			HER2-E			Luminal A			Luminal B			Normal breast-like		
No.	388			103			443			116			210		
LGALS4 expression	Low	Int	High	Low	Int	High	Low	Int	High	Low	Int	High	Low	Int	High
	20%	34%	38%	37%	34%	29%	35%	40%	25%	29%	35%	35%	25%	30%	37%



LGALS9 expression table:

molecular subtype	Basal-like			HER2-E			Luminal A			Luminal B			Normal breast-like		
No.	387			103			443			116			210		
LGALS9 expression	Low	Int	High	Low	Int	High	Low	Int	High	Low	Int	High	Low	Int	High
	22%	31%	47%	15%	36%	50%	46%	34%	21%	35%	36%	28%	38%	38%	24%

Figure S3.2

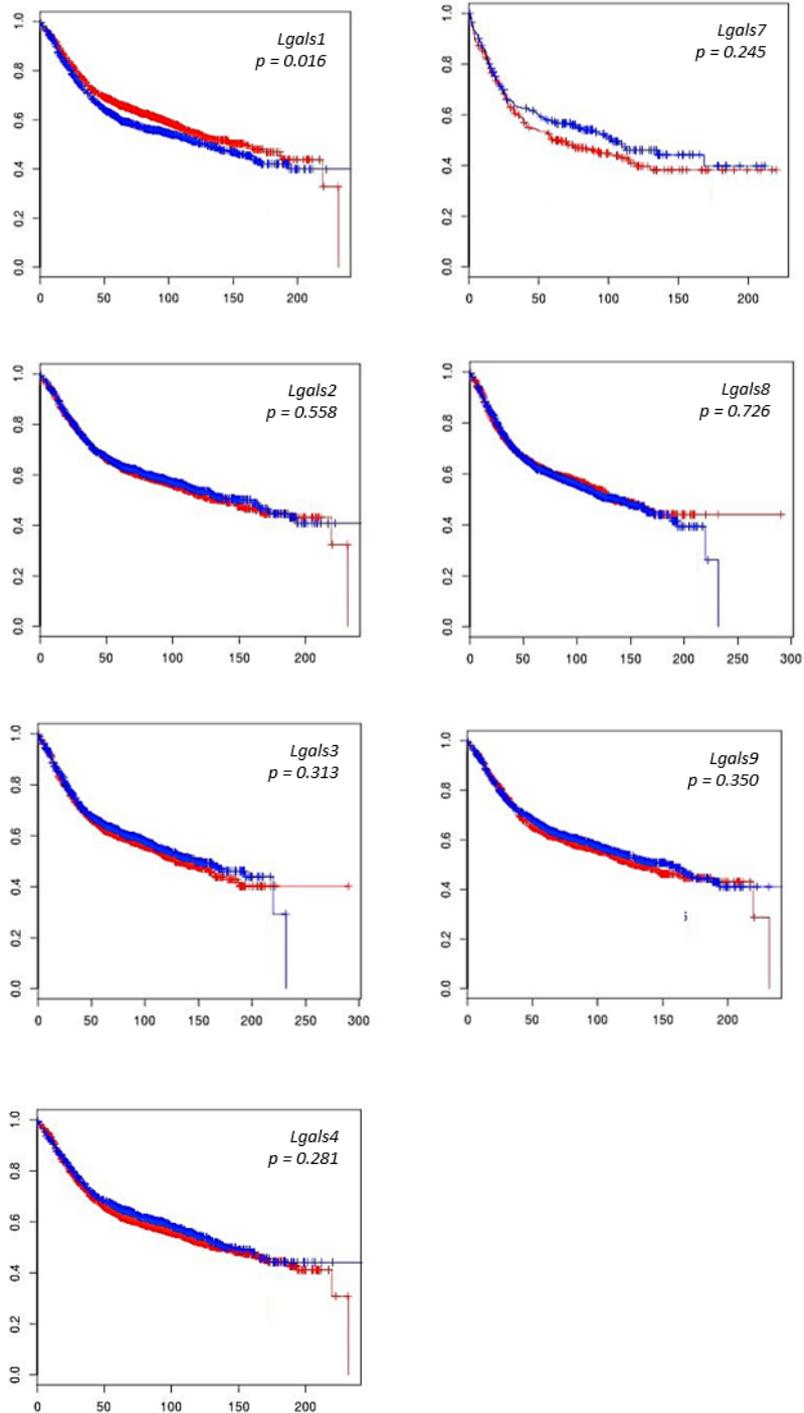


Figure S3.3

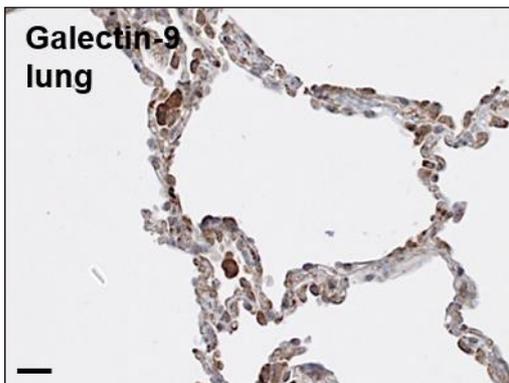
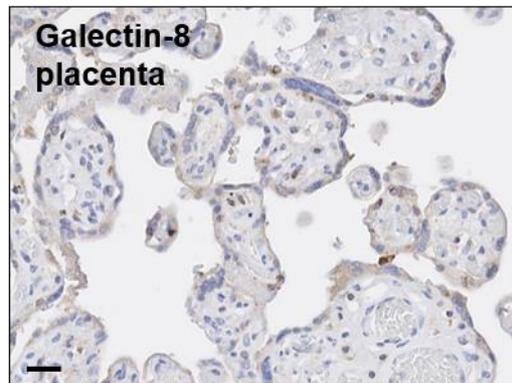
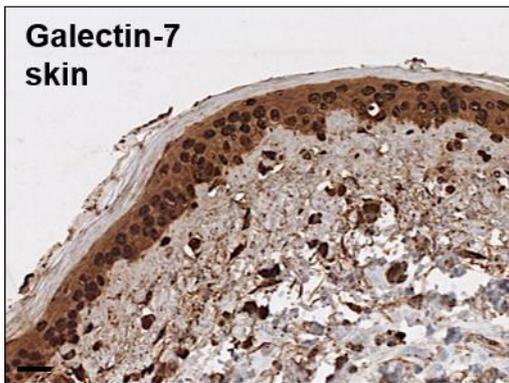
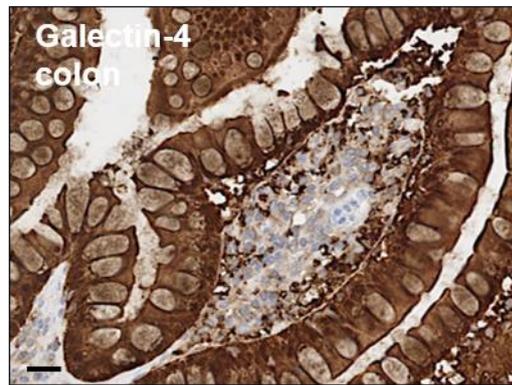
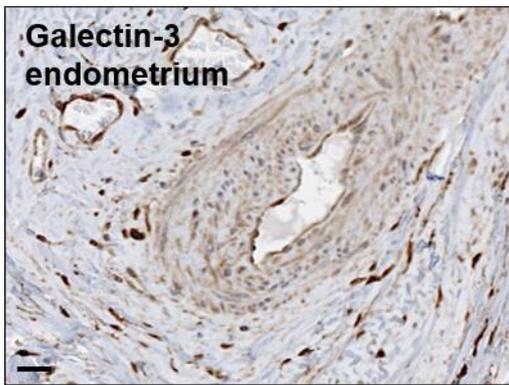
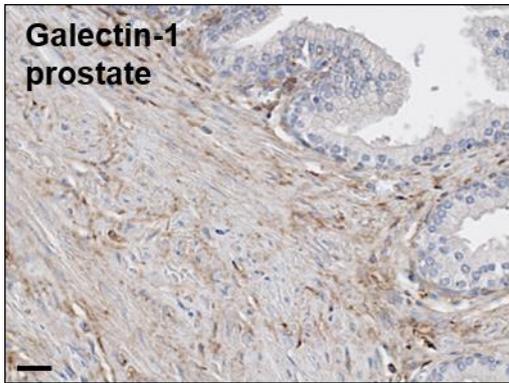


Figure S3.4

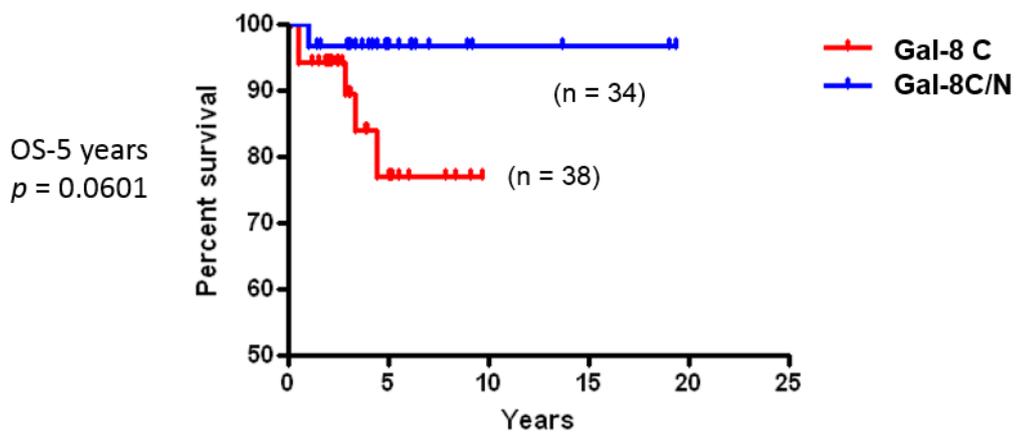
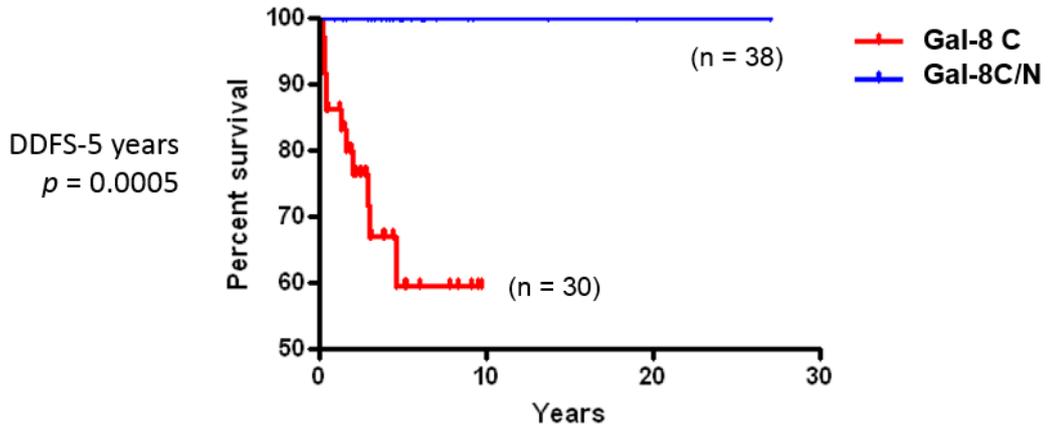
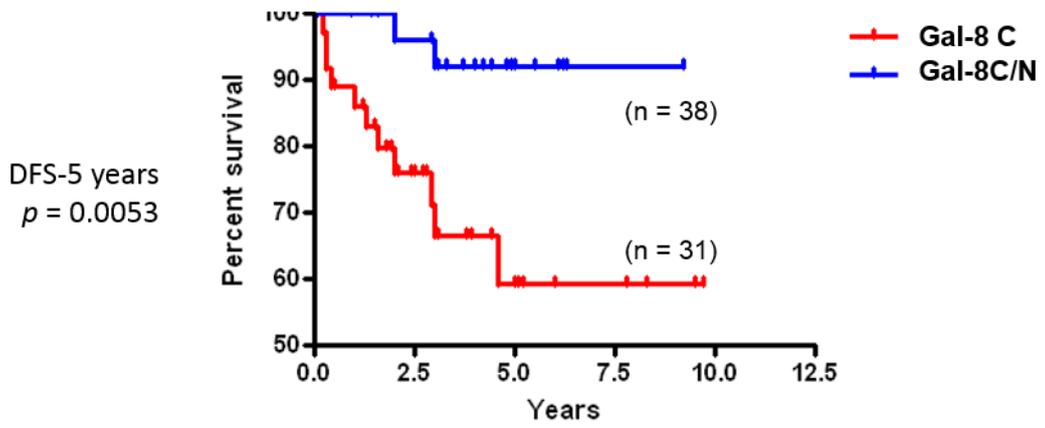
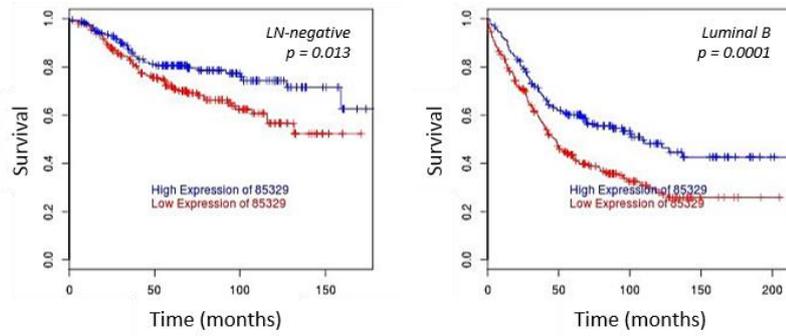
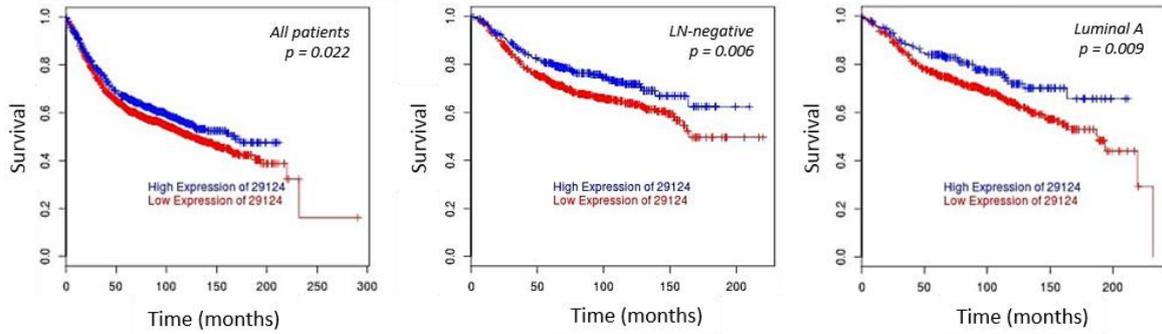


Figure S3.5

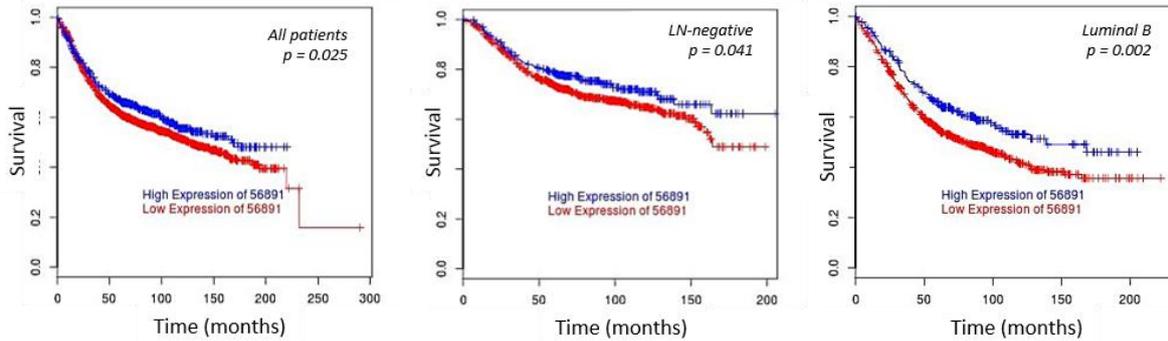
Lgals12



Lgals13



Lgals14



CHAPITRE 4

DISCUSSION

Notre précédente étude a mis en lumière l'importance de la galectine-7 dans le cancer du sein (Annexe II). Plus spécifiquement, nous avons mis en évidence une forte expression de la galectine-7 dans les cellules myoépithéliales de la glande mammaire normale. Dans le cancer du sein humain, nous avons démontré une expression anormalement élevée qui était exclusive aux carcinomes de haut grade et aux sous-types agressifs, c'est-à-dire de phénotype basal et HER-2 positif. À l'aide d'un modèle murin, nous avons démontré que la galectine-7 jouait un rôle important dans la propagation des cellules cancéreuses aux os et aux poumons. Des études *in vitro* nous ont ensuite permis d'associer sa fonction pro-tumorale à une activité anti-apoptotique. L'objectif de mon projet de doctorat représentait une suite logique à ces résultats et visait à identifier les mécanismes moléculaires responsables de la fonction pro-tumorale de la galectine-7. Globalement, nous avons démontré que : 1) la galectine-7 confère une chimiorésistance aux cellules du cancer du sein humain grâce à une activité anti-apoptotique; 2) son interaction avec p53 augmente la dégradation protéasomale de p53 et empêche l'expression des gènes cibles de ce facteur de transcription, ainsi que l'enclenchement de la mort cellulaire programmée; et 3) sa localisation intracellulaire est majoritairement mitochondriale, mais la génération d'un mutant restreint au cytosol (R74S) indique que l'activité anti-apoptotique de la galectine-7 est cytosolique. Pour faire suite à l'étude de la galectine-7 dans le cancer du sein, nous avons ensuite déterminé si d'autres galectines étaient exprimées dans le tissu mammaire normal et cancéreux, ce qui nous a permis de définir une signature dans le cancer du sein. Cette étude nous a permis de démontrer que : 1) la signature de l'expression des gènes *lgals* distingue deux groupes de galectines selon l'association à un bon ou un mauvais pronostic ; 2) que cette signature au niveau de l'ARNm ne concorde pas avec celle définie par la présence des protéines; 3) que la signature des galectines doit tenir compte de la localisation tissulaire (épithéliale vs stromale) et intracellulaire (membranaire, cytoplasmique et nucléaire) dans les tumeurs mammaires; et 4) que la signature des galectines, en protéines, peut être utilisée comme biomarqueur prédictif afin de distinguer les patientes à haut risque de récurrence.

Construction de mutants par délétions et mutants ponctuels de la galectine-7

Pour effectuer des analyses structure-fonction de la galectine-7, nous avons procédé à la construction de mutants (Figure AIII.1). Dans un premier temps, nous avons construit des vecteurs codants pour une galectine-7 de plus en plus courte, à partir de la portion C-terminale. La délétion provoque une instabilité de cette petite protéine de 15 kDa. L'expression de ces mutants dans les cellules du cancer du sein humain MCF-7, analysée par immunobuvardage de type *western*, est très faible en comparaison à la galectine-7 normale. Seul le mutant nommé « délétion 2 » est exprimé en assez grande quantité pour être visualisé. Il est probable

que le mauvais repliement de la protéine induise sa dégradation suite à sa traduction. Par contre, l'absence simultanée des brins F1 et S2 semble permettre un repliement adéquat et la conservation de la galectine-7 mutée par la délétion 2.

Dans un deuxième temps, nous avons généré des mutants ponctuels de la galectine-7 en ciblant les résidus conservés et identifiés comme étant importants pour la fonction d'autres galectines. L'inhibition du domaine fonctionnel des galectines était le premier objectif. L'étude de Hirabayashi et ses collègues a su démontrer que la mutation N46D de la galectine-1 est efficace pour la désensibilisation de cette lectine à la présence de sucres (Hirabayashi *et al.*, 1991). Nous avons donc construit le vecteur pour produire l'homologue de ce mutant, c'est-à-dire la galectine-7 N51D. Son expression pratiquement inexistante dans les cellules MCF-7 ne nous a pas permis de poursuivre les analyses structure-fonction avec ce mutant (Figure AIII.1). Nous sommes les premiers à avoir tenté d'exprimer ce mutant du CRD dans une lignée cellulaire. Bien que ce mutant défectueux pour la liaison aux sucres ait été bien établi, les précédentes études n'avaient étudié que la protéine recombinante, ce qui peut fausser les résultats quant à son expression *in vivo* (Quinta *et al.*, 2014, Takeuchi *et al.*, 2015, Voss *et al.*, 2008). Le second mutant ciblé dans le CRD a fait l'objet d'une importante étude structure-fonction sur la galectine-3 (Salomonsson *et al.*, 2010). Lors de la substitution de l'arginine 186 par une sérine, le transport vésiculaire n'est plus possible *in vivo*. De plus, ce mutant n'est plus en mesure d'activer les neutrophiles, fonction reconnue de la galectine-3 (Karlsson *et al.*, 1998). Cette altération de fonction est probablement la conséquence d'un CRD inactif, autant pour sa liaison aux sucres qu'aux glycoprotéines. L'homologue pour la galectine-7, le mutant R74S, a été généré dans notre laboratoire (Grosset *et al.*, 2014). Lorsque comparé à la protéine recombinante normale, le mutant R74S se lie moins efficacement à la colonne lactose-agarose, lors de sa purification. De plus, nos résultats de liaison de surface cellulaire démontrent une diminution de la fixation de ce mutant à la membrane plasmique lorsque comparé à la protéine normale. Ces deux analyses suggèrent que le mutant de la galectine-7 R74S possède un CRD défectueux. Bien qu'exprimée dans les cellules du cancer du sein, cette structure altérée affecte la localisation intracellulaire. Plus précisément, ce mutant est presque exclusivement cytosolique. Par contre, la fonction anti-apoptotique n'y est aucunement diminuée. L'étude de Salomonsson et ses collègues a également analysée plusieurs autres mutants de la galectine-3, dont celui qui a été établi pour empêcher l'activité anti-apoptotique de cette lectine, le G182A, aussi nommé NWG/AR (Akahani *et al.*, 1997). Salomonsson et ses collègues ont observé, comme c'est le cas pour le mutant R186S, une altération de sa fonction de lier les sucres, ainsi que dans son insertion en vésicules (Salomonsson *et al.*, 2010). Ce qui porte à croire que le CRD pourrait être responsable de la fonction inhibitrice de la mort cellulaire programmée de la galectine-3, dans les cellules du cancer du sein. Par ailleurs,

l'élaboration initiale de ce mutant, par le groupe d'Avraham Raz, portait sur l'identification d'une région homologue au domaine BH1 des membres de la famille Bcl-2 (Akahani *et al.*, 1997). La liaison de la galectine-3 à Bcl-2 se fait possiblement par ce motif NWGR. La galectine-7 possède le motif WGR qui pourrait également permettre une interaction avec les membres de la famille Bcl-2. L'analyse du mutant WG/AR de la galectine-7, aussi nommé G70A, a été effectuée par notre groupe. À l'inverse de ce qui a été proposé pour la galectine-3, le domaine WGR de la galectine-7 ne semble pas être responsable de son interaction avec Bcl-2. Nos données *in vitro* indiquent que le mutant G70A est toujours apte à lier la protéine anti-apoptotique (Figure AV.1). De plus, bien que ce motif se retrouve dans le CRD, tel que R74, il peut se localiser dans les mêmes compartiments intracellulaires que la galectine-7 normale, c'est-à-dire le cytosol, la mitochondrie et le noyau. La glycine 70 ne semble donc pas conférer une activité spécifique à la galectine-7, telle que le démontre notre étude structure-fonction.

Localisation intracellulaire de la galectine-7: importance des glycoprotéines

Nous avons démontré que la galectine-7 est distribuée dans le cytosol, la mitochondrie et le noyau des cellules du cancer du sein. Nos études structure-fonction ont révélé que la substitution de l'arginine 74 par une sérine ne permet plus le transport de la galectine-7 vers le noyau et les mitochondries. Cette observation s'apparente au mutant homologue pour la galectine-3, R186S, qui ne se retrouve plus en vésicules (Salomonsson *et al.*, 2010). La localisation vésiculaire de certaines galectines, telles que la galectine-3, a été étudiée par plusieurs groupes, mais n'a pas été observée pour la galectine-7 (Ochieng, 2014). Selon l'étude de Salomonsson et ses collègues, l'altération du CRD serait la principale cause de la perte des fonctions de la galectine-3. Nous avons également démontré que notre mutant R74S a une activité réduite pour le CRD, ce qui pourrait être la cause de sa rétention cytosolique.

Galectine-7 nucléaire

La galectine-7 ne possède pas de signal de localisation nucléaire (NLS) qui peut être reconnu par les importines. La diffusion passive est le transport vers le noyau utilisé par les protéines de faible poids moléculaire (Funasaka *et al.*, 2014). Notre étude ne permet pas de proposer ce type de transport nucléaire pour la galectine-7 puisque le mutant R74S ne peut pas y diffuser. C'est ce qui pose l'hypothèse que la liaison de protéines de transport, possiblement glycosylées, serait essentielle pour la localisation nucléaire de la galectine-7. En fait, les sucres peuvent jouer le rôle de NLS. Une étude comparative d'un NLS peptidique classique et d'un NLS à base de sucres a su démontrer que l'importation nucléaire, bien que moins efficace, est possible pour les glycoprotéines (Rondanino *et al.*, 2003). De plus, elle est indépendante de

l'importine karyophérine β , contrairement à la voie classique qui est dépendante de ce système. La liaison de la galectine-7 à certaines protéines glycosylées pourrait être responsable de son transport du cytosol vers le noyau, bien par diffusion, mais seulement par un groupement protéique glycosylé. Selon cette hypothèse, l'incapacité du mutant R74S à se rendre au noyau résulterait d'une altération du CRD, empêchant la liaison à ces protéines possédant un NLS à base de sucres. Puisque l'importation nucléaire n'est pas possible pour le mutant R74S, notre étude ne permet pas de conclure au sujet du mécanisme d'exportation hors du noyau. La galectine-7 possède un site théorique de phosphorylation par la caséine kinase II. Cette sérine se retrouve en position 9, ce qui semble être l'homologue de la Ser⁶ de la galectine-3 qui est responsable de son exportation hors du noyau, suite à sa phosphorylation (Gong *et al.*, 1999). La construction d'un mutant S9A pour la galectine-7, similaire à ce qui a été réalisé pour la galectine-3, permettrait de valider son rôle pour le transport extranucléaire. Le fait que le mutant R74S, restreint au cytosol, conserve son activité anti-apoptotique indique qu'un mutant S9A n'aurait probablement plus cette capacité.

Galectine-7 mitochondriale

La galectine-7 possède un signal de localisation mitochondrial (MLS) théorique qui comporte le clivage du N-terminal en position 34 (Claros *et al.*, 1996). La génération de mutants de délétions démontre que de retirer une séquence de cette protéine de faible masse moléculaire en affecte grandement la stabilité et induit sa dégradation (Figure AIII.1). Par contre, les délétions que nous avons réalisées se retrouvent au C-terminal. La construction d'un mutant de la galectine-7 où les acides aminés 1-34 sont absents devra être effectuée pour vérifier la stabilité de la protéine. Par contre, l'insertion de la galectine-7 à la membrane externe de la mitochondrie n'est pas possible puisque la seule hélice alpha présente dans la structure de la galectine-7 ne répond pas aux critères des protéines transmembranaires (Artimo *et al.*, 2012, Leonidas *et al.*, 1998). Par ailleurs, c'est le mécanisme de localisation de Bcl-2, protéine identifiée comme partenaire d'interaction de la galectine-7 par Villeneuve et ses collègues (T. Kaufmann *et al.*, 2003, Villeneuve *et al.*, 2011). Cette liaison a été localisée à la mitochondrie des cellules humaines du cancer du côlon et du cancer du col de l'utérus. Cette étude suggère le transport de la galectine-7 par Bcl-2 à la mitochondrie, selon une liaison CRD-indépendante. Le processus apoptotique y est alors favorisé, principalement en présence d'un dommage à l'ADN par des rayons ultraviolets. À l'inverse, dans le cancer du sein, nous avons démontré que la localisation mitochondriale de la galectine-7 n'est pas responsable de l'inhibition de la mort cellulaire programmée (Grosset *et al.*, 2014). De plus, l'interaction entre Bcl-2 et la galectine-7, selon notre modèle, ne se situe pas à la mitochondrie puisque notre mutant cytosolique se lie, *in vitro* et *in vivo*, à cette protéine anti-apoptotique (Figure AIV.1). Par contre,

de par la liaison directe entre Bcl-2 et un mutant déficient dans sa liaison aux sucres, nos travaux appuient le mécanisme CRD-indépendant. Notre hypothèse est que le site d'interaction se retrouve au site de dimérisation de la galectine-7 puisqu'une déplétion du dimère et une augmentation concomitante des formes monomériques corréleraient avec l'augmentation de la quantité de Bcl-2, autant pour la protéine normale que mutée. Bien que l'activité anti-apoptotique de la galectine-7 semble reliée à sa localisation cytosolique, nous avons démontré qu'elle peut lier plusieurs membres de la famille Bcl-2 (Figure AIV.2). Que ce soit les protéines anti-apoptotiques, MCL-1 et Bcl-xL, ou pro-apoptotiques, Bak et Bax, la galectine-7 semble avoir un potentiel d'interaction diversifié. Bien que l'on accorde plus d'importance aux protéines mitochondriales de la famille Bcl-2, l'équilibre de localisation entre le cytosol et la mitochondrie est essentiel au processus apoptotique. La translocation de Bax et Bak au cytosol empêche la formation de pores à la mitochondrie, ces derniers étant responsables de la relâche de cytochrome c, puis de la cascade d'activation des caspases et du clivage de PARP (Todt *et al.*, 2015). La liaison directe ou indirecte, par exemple au sein d'un complexe protéique, entre des différents membres de la famille de Bcl-2 et la galectine-7 est probablement responsable, du moins en partie, de l'activité anti-apoptotique de la galectine-7. Le mutant exclusivement cytosolique pourrait avoir une efficacité supérieure pour retenir les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak hors de la mitochondrie.

Bien que la localisation mitochondriale ne semble pas nécessaire à sa fonction anti-apoptotique, sa présence prédominante dans cette organelle indique que la galectine-7 pourrait y jouer un autre rôle. De plus, notre mutant du CRD ne pouvant se localiser à la mitochondrie, l'implication de protéines mitochondriales glycosylées est très probable. Un récepteur glycosylé, tel que la P-glycoprotéine, est un ligand potentiel pour la galectine-7. Ce transporteur ABC (*ATP binding cassette*) a été identifié à la membrane externe mitochondriale des cellules du cancer du sein résistantes à la doxorubicine, par Shen et ses collègues (Shen *et al.*, 2012). Il est encodé par le gène *MDR1* (*multidrug resistance 1*) et a été initialement caractérisé en tant que canal expulseur d'agents chimiothérapeutiques, à la surface des cellules (Fletcher *et al.*, 2010). Cette fonction a également été rapportée pour l'expulsion de molécules de la mitochondrie vers le cytosol (Shen *et al.*, 2012). Très récemment, le groupe d'Avraham Raz a su démontrer que la P-glycoprotéine interagit avec la galectine-3 extracellulaire, ce qui induit l'activité ATPase du récepteur à la surface de la cellule (Harazono *et al.*, 2015). Cette activation de la P-glycoprotéine indique que la galectine-3 est impliquée dans la résistance à la chimiothérapie, la doxorubicine dans le cas de cette étude. La galectine-7 pourrait jouer un rôle dans l'activation du transporteur ABC, ce qui aurait pour effet d'augmenter l'expulsion de molécules indésirables hors de la mitochondrie et ainsi, permettre sa détoxification. Des études futures seront nécessaires pour mieux caractériser cette activité

Marusich et Berninsone, la présence de sucres pourrait être en partie responsable du métabolisme mitochondrial. La rétention de la galectine-7 à la membrane externe et à l'intérieur de la mitochondrie, telle que nous l'avons visualisé par microscopie électronique (Figure 4.1B), est possiblement causée par la présence de ligands potentiels dans cette organelle. De ce fait, un rôle pour la galectine-7 dans la phosphorylation oxydative mitochondriale doit être considéré et vérifié par diverses techniques telles que la mesure de la consommation d'oxygène et des essais d'activité enzymatique (A. Barrientos *et al.*, 2009). La dérégulation énergétique cellulaire a été ajoutée aux signatures du cancer (Hanahan *et al.*, 2011). Une reprogrammation du métabolisme énergétique permet aux cellules cancéreuses d'utiliser la glycolyse en présence d'oxygène. De plus amples études seront nécessaires pour relier l'activité pro-tumorale de la galectine-7 à l'apport d'énergie dans les cellules du cancer du sein.

Similitudes entre la galectine-7 et MDM2

Une des protéines, sinon la protéine la plus étudiée dans le cancer, est sans contredit p53. La découverte du syndrome de Li-Fraumeni est l'évènement qui a su mettre l'emphase sur ce facteur de transcription qui est essentiel pour empêcher le développement de cancers. Cette maladie comporte diverses mutations héréditaires du gène *TP53* qui induisent des altérations de la protéine (Bougeard *et al.*, 2015). De par son rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et l'apoptose, lors d'un dommage à l'ADN, l'inactivation de la protéine p53 permet la survie de cellules transformées et immortelles. C'est ce qui explique l'apparition de multiples cancers chez les personnes atteintes du syndrome de Li-Fraumeni.

Le rôle biologique de p53 est donc très important, mais sa régulation l'est d'autant plus. La protéine MDM2 est le régulateur négatif principal de la voie de p53 (Wade *et al.*, 2013). Il existe également la protéine MDMX, aussi connue sous le nom de MDM4, qui joue ce rôle. *MDM2* est un gène cible du facteur de transcription p53. En l'absence d'un évènement nécessitant un arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose, MDM2 se lie directement à p53 et, en tant qu'ubiquitine ligase, induit son ubiquitination. La voie du protéasome est alors responsable de la dégradation de p53, ce qui empêche l'accumulation de p53 dans le cytoplasme et au noyau. Par contre, la modification post-traductionnelle de p53, plus précisément la phosphorylation, empêche le complexe de se former, ce qui permet l'activité nucléaire de p53. La protéine MDM2, observée par immunohistochimie, est un marqueur pronostique négatif indépendant dans le cancer du sein (Turbin *et al.*, 2006).

Le parallèle entre MDM2 et la galectine-7 est indéniable. Tout d'abord, la galectine-7 a historiquement été nommée PIG1 pour *p53-induced gene 1* (Polyak *et al.*, 1997). La

transcription de *Igals7* par p53 induit l'apoptose dans le cancer colorectal. Par contre, notre groupe a également démontré que *Igals7* est un gène cible de p53 dans le cancer du sein, où son activité est anti-apoptotique (Campion *et al.*, 2013, Demers *et al.*, 2010, Grosset *et al.*, 2014). La chimiothérapie à base de doxorubicine, utilisée entre autres pour le traitement du cancer du sein, induit un dommage à l'ADN de par son insertion entre les paires de bases de l'ADN. En présence de cet agent intercalaire, l'activité du gardien de la cellule, p53, est requise. En présence de galectine-7, spécifiquement cytosolique, il y a inhibition de l'apoptose de par sa liaison à p53 ou à un complexe contenant p53. Cette interaction empêche la translocation nucléaire de p53 et augmente sa dégradation par le protéasome. Finalement, la galectine-7 cytosolique inhibe la transcription de gènes cibles de p53, tels que *CDKN1A* qui produit la protéine p21.

Cette activité commune entre MDM2 et la galectine-7 pose un dilemme: est-ce qu'il y aurait un effet compensatoire par la galectine-7 lors de l'inhibition de MDM2? Plus particulièrement, dans les cancers du sein agressifs, où l'on retrouve l'expression de la galectine-7. L'engouement pour cette nouvelle cible thérapeutique devrait être prudent. Des études cliniques sur ce type de thérapie ciblée pourraient être biaisées, ce que l'on voit fréquemment lorsque le cancer du sein n'est pas stratifié en sous-types. De par notre étude, il serait préférable de cibler p53 pour inhiber ses interactions protéine-protéine, tout en conservant sa liaison à l'ADN. C'est ce que le groupe de Galina Selivanova a voulu exploiter en développant la petite molécule RITA (*Reactivation of p53 and Induction of Tumor cell Apoptosis*) (Issaeva *et al.*, 2004). Elle induit le changement de conformation de p53, en se liant au domaine N-terminal de la protéine, ce qui empêche la liaison de MDM2. Fait intéressant, cette molécule restaure également l'activité de divers p53 mutants. Ce traitement anti-cancéreux prometteur est efficace et peu toxique, *in vitro et in vivo*, pour différents types de cancer, tels que le carcinome colorectal, le cancer du col de l'utérus, les cancers de la tête et du cou et le neuroblastome (Burmakin *et al.*, 2013, Roh *et al.*, 2012, C. Y. Zhao *et al.*, 2010a). Des études supplémentaires seront nécessaires pour évaluer si RITA empêche l'activité anti-apoptotique de la galectine-7 dans les cancers du sein HER-2 positifs et de phénotype basal.

La galectine-7 et les cellules souches mammaires

La galectine-7 se retrouve exclusivement dans la couche de cellules myoépithéliales (Demers *et al.*, 2010). Cette couche de l'épithélium mammaire se compose également de cellules souches mammaires (MaSCs) (Rios *et al.*, 2014). Pour vérifier l'expression de la galectine-7 dans les MaSCs, une purification de ces cellules par la révélation des marqueurs Lin⁻ CD29^{hi}CD24⁺ à l'aide de la technique de cytométrie en flux serait nécessaire (Shackleton *et*

al., 2006). L'activité des MaSCs est attribuée à l'expression de protéines, telles que Δ Np63 qui est également une protéine abondante dans les cellules myoépithéliales (Chakrabarti *et al.*, 2014). L'inhibition de l'apoptose des cellules MaSCs pourrait être une fonction de la galectine-7. La préservation de ces cellules est nécessaire au processus physiologique du développement de la glande mammaire. Dans la situation où la galectine-7 ne serait pas exprimée par les MaSCs, cette lectine pourrait avoir un rôle dans la niche des MaSCs. L'épithélium de la glande mammaire est riche en communications intercellulaires, particulièrement dans la niche des MaSCs (Briskin *et al.*, 2007). Par exemple, les cellules positives pour ER sont responsables de transmettre le signal de division cellulaire aux MaSCs (ER-), au cours de la puberté. L'élongation des canaux est le résultat de cette signalisation entre cellules mammaires. La niche des MaSCs est composée de nombreuses cellules myoépithéliales. La galectine-7 pourrait être sécrétée dans la niche et endocytée par les MaSCs. L'internalisation de la galectine-3 par endocytose a été récemment montrée dans les fibroblastes embryonnaires de souris (Lakshminarayan *et al.*, 2014). De plus, notre groupe a observé le transport de la galectine-7 par endocytose dans les cellules du cancer du sein MDA-MB-231 (données non montrées). Lors de la localisation intracellulaire de la galectine-7 dans les MaSCs, une augmentation de la dégradation de p53 pourrait avoir un effet protecteur pour la survie de ces cellules.

Les résultats de notre groupe montrent que le développement de la glande mammaire de souris déficientes en galectine-7 s'effectue normalement (Annexe VI). La redondance des fonctions des galectines pourrait expliquer l'intégrité de ce processus physiologique, telle que suggérée dans la formation de plasmocytes et lors de la réponse immunitaire cellulaire (Tribulatti *et al.*, 2012, C. M. Tsai *et al.*, 2011). Par contre, nous avons observé un développement plus rapide des tumeurs positives pour la galectine-7. La fonction anti-apoptotique de la galectine-7 pourrait également avoir un effet protecteur pour les cellules de la niche des MaSCs dans un contexte de cancer. Une étude sur l'expression de la galectine-7 dans les cellules initiatrices de tumeur (TICs) devrait être effectuée. Elle permettrait de déterminer si la fonction pro-tumorale de la galectine-7 dans le cancer du sein est attribuée à sa présence dans les cellules souches cancéreuses.

Découverte d'un biomarqueur du cancer du sein et d'une cible thérapeutique potentielle

L'exclusivité des carcinomes mammaires de haut grade pour l'expression de la galectine-7 est une donnée importante pour l'utilisation des galectines comme biomarqueurs (Demers *et al.*, 2010). Encore plus intéressant, seuls les deux sous-types les plus agressifs présentent cette galectine. Notre étude sur l'évaluation de 213 carcinomes mammaires nous a permis

d'associer l'expression de la galectine-7 à une survie sans maladie diminuée ($p = 0.0786$). Une cohorte de plus grande taille permettra de définir si la galectine-7 aurait une utilité clinique quant au choix du traitement, par exemple d'une chimiothérapie plus agressive.

Le développement d'inhibiteurs de galectines pour le domaine de l'oncologie n'est encore qu'à un stade embryonnaire. Il faudra toutefois tenir compte, pour la galectine-7, du fait que le domaine de reconnaissance des glucides ne doit pas être la cible, selon notre étude qui démontre que la galectine-7 qui possède un CRD défectueux ne perd pas sa capacité à protéger la cellule cancéreuse de l'apoptose (Grosset *et al.*, 2014). Tous les composés à base de sucre, tels que les MCP (GCS-100), le Davanat® et TD139, qui agissent dans le compartiment extracellulaire ne seront d'aucune utilité (Chauhan *et al.*, 2005, Glinsky *et al.*, 2009, Klyosov *et al.*, 2012, Mackinnon *et al.*, 2012). D'autant plus que notre étude sur la signature des galectines du cancer du sein n'a localisé la galectine-7 que dans le compartiment intracellulaire des cellules épithéliales. Ce qui implique que la molécule inhibitrice de la fonction pro-tumorale de la galectine-7 devra être en mesure de se rendre au cytoplasme, sans se propager au noyau. Le traitement sera plus efficace au site d'activité de cette galectine. Plus important encore, une thérapie qui cible une protéine qui fait partie d'une famille dont les membres ont de grandes similitudes structurales, tout en ayant des fonctions distinctes, doit tenir compte de la signature de chacun.

L'importance de définir une signature des galectines dans le cancer du sein

Nous avons effectué une recherche exhaustive de publications comprenant les galectines, l'immunohistochimie comme technique de détection et l'analyse de carcinomes mammaires humains. La combinaison des études sur la galectine-1 indique: 1) une corrélation entre le nombre de cellules positives pour la galectine-1 (épithéliales et stromales) et un grade élevé; 2) son absence dans les cellules épithéliales d'hyperplasies bénignes; 3) une augmentation de son expression dans le cancer du sein lorsque comparé à la glande mammaire normale; et 4) une corrélation de l'intensité du marquage de la galectine-1 dans les cellules stromales et l'invasion, le stade T, le stade TNM et les métastases ganglionnaires, sans corréler le statut des récepteurs hormonaux, ni la présence de galectine-1 dans les cellules épithéliales tumorales avec quelconques facteurs (Dalotto-Moreno *et al.*, 2013, Gromov *et al.*, 2010, E. J. Jung *et al.*, 2007). Aucune étude n'a été effectuée, jusqu'à présent, sur l'expression de la galectine-2 dans le carcinome mammaire humain. Pour ce qui est de la galectine-3, une étude récente a démontré sa forte expression dans le cancer du sein triple-négatif, ainsi que son association à la résistance chimiothérapeutique (Zhang *et al.*, 2014). Différentes données ont également été rapportées sur la galectine-3, mais plus souvent de façon spécifique aux types

histologiques plus rares: 1) peu de cas de cancer du sein lobulaire expriment la galectine-3 dans les cellules tumorales, mais la moitié en possèdent dans les cellules stromales; 2) les cellules épithéliales de la glande mammaire normale expriment la galectine-3, ainsi que les types histologiques tubulaire et canalaire de bas grade; 3) sa localisation cytoplasmique corrèle avec les récepteurs hormonaux, nucléaire avec le type histologique lobulaire et stromale avec un cancer de haut grade et un mauvais pronostic; et 4) l'expression de la galectine-3 diminue plus la maladie progresse (Castronovo *et al.*, 1996, Fernandez-Aguilar *et al.*, 2008, Koo *et al.*, 2011, Moisa *et al.*, 2007). Une seule étude a été rapportée au sujet de la galectine-4 (Huflejt *et al.*, 2004). Les observations sont que la protéine n'est que très peu exprimée dans le sein normal et, à l'inverse, est très présente dans le cancer du sein, principalement de type canalaire *in situ*. Notre précédente étude a permis de mettre en lumière l'importance de la galectine-7 dans les cellules myoépithéliales de la glande mammaire, ainsi que son exclusivité pour les carcinomes mammaires de haut grade de sous-type HER-2 positif et de phénotype basal (Demers *et al.*, 2010). Danguy et ses collègues ont, quant à eux, dirigé leur étude sur la galectine-8 (Danguy *et al.*, 2001). Ils ont su démontrer que son expression est augmentée dans le cancer du sein lorsque comparée aux tumeurs bénignes ou encore, à la glande mammaire normale. L'étude qui porte sur la galectine-9 a une forte portée. C'est le groupe de Mitsuomi Hirashima qui a permis d'identifier la galectine-9 en tant que facteur pronostic puisque, selon leur cohorte, 50% des tumeurs mammaires sont positives pour la galectine-9 et que 90% des cancers métastatiques sont négatifs pour la galectine-9. (Irie *et al.*, 2005).

Pour déterminer le rôle pronostique et le potentiel thérapeutique de chacune de ces galectines, il est primordial d'évaluer leur expression dans une même cohorte de patiente et dans les mêmes carcinomes mammaires. La seule autre étude comparable pour ce qui est de l'identification d'une signature pour les galectines a été réalisée par le groupe de Gabriel Rabinovich (Laderach *et al.*, 2013). L'expression des galectines 1, 3, 4, 8, 9 et 12 a été évaluée dans 61 carcinomes prostatiques humains. La progression de cette maladie, selon la classification TNM, implique l'augmentation de l'expression de la galectine-1, la diminution des galectines 3, 4, 9 et 12, ainsi qu'une expression non altérée de la galectine-8. L'expression des galectines a également été évaluée dans les lignées de cellules du cancer de la prostate humain: LNCaP, 22Rv1 et PC3. Ces données appuient leurs observations sur la cohorte de 61 patients, selon le degré d'agressivité de la lignée et l'expression des différentes galectines en ARNm et au niveau protéique. Ils ont également observé une corrélation entre la galectine-1 et l'augmentation de vaisseaux sanguins dans la tumeur, à l'aide du marqueur de cellules endothéliales CD34. Cette étude a permis de mettre l'emphase sur la possibilité d'utiliser anginex pour le traitement du cancer de la prostate.

Notre cohorte de 213 patientes atteintes d'un cancer du sein comporte plusieurs informations cliniques: âge au diagnostic, volume tumoral, présence de métastases ganglionnaires, grade, sous-types moléculaires. Nous avons également déterminé l'expression des galectines 1, 2, 3, 4, 7, 8 et 9, ainsi que le statut de plusieurs marqueurs: ER, PR, HER-2, EGFR, Ki-67, p53, GATA-3, CK5/6 et CK14. À l'inverse de l'étude de la signature des galectines dans le cancer de la prostate, nous avons observé que pour le cancer du sein, une signature des galectines 1, 2, 3 et 7 se retrouve principalement dans les carcinomes mammaires de haut grade. L'augmentation de ces galectines corrèle donc avec la progression de la maladie. De plus, la survie sans maladie sur cinq ans de ces patientes est plus faible en présence des galectines 3 et 7. Ces données sont d'autant plus importantes que rien n'avait été publié jusqu'à présent sur l'impact pronostique de la galectine-7 alors que les études sur la galectine-3 restent imprécises quant à son association à un bon ou un mauvais pronostic.

De par la distinction des sous-types triple-négatif, HER-2+, luminal A et luminal B, nos analyses indiquent que l'expression des galectines 1 et 7 se situe principalement dans les carcinomes mammaires de sous-type triple-négatif, en plus d'être associées à l'expression des cytokératines basales, c'est-à-dire les CK 5, 6 et 14 (données non montrées). Le cancer du sein triple-négatif a été caractérisé, dans un premier temps, en tant que phénotype basal (Nielsen *et al.*, 2004). Plus récemment, c'est le sous-type faible en claudines qui a été ajouté en tant que triple-négatif (Herschkowitz *et al.*, 2007). C'est Lehmann et ses collègues qui ont, par la suite, divisé le carcinome mammaire triple-négatif en plusieurs sous-types: phénotype basal 1, phénotype basal 2, immunomodulateur, mésenchymateux, phénotype de cellule souche mésenchymale et récepteur androgène luminal (Lehmann *et al.*, 2011). Cette étude a été réalisée dans l'optique d'améliorer le traitement ciblé pour le cancer du sein triple-négatif. De par la classification du groupe de Jennifer A. Pietenpol, les carcinomes mammaires positifs pour la galectine-1 et la galectine-7 peuvent être classés dans toutes les catégories, à l'exception du sous-type récepteur androgène luminal qui n'exprime que les cytokératines lumineuses (Lehmann *et al.*, 2011). De plus, la présence de la galectine-7 est associée à celle d'un récepteur de facteur de croissance, EGFR (données non montrées). Cette co-expression permet de lier spécifiquement la galectine-7 au sous-type de phénotype basal 2, ce qui implique une origine myoépithéliale suggérée du cancer. L'expression abondante et exclusive de la galectine-7 dans les cellules myoépithéliales de la glande mammaire normale permet d'appuyer cette théorie. Par contre, l'expression d'EGFR est également associée au sous-type phénotype de cellule souche mésenchymale, aussi appelé faible en claudines. Bien que la signature des galectines pour le cancer du sein humain triple-négatif se compose des galectines 1 et 7, l'analyse de l'expression d'autres marqueurs sera nécessaire pour les associer à un sous-type spécifique du triple-négatif. Les études de marqueurs diagnostiques

et les études cliniques pour le développement de nouveaux traitements pourront ainsi être beaucoup plus précises dans la sélection des patientes atteintes du cancer du sein.

Une révolution pour les études à grande échelle

Pour nous permettre d'évaluer l'expression protéique des différents membres de la famille des galectines pour 213 patientes atteintes du cancer du sein, nous devons utiliser une technique telle que la construction de micromatrices tissulaires. Le développement de cette technique a révolutionné l'évaluation des protéines en offrant la possibilité de le faire à grande échelle à faible coût (Kononen *et al.*, 1998). Le principe est d'utiliser des blocs de tissus, fixés par la formaline et enrobés de paraffine, nommés donneurs, et d'en extraire une carotte de diamètre allant de 0,6 mm jusqu'à 2mm. Cette carotte est alors insérée dans un bloc dit receveur. L'opération peut continuer jusqu'à l'insertion d'un nombre déterminé de carottes, allant jusqu'à 1000. Il est important d'insérer au moins deux carottes d'un même bloc de tissu, de préférence trois, pour avoir un duplicata ou un triplicata lors des analyses. Lorsque terminée, la micromatrice tissulaire, jusqu'ici en bloc de paraffine, est coupée pour donner des lames prêtes à être utilisées pour une coloration immunohistochimique (Figure 4.2).

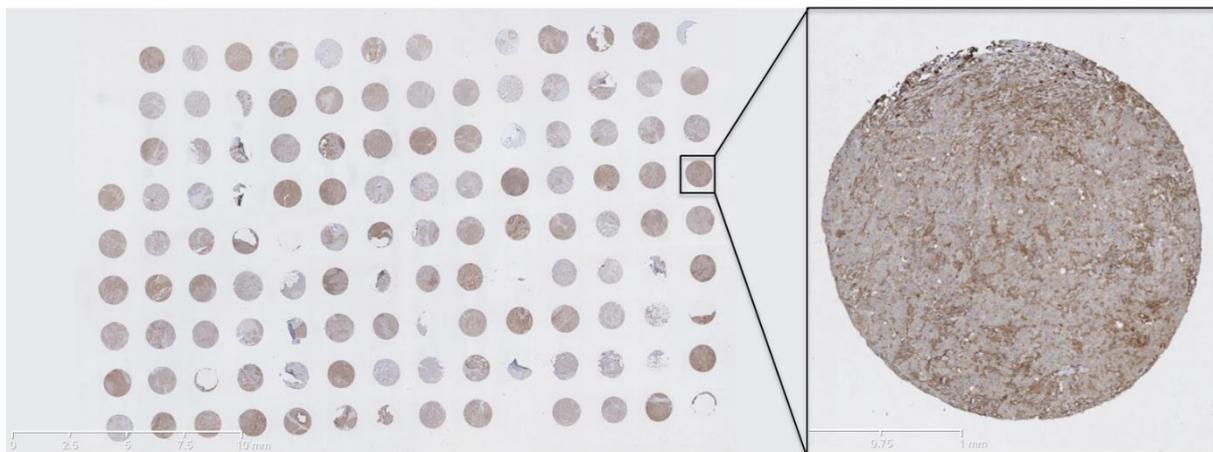


Figure 4.2 Micromatrice tissulaire. Une coupe d'un bloc d'une micromatrice tissulaire comportant 38 tumeurs mammaires différentes en triplicata. Certains tissus normaux ont été ajoutés à cette micromatrice tissulaire en tant que témoins positifs et négatifs: glande mammaire normale, prostate, amygdale, côlon, peau, rein et placenta. L'immunohistochimie de cette lame représente l'expression de la galectine-9. L'encadré de droite permet de visualiser, à plus fort grossissement, ce qui est évalué lors de l'émission d'un score pour une protéine.

L'analyse d'une multitude de protéines est alors possible de par les coupes sériées pouvant compter plus de 100 lames. Il n'en reste pas moins que le tissu contenu dans une carotte de 1 mm de diamètre reste très limité pour représenter une tumeur complète.

La validation de cette technique était essentielle pour son utilisation en tant que plateforme pour la révélation de biomarqueurs. Le groupe de David L. Rimm a poursuivi cet objectif, plus spécifiquement pour le cancer du sein (Camp *et al.*, 2000). La construction de plusieurs micromatrices tissulaires, à partir de 38 carcinomes mammaires invasifs, ont été marquées par immunohistochimie pour ER, PR, HER-2, Ki-67 et cytokératine. Leur conclusion est que l'utilisation de deux carottes par bloc est suffisante pour représenter le spécimen, ce qui en fait une technique assez robuste. Une autre étude sur le cancer de la vessie est devenue la référence en pathologie pour la validation des micromatrices tissulaires, en ce qui a trait à la représentativité (Nocito *et al.*, 2001). Ces chercheurs ont utilisé 2317 cas de carcinomes de la vessie qu'ils ont inséré en quatre carottes dans quatre micromatrices tissulaires. La corrélation statistiquement significative a été démontrée entre les carottes de 0,6 mm de diamètre et les sections complètes pour ce qui est du grade histologique et de l'index de prolifération. Cet outil technique a par la suite été utilisé dans de nombreux projets d'identification de biomarqueurs.

Les galectines en tant que biomarqueurs: une question de localisation

Pour ce qui est de leur utilisation en tant que biomarqueurs, le comparatif clinique des galectines est sans contredit la protéine HER-2. L'expression en ARN de HER-2 est intégrée aux essais multigéniques, comme Oncotype DX (Paik *et al.*, 2004). Par contre, son expression ne peut pas être considérée seulement par ce type d'analyse. Elle ne peut même pas être déterminée par sa simple expression protéique. HER-2 est une protéine qui doit être localisée à la membrane des cellules cancéreuses, par la technique d'immunohistochimie. Une grille d'évaluation est nécessaire pour poser le diagnostic: 0 (négatif), 1+ (négatif), 2+ (douteux), 3+ (positif) (Wolff *et al.*, 2013). Plusieurs types de scores ont été établis pour l'évaluation de l'expression de protéines en immunohistochimie. L'utilisation du score d'Allred nous a permis de montrer l'association de la localisation péri-membranaire de la galectine-2 dans le cancer du sein à un haut grade, à l'absence d'ER, PR et HER-2 et à un index de prolifération élevé (Allred *et al.*, 1998, Mohsin *et al.*, 2004).

Pour ce qui est de la galectine-3, sa localisation à la fois nucléaire et cytosolique des cellules cancéreuses corrèle avec l'absence de métastases ganglionnaires. La localisation cytosolique de la galectine-3 dans plusieurs cancers est indispensable à sa fonction pro-tumorale (Funasaka *et al.*, 2014). Une répartition entre les deux compartiments pourrait diminuer l'efficacité de ses fonctions dans le cytosol, telles que son activité anti-apoptotique. D'autre part, une activité nucléaire anti-tumorale pourrait également empêcher la formation de métastases ganglionnaires. Lorsque la galectine-3 ne peut plus être exportée hors du noyau des cellules cancéreuses, elle se lie à la β -caténine et inhibe la transcription des gènes cibles

de cette voie de signalisation (Funasaka *et al.*, 2013). Dans le cancer du sein, la voie Wnt/ β -caténine est associée, entre autres, à la propagation de la maladie (Y. Chen *et al.*, 2011, Dey *et al.*, 2013, Jang *et al.*, 2015).

La galectine-8 nucléaire, quant à elle, est associée à plusieurs facteurs de bon pronostic, selon notre étude: un faible volume tumoral, le sous-type luminal A, une faible expression d'EGFR et un taux prolifératif bas. L'étude de Danguy révèle que la localisation nucléaire de la galectine-8 ne se retrouve que dans le côlon ou dans les tumeurs bénignes du côlon (Danguy *et al.*, 2001). Les tumeurs malignes du côlon semblent avoir perdues cette protéine nucléaire, telle un suppresseur de tumeur qui est éliminé par la progression d'un cancer. La majorité de tumeurs mammaires de bas grade de notre cohorte expriment la galectine-8 nucléaire, ce qui appuie les observations faites dans le côlon. Par contre, une proportion équivalente de carcinomes de haut grade expriment la galectine-8 cytosolique seule ou cytosolique et nucléaire. Dans cette maladie avancée, c'est lors de l'absence de la galectine-8 au noyau des cellules cancéreuses que la survie sans récurrence, sans maladie à distance et totale sur cinq ans est diminuée. Le mécanisme d'action anti-tumoral de la galectine-8 nucléaire dans les cellules cancéreuses du sein et du côlon devra être déterminé par de plus amples études.

À l'inverse, la galectine-1 nucléaire est associée à un mauvais pronostic pour les patientes de notre cohorte. Le rôle connu pour la galectine-1 dans ce compartiment est l'épissage de pré-ARNm (J. W. Park *et al.*, 2001). Cette activité primordiale pour la traduction conforme des protéines est altérée dans le cancer. Plus spécifiquement, les facteurs d'épissage sont dérégulés et deviennent parfois même des oncogènes qui permettent la progression de la maladie (Oltean *et al.*, 2014). Cette modification post-transcriptionnelle aberrante peut mener à la surexpression de marqueurs bien connus du cancer du sein, tels qu'EGFR. Wang et ses collègues ont découvert un variant d'épissage de ce récepteur qui ne possède plus l'exon 4 (de4 EGFR) (H. Wang *et al.*, 2011). Ce variant n'est présent que dans les cellules cancéreuses et induit une activité constante d'EGFR, indépendamment de son ligand, augmentant ainsi la prolifération cellulaire. De plus, leur étude démontre que le potentiel métastatique des cellules est augmenté en présence du variant de4 EGFR. Puisque la galectine-1 nucléaire est associée à une forte expression d'EGFR, un rôle dans l'épissage de pré-ARNm pour la galectine-1 dans le cancer du sein est probable. De plus, les patientes qui présentent cette galectine localisée dans leur cancer du sein triple-négatif ont une survie sans maladie à distance réduite. Le séquençage de l'ARNm d'EGFR des carcinomes mammaires positifs pour la galectine-1 nucléaire permettra de vérifier cette hypothèse.

De nouveaux inhibiteurs sélectifs non seulement pour certaines galectines, mais également pour leur localisation, devront être développés pour l'application thérapeutique. Plus particulièrement, selon notre étude sur la survie des patientes atteintes d'un cancer du sein

triple-négatif, la galectine-1 nucléaire devrait être ciblée tout en n'affectant pas la localisation nucléaire des galectines 3 et 8 qui pourraient être synergiques au traitement. La signature des galectines localisées dans les cellules du cancer du sein humain serait plus précise pour définir une entité pronostique ou thérapeutique: gal-1C/N, gal-2M, gal-3C et gal-8C.

La sécrétion des galectines dans le microenvironnement, un biomarqueur sérieux potentiel

La présence dans le stroma des galectines 1, 3 et 9 indique plusieurs possibilités: 1) leur sécrétion par les cellules du cancer du sein; 2) leur expression par les cellules stromales, ainsi que leur sécrétion par ces cellules; et 3) que ces galectines sont relâchées dans le milieu extracellulaire, par exemple en réponse à la mort des cellules tumorales exprimant de hauts niveaux de galectines, telle que démontré pour la présence d'ADN tumoral circulant (Jahr *et al.*, 2001). La sécrétion des galectines dans le milieu extracellulaire est déjà bien documentée et serait responsable de nombreuses fonctions extracellulaires, telles que l'agrégation intercellulaires homotypiques (entre cellules cancéreuses) et hétérotypiques (entre cellules cancéreuses et endothéliales) (Vladoiu *et al.*, 2014). Une étude publiée récemment a su démontrer l'importance de la galectine-3 extracellulaire dans le cancer du sein triple-négatif, plus précisément pour la signalisation cellulaire (Shetty *et al.*, 2015). Selon cette étude, la galectine-3 se lierait au récepteur membranaire annexine A2 sur ces résidus glycosylés. Cette interaction observée sur les cellules du cancer du sein permettrait la stabilisation d'annexine A2 en surface, ce qui module la signalisation d'EGFR, possiblement par la formation de treillis moléculaires entre les récepteurs. Lors de l'inhibition de la glycosylation de l'annexine A2, il y a diminution de l'expression des protéines de la famille Bcl-2, de la prolifération, de la migration et augmentation de l'apoptose. Lors de l'analyse de la co-expression de la galectine-3 et de l'annexine A2 dans les tissus mammaires humains, il s'est avéré qu'elle est inversement corrélée à l'expression de HER-2. Ces données soulignent l'importance de l'expression de la galectine-3 extracellulaire dans le cancer du sein triple-négatif. Une synergie pourrait se produire avec les autres galectines puisque leurs présences simultanées dans le microenvironnement tumoral se retrouve exclusivement dans les carcinomes mammaires de haut grade, de sous-type triple-négatif et HER-2 positif. Lorsque comparés aux tumeurs qui n'expriment aucune de ces trois galectines dans le stroma, ces carcinomes triples-positifs pour les galectines 1, 3 et 9 sont associés à la présence d'EGFR, de Ki-67 et de p53. Comme dans le cas de la galectine-3, la forte expression d'EGFR dans le cancer du sein triple-négatif pourrait être reliée à une stabilisation de ce récepteur à la surface des cellules par les galectines 1, 3 et 9 (Partridge *et al.*, 2004). Une autre activité extracellulaire, tout aussi importante dans le cancer, est l'angiogénèse. Les galectines 1 et 9 ont été nommées « *sweet*

couple » pour leurs rôles conjoints dans la biologie cellulaire endothéliale et l'angiogenèse (Thijssen *et al.*, 2014). Cette activité est possiblement reliée à l'exclusivité de l'expression des galectines 1, 3 et 9 dans le stroma des cancers plus avancés, tels que de haut grade, où la densité microvasculaire serait plus importante (Vamesu, 2006).

Le fait que les galectines 1, 3 et 9 se retrouvent dans le stroma indique la possibilité que l'on puisse les détecter dans le sang de ces patientes. L'augmentation des galectines en circulation dans le sang est associée à la présence d'un cancer, ainsi qu'à sa progression (Barrow *et al.*, 2011, C. Chen *et al.*, 2014, Iurisci *et al.*, 2000). La commercialisation du test VIDAS® Galectin-3 pour l'insuffisance cardiaque est un avantage pour éventuellement appliquer cette même technologie en oncologie (McCullough *et al.*, 2011). Le comparable clinique est le test CA 15-3 qui permet de vérifier le succès d'un traitement pour un cancer du sein métastatique par une simple analyse sanguine (Harris *et al.*, 2007). Cet essai détecte la présence de la mucine 1, une glycoprotéine transmembranaire. Fait intéressant, la galectine-3 se lie à la mucine 1 sur les cellules épithéliales mammaires humaines (Q. Zhao *et al.*, 2010b). Cette interaction permet l'agrégation homotypique des cellules et prévient l'anoïkis. Le lien entre la galectine-3 et cette glycoprotéine de surface, qui possiblement peut se retrouver chez les autres galectines, semble important pour la survie des cellules mammaires cancéreuses en circulation. Lorsque leur localisation est stromale, l'attachement des galectines aux différents récepteurs membranaires pourrait expliquer, en partie, leur accumulation sanguine.

Le développement de traitements selon la signature des galectines

L'inhibition du CRD des galectines ne devrait pas être utilisée pour le traitement du cancer du sein, selon notre étude. Les principales raisons sont: 1) les composés dérivés de sucres ciblent tous les membres des galectines, sans spécificité; et 2) les fonctions pro-tumorales CRD-indépendantes ne sont pas bloquées par les sucres.

Un criblage à haut débit de composés chimiques permet d'identifier les composés pour lesquels, par exemple, la viabilité des cellules tumorales est diminuée (Gupta *et al.*, 2009). L'utilisation de lignées de cellules du cancer du sein exprimant différentes signatures de galectines, de façon exogène ou endogène, permettrait d'identifier les drogues les plus efficaces selon les galectines exprimées. De plus, l'utilisation de cultures organotypiques en trois dimensions (fibronectine, collagène de type I, cellules mésothéliales, fibroblastes et cellules cancéreuses) dans un criblage à haut débit permettra d'analyser l'impact des galectines 1, 3 et 9 retrouvées dans le compartiment extracellulaire adjacent aux carcinomes mammaires (Kenny *et al.*, 2015). Par la suite, des études *in vitro* et *in vivo* pourront confirmer l'efficacité des composés identifiés.

L'utilisation de peptides pour inhiber les galectines est une avenue qui permet de cibler spécifiquement les galectines impliquées dans la progression du cancer. La production d'une librairie de peptides, par exemple par des phages, sera nécessaire pour sélectionner les peptides avec la plus haute affinité, ainsi qu'une spécificité pour une seule galectine (Ullman *et al.*, 2011). L'étude du groupe d'Eric Raymond, ainsi que notre étude, démontrent l'efficacité de peptides spécifiques pour une galectine pour inhiber les fonctions pro-tumorales (Astorgues-Xerri *et al.*, 2014, Vladioiu *et al.*, 2015). De plus, une étude sur le cancer du sein a montré la diminution de métastases pulmonaires suite à l'administration intraveineuse du peptide G3-C12. Ce peptide a une forte affinité, ainsi qu'une spécificité pour la galectine-3. Pour empêcher la dégradation des peptides, une limite importante des peptides thérapeutiques, des nanotransporteurs peuvent être utilisés (Patel *et al.*, 2014). De plus, les nanotransporteurs ont la propriété de s'attacher à un récepteur spécifique, par exemple un antigène abondant à la surface des cellules tumorales (Perez-Herrero *et al.*, 2015). L'internalisation des nanotransporteurs permet la relâche de son contenu, par exemple des peptides, dans le compartiment intracellulaire. Les plus grandes avancées dans ce domaine sont l'administration de la chimiothérapie. La synergie potentielle entre le peptide OTX008 et la chimiothérapie pourrait être testé par leur administration dans des nanotransporteurs (Astorgues-Xerri *et al.*, 2014).

CHAPITRE 5

CONCLUSION GÉNÉRALE

En conclusion, nous avons contribué à l'avancement des connaissances quant au rôle pro-tumoral de la galectine-7 dans le cancer du sein. Nous avons atteint les différents objectifs définis pour les travaux de cette thèse: 1) l'identification du mécanisme moléculaire anti-apoptotique de la galectine-7 de par son interaction avec p53, ce qui augmente la dégradation protéasomale de p53; 2) la localisation cytosolique de la galectine-7 qui est responsable de ce mécanisme de résistance à la chimiothérapie; et 3) la démonstration que la structure du CRD ne confère pas cette activité anti-apoptotique, de par l'utilisation d'un mutant ponctuel (Figure 5.1).

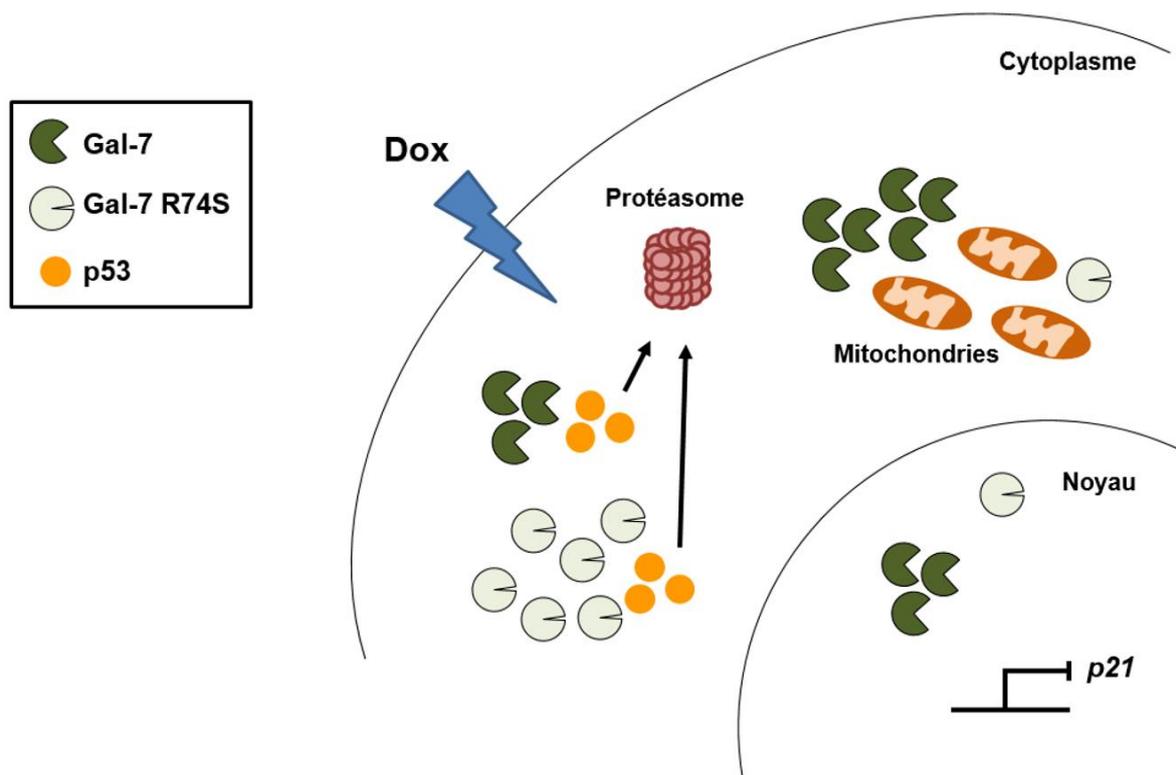


Figure 5.1 Modèle du mécanisme moléculaire anti-apoptotique de la galectine-7 dans les cellules du cancer du sein. La galectine-7 normale se retrouve dans les compartiments cytosolique, nucléaire et mitochondrial. Lorsque la mutation R74S, au sein du CRD, est appliquée à la galectine-7, sa localisation se restreint principalement au cytosol. En présence d'un agent chimiothérapeutique, tel que la doxorubicine, la galectine-7 cytosolique interagit avec p53, ce qui a pour effet d'augmenter sa dégradation au protéasome. Il en résulte une diminution de la transcription des gènes cibles de p53, tels que *CDKN1A*. L'absence des protéines pro-apoptotiques, p53 et p21, induit un phénotype anti-apoptotique dans les cellules du cancer du sein.

Nous avons, par la suite, analysé la signature des galectines dans les différents sous-types du cancer du sein humain. L'importance de l'analyse non seulement en ARNm et en protéine, mais également dans les différentes cellules (épithéliales vs stromales) et compartiments intracellulaires, a été soulevée. La présence d'un patron stromal triple-positif pour les galectines 1, 3 et 9 est associée au sous-type le plus agressif, le triple-négatif. De plus, la compartimentalisation intracellulaire est essentielle pour la prédiction de la survie des

patientes atteintes du cancer du sein. L'importance de l'analyse de l'ensemble des galectines est bien représentée par deux galectines en particulier. La galectine-1 nucléaire qui est associée à un mauvais pronostic, ainsi que la galectine-8 qui, à l'inverse, est associée à une meilleure survie des femmes atteintes d'un cancer du sein. L'évaluation de la double expression nucléaire de ces galectines, au sein d'une même tumeur, démontre la dominance de la galectine-8 puisque les femmes atteintes de ces tumeurs ont toutes survécu dans les 5 ans suivant le diagnostic. Bien que nous ayons déterminé que l'expression des gènes *Igals12*, *Igals13* et *Igals14* est associée à un bon pronostic, l'analyse de leurs niveaux protéiques, ainsi que leur localisation sera nécessaire pour obtenir la signature complète des galectines dans le cancer du sein.

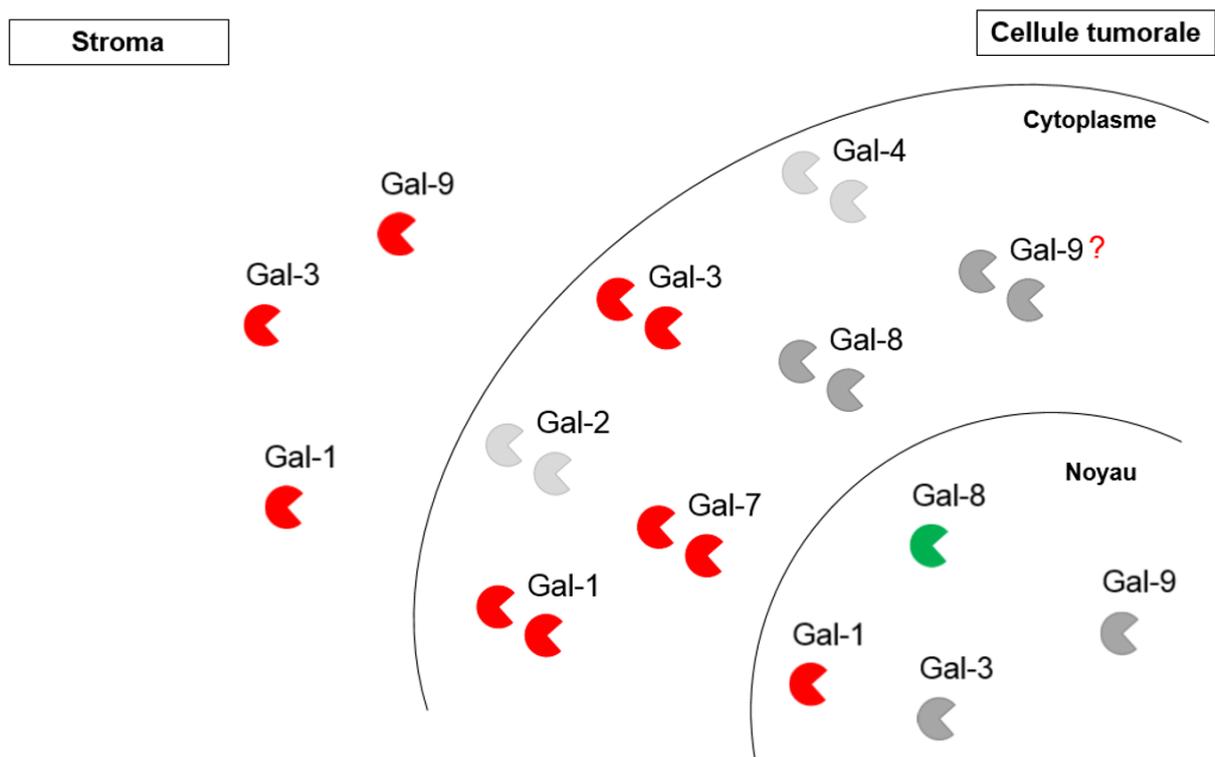


Figure 5.2 Schématisation de l'étude sur les signatures de galectines dans le cancer du sein. Dans les cellules tumorales mammaires, la galectine-1 est associée à des facteurs de mauvais pronostic. De plus, les galectines 3, 7 et potentiellement la galectine-9 sont associées à une diminution de la survie sans récurrence. La localisation nucléaire de la galectine-1 est associée à une diminution de la survie sans métastase et totale des patientes atteintes du cancer du sein triple-négatif. À l'inverse, la localisation nucléaire de la galectine-8 est associée à une meilleure survie sans récurrence, sans métastase et totale. Ce dernier pronostic est dominant en présence, dans le noyau, des galectines 1 et 8. Dans le stroma des tumeurs mammaires, la signature des galectines 1, 3 et 9 est associée à des facteurs de mauvais pronostic. Gris pâle: faible expression; Gris foncé: aucun impact sur le pronostic; Rouge: associé à un mauvais pronostic; Vert: associé à un bon pronostic.

En perspective, le développement d'inhibiteurs de la galectine-7 devra être orienté sur sa structure non-CRD. La détermination du domaine précis à cibler est primordiale. Des études préliminaires de notre laboratoire démontrent l'efficacité d'un inhibiteur peptidique qui cible

l'interface dimérique de la galectine-7 (Vladoiu *et al.*, 2015). Cette interface se retrouve à l'opposé de la poche du CRD. La perte de la forme dimérique diminue l'efficacité pro-apoptotique de la galectine-7 à la surface des lymphocytes T. Il nous faudra démontrer l'efficacité de cet inhibiteur lorsqu'intracellulaire. Une possibilité est que la perte de dimères de la galectine-7 pourrait diminuer son interaction à p53, ce qui permettrait de rétablir l'apoptose induite par la chimiothérapie dans les cellules du cancer du sein. La galectine-7 est une cible thérapeutique à considérer puisque les souris déficientes en cette protéine ne présentent que très peu d'anomalies qui sont principalement reliées à la cicatrisation. Ces observations suggèrent peu d'effets secondaires sévères suite à un traitement qui inhibe la galectine-7.

Il y a également le potentiel diagnostique des différents membres de la famille des galectines. Une technique de routine, telle que l'immunohistochimie des protéines ER, PR et HER-2, pourrait être appliquée à l'évaluation de l'expression protéique des galectines. De plus, le score du marquage devrait tenir compte de la compartimentalisation, c'est-à-dire seulement dans le cytosol ou à la fois dans le cytosol et le noyau. C'est ce que les pathologistes déterminent lorsqu'ils confirment une surexpression de HER-2. Dans ce cas-ci, c'est l'accumulation à la membrane qui est évalué. L'analyse de la présence des galectines 1, 3 et 9 dans le sérum des patientes atteintes du cancer du sein triple-négatif devra être réalisée. S'avérant que les galectines 1, 3 et 9 se retrouvent également dans le sang, un diagnostic du cancer du sein ou la détermination d'une récurrence biochimique par un simple prélèvement sanguin pourrait améliorer la prise en charge des femmes atteintes du cancer du sein.

RÉFÉRENCES

- Ades F, Zardavas D, Bozovic-Spasojevic I, Pugliano L, Fumagalli D, de Azambuja E, Viale G, Sotiriou C & Piccart M (2014) Luminal B breast cancer: molecular characterization, clinical management, and future perspectives. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 32(25):2794-2803.
- Advedissian T, Deshayes F, Poirier F, Grandjean C & Viguier M (2015) [Galectins, a class of unconventional lectins]. *Medecine sciences : M/S* 31(5):499-505.
- Akahani S, Nangia-Makker P, Inohara H, Kim HR & Raz A (1997) Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family. *Cancer research* 57(23):5272-5276.
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ & Clarke MF (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(7):3983-3988.
- Allred DC, Harvey JM, Berardo M & Clark GM (1998) Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 11(2):155-168.
- Alves PM, Godoy GP, Gomes DQ, Medeiros AM, de Souza LB, da Silveira EJ, Vasconcelos MG & Queiroz LM (2011) Significance of galectins-1, -3, -4 and -7 in the progression of squamous cell carcinoma of the tongue. *Pathology, research and practice* 207(4):236-240.
- Antoniell M, Giorgio V, Fogolari F, Glick GD, Bernardi P & Lippe G (2014) The oligomycin-sensitivity conferring protein of mitochondrial ATP synthase: emerging new roles in mitochondrial pathophysiology. *International journal of molecular sciences* 15(5):7513-7536.
- Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, Baratin D, Csardi G, de Castro E, Duvaud S, Flegel V, Fortier A, Gasteiger E, Grosdidier A, Hernandez C, Ioannidis V, Kuznetsov D, Liechti R, Moretti S, Mostaguir K, Redaschi N, Rossier G, Xenarios I & Stockinger H (2012) ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic acids research* 40(Web Server issue):W597-603.
- Astorgues-Xerri L, Riveiro ME, Tijeras-Raballand A, Serova M, Rabinovich GA, Bieche I, Vidaud M, de Gramont A, Martinet M, Cvitkovic E, Faivre S & Raymond E (2014) OTX008, a selective small-molecule inhibitor of galectin-1, downregulates cancer cell proliferation, invasion and tumour angiogenesis. *Eur J Cancer* 50(14):2463-2477.
- Badve S, Dabbs DJ, Schnitt SJ, Baehner FL, Decker T, Eusebi V, Fox SB, Ichihara S, Jacquemier J, Lakhani SR, Palacios J, Rakha EA, Richardson AL, Schmitt FC, Tan PH, Tse GM, Weigelt B, Ellis IO & Reis-Filho JS (2011) Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 24(2):157-167.
- Badve S & Nakshatri H (2009) Oestrogen-receptor-positive breast cancer: towards bridging histopathological and molecular classifications. *Journal of clinical pathology* 62(1):6-12.
- Baker GJ, Chockley P, Yadav VN, Doherty R, Ritt M, Sivaramakrishnan S, Castro MG & Lowenstein PR (2014) Natural killer cells eradicate galectin-1-deficient glioma in the absence of adaptive immunity. *Cancer research* 74(18):5079-5090.

- Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, Gitt MA, Hirabayashi J, Hughes C, Kasai K & et al. (1994a) Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell* 76(4):597-598.
- Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA & Leffler H (1994b) Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *The Journal of biological chemistry* 269(33):20807-20810.
- Barrientos A, Fontanesi F & Diaz F (2009) Evaluation of the mitochondrial respiratory chain and oxidative phosphorylation system using polarography and spectrophotometric enzyme assays. *Current protocols in human genetics / editorial board, Jonathan L. Haines ... [et al.]* Chapter 19:Unit19 13.
- Barrientos G, Freitag N, Tirado-Gonzalez I, Unverdorben L, Jeschke U, Thijssen VL & Blois SM (2014) Involvement of galectin-1 in reproduction: past, present and future. *Human reproduction update* 20(2):175-193.
- Barrow H, Guo X, Wandall HH, Pedersen JW, Fu B, Zhao Q, Chen C, Rhodes JM & Yu LG (2011) Serum galectin-2, -4, and -8 are greatly increased in colon and breast cancer patients and promote cancer cell adhesion to blood vascular endothelium. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17(22):7035-7046.
- Bartolazzi A, Orlandi F, Saggiorato E, Volante M, Arecco F, Rossetto R, Palestini N, Ghigo E, Papotti M, Bussolati G, Martegani MP, Pantellini F, Carpi A, Giovagnoli MR, Monti S, Toscano V, Sciacchitano S, Pennelli GM, Mian C, Pelizzo MR, Rugge M, Troncone G, Palombini L, Chiappetta G, Botti G, Vecchione A & Bellocco R (2008) Galectin-3-expression analysis in the surgical selection of follicular thyroid nodules with indeterminate fine-needle aspiration cytology: a prospective multicentre study. *The Lancet. Oncology* 9(6):543-549.
- Baselga J, Campone M, Piccart M, Burris HA, 3rd, Rugo HS, Sahmoud T, Noguchi S, Gnant M, Pritchard KI, Lebrun F, Beck JT, Ito Y, Yardley D, Deleu I, Perez A, Bachelot T, Vittori L, Xu Z, Mukhopadhyay P, Lebwohl D & Hortobagyi GN (2012a) Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *The New England journal of medicine* 366(6):520-529.
- Baselga J, Cortes J, Kim SB, Im SA, Hegg R, Im YH, Roman L, Pedrini JL, Pienkowski T, Knott A, Clark E, Benyunes MC, Ross G & Swain SM (2012b) Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *The New England journal of medicine* 366(2):109-119.
- Bedard PL, Hansen AR, Ratain MJ & Siu LL (2013) Tumour heterogeneity in the clinic. *Nature* 501(7467):355-364.
- Bektas S, Bahadir B, Ucan BH & Ozdamar SO (2010) CD24 and galectin-1 expressions in gastric adenocarcinoma and clinicopathologic significance. *Pathology oncology research : POR* 16(4):569-577.
- Belo AI, van der Sar AM, Tefsen B & van Die I (2013) Galectin-4 Reduces Migration and Metastasis Formation of Pancreatic Cancer Cells. *PloS one* 8(6):e65957.
- Bernerd F, Sarasin A & Magnaldo T (1999) Galectin-7 overexpression is associated with the apoptotic process in UVB-induced sunburn keratinocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(20):11329-11334.

- Bhandary S & Aguan K (2015) Pyruvate dehydrogenase complex deficiency and its relationship with epilepsy frequency - An overview. *Epilepsy research* 116:40-52.
- Biron-Pain K, Grosset AA, Poirier F, Gaboury L & St-Pierre Y (2013) Expression and functions of galectin-7 in human and murine melanomas. *PloS one* 8(5):e63307.
- Blidner AG & Rabinovich GA (2013) 'Sweetening' pregnancy: galectins at the fetomaternal interface. *Am J Reprod Immunol* 69(4):369-382.
- Blois SM & Barrientos G (2014) Galectin signature in normal pregnancy and preeclampsia. *Journal of reproductive immunology* 101-102:127-134.
- Bode AM & Dong Z (2004) Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nature reviews. Cancer* 4(10):793-805.
- Boileau C, Poirier F, Pelletier JP, Guevremont M, Duval N, Martel-Pelletier J & Reboul P (2008) Intracellular localisation of galectin-3 has a protective role in chondrocyte survival. *Annals of the rheumatic diseases* 67(2):175-181.
- Borges CB, Bernardes ES, Latorraca EF, Becker AP, Neder L, Chammas R, Roque-Barreira MC, Machado HR & de Oliveira RS (2011) Galectin-3 expression: a useful tool in the differential diagnosis of posterior fossa tumors in children. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery* 27(2):253-257.
- Bougeard G, Renaux-Petel M, Flaman JM, Charbonnier C, Fermey P, Belotti M, Gauthier-Villars M, Stoppa-Lyonnet D, Consolino E, Brugieres L, Caron O, Benusiglio PR, Bressac-de Paillerets B, Bonadona V, Bonaiti-Pellie C, Tinat J, Baert-Desurmont S & Frebourg T (2015) Revisiting Li-Fraumeni Syndrome From TP53 Mutation Carriers. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 33(21):2345-2352.
- Brewer CF, Miceli MC & Baum LG (2002) Clusters, bundles, arrays and lattices: novel mechanisms for lectin-saccharide-mediated cellular interactions. *Current opinion in structural biology* 12(5):616-623.
- Brisken C & Duss S (2007) Stem cells and the stem cell niche in the breast: an integrated hormonal and developmental perspective. *Stem cell reviews* 3(2):147-156.
- 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(6):869-883.
- Burmakin M, Shi Y, Hedstrom E, Kogner P & Selivanova G (2013) Dual targeting of wild-type and mutant p53 by small molecule RITA results in the inhibition of N-Myc and key survival oncogenes and kills neuroblastoma cells in vivo and in vitro. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19(18):5092-5103.
- Burnham-Marusich AR & Berninsone PM (2012) Multiple proteins with essential mitochondrial functions have glycosylated isoforms. *Mitochondrion* 12(4):423-427.
- Cada Z, Chovanec M, Smetana K, Betka J, Lacina L, Plzak J, Kodet R, Stork J, Lensch M, Kaltner H, Andre S & Gabius HJ (2009) Galectin-7: will the lectin's activity establish clinical correlations in head and neck squamous cell and basal cell carcinomas? *Histology and histopathology* 24(1):41-48.

- Camp RL, Charette LA & Rimm DL (2000) Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 80(12):1943-1949.
- Campion CG, Labrie M, Grosset AA & St-Pierre Y (2014) The CCAAT/enhancer-binding protein beta-2 isoform (CEBPbeta-2) upregulates galectin-7 expression in human breast cancer cells. *PLoS one* 9(5):e95087.
- Campion CG, Labrie M, Lavoie G & St-Pierre Y (2013) Expression of galectin-7 is induced in breast cancer cells by mutant p53. *PLoS one* 8(8):e72468.
- Canadian Cancer Society's Advisory Committee on Cancer Statistics (2014) Canadian Cancer Statistics 2014. Toronto, ON: Canadian Cancer Society).
- Cao Z, Said N, Amin S, Wu HK, Bruce A, Garate M, Hsu DK, Kuwabara I, Liu FT & Panjwani N (2002) Galectins-3 and -7, but not galectin-1, play a role in re-epithelialization of wounds. *The Journal of biological chemistry* 277(44):42299-42305.
- Cao Z, Said N, Wu HK, Kuwabara I, Liu FT & Panjwani N (2003) Galectin-7 as a potential mediator of corneal epithelial cell migration. *Archives of ophthalmology* 121(1):82-86.
- Carey L, Winer E, Viale G, Cameron D & Gianni L (2010) Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience? *Nature reviews. Clinical oncology* 7(12):683-692.
- Castronovo V, Van Den Brule FA, Jackers P, Clausse N, Liu FT, Gillet C & Sobel ME (1996) Decreased expression of galectin-3 is associated with progression of human breast cancer. *The Journal of pathology* 179(1):43-48.
- Cedeno-Laurent F, Opperman M, Barthel SR, Kuchroo VK & Dimitroff CJ (2012) Galectin-1 triggers an immunoregulatory signature in Th cells functionally defined by IL-10 expression. *J Immunol* 188(7):3127-3137.
- Cerliani JP, Dalotto-Moreno T, Compagno D, Dergan-Dylon LS, Laderach DJ, Gentilini L, Croci DO, Mendez-Huergo SP, Toscano MA, Salatino M & Rabinovich GA (2015) Study of galectins in tumor immunity: strategies and methods. *Methods Mol Biol* 1207:249-268.
- Chakrabarti R, Wei Y, Hwang J, Hang X, Andres Blanco M, Choudhury A, Tiede B, Romano RA, DeCoste C, Mercatali L, Ibrahim T, Amadori D, Kannan N, Eaves CJ, Sinha S & Kang Y (2014) DeltaNp63 promotes stem cell activity in mammary gland development and basal-like breast cancer by enhancing Fzd7 expression and Wnt signalling. *Nature cell biology* 16(10):1004-1015, 1001-1013.
- Chauhan D, Li G, Podar K, Hideshima T, Neri P, He D, Mitsiades N, Richardson P, Chang Y, Schindler J, Carver B & Anderson KC (2005) A novel carbohydrate-based therapeutic GCS-100 overcomes bortezomib resistance and enhances dexamethasone-induced apoptosis in multiple myeloma cells. *Cancer research* 65(18):8350-8358.
- Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, Watson M, Davies S, Bernard PS, Parker JS, Perou CM, Ellis MJ & Nielsen TO (2009) Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 101(10):736-750.
- Chen C, Duckworth CA, Fu B, Pritchard DM, Rhodes JM & Yu LG (2014) Circulating galectins -2, -4 and -8 in cancer patients make important contributions to the increased circulation of several cytokines and chemokines that promote angiogenesis and metastasis. *British journal of cancer* 110(3):741-752.

- Chen Y, Shi HY, Stock SR, Stern PH & Zhang M (2011) Regulation of breast cancer-induced bone lesions by beta-catenin protein signaling. *The Journal of biological chemistry* 286(49):42575-42584.
- Chikarmane SA, Tirumani SH, Howard SA, Jagannathan JP & DiPiro PJ (2015) Metastatic patterns of breast cancer subtypes: what radiologists should know in the era of personalized cancer medicine. *Clinical radiology* 70(1):1-10.
- Chiu CG, Strugnelli SS, Griffith OL, Jones SJ, Gown AM, Walker B, Nabi IR & Wiseman SM (2010) Diagnostic utility of galectin-3 in thyroid cancer. *The American journal of pathology* 176(5):2067-2081.
- Chung CH, Bernard PS & Perou CM (2002) Molecular portraits and the family tree of cancer. *Nature genetics* 32 Suppl:533-540.
- Claros MG & Vincens P (1996) Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *European journal of biochemistry / FEBS* 241(3):779-786.
- Clausse N, van den Brule F, Waltregny D, Garnier F & Castronovo V (1999) Galectin-1 expression in prostate tumor-associated capillary endothelial cells is increased by prostate carcinoma cells and modulates heterotypic cell-cell adhesion. *Angiogenesis* 3(4):317-325.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (1997) Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. *Lancet* 350(9084):1047-1059.
- College of American Pathologists (2013) *Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Invasive Carcinoma of the Breast*), <http://www.cap.org/ShowProperty?nodePath=/UCMCon/Contribution%20Folders/WebContent/pdf/cp-breast-inVersionasiVersione-13protocol-3200.pdf>
- Compagno D, Laderach DJ, Gentilini L, Jaworski FM & Rabinovich GA (2013) Delineating the "galectin signature" of the tumor microenvironment. *Oncoimmunology* 2(4):e23565.
- Cooper DN (2002) Galectinomics: finding themes in complexity. *Biochimica et biophysica acta* 1572(2-3):209-231.
- Dalotto-Moreno T, Croci DO, Cerliani JP, Martinez-Allo VC, Dergan-Dylon S, Mendez-Huergo SP, Stupirski JC, Mazal D, Osinaga E, Toscano MA, Sundblad V, Rabinovich GA & Salatino M (2013) Targeting galectin-1 overcomes breast cancer-associated immunosuppression and prevents metastatic disease. *Cancer research* 73(3):1107-1117.
- Danguy A, Rorive S, Decaestecker C, Bronckart Y, Kaltner H, Hadari YR, Goren R, Zich Y, Petein M, Salmon I, Gabius HJ & Kiss R (2001) Immunohistochemical profile of galectin-8 expression in benign and malignant tumors of epithelial, mesenchymatous and adipous origins, and of the nervous system. *Histology and histopathology* 16(3):861-868.
- de Vasconcelos Carvalho M, Pereira Jdos S, Alves PM, Silveira EJ, de Souza LB & Queiroz LM (2013) Alterations in the immunoexpression of galectins-1, -3 and -7 between different grades of oral epithelial dysplasia. *Journal of oral pathology & medicine* :

official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology 42(2):174-179.

- de Waard A, Hickman S & Kornfeld S (1976) Isolation and properties of beta-galactoside binding lectins of calf heart and lung. *The Journal of biological chemistry* 251(23):7581-7587.
- Delaglio F, Grzesiek S, Vuister GW, Zhu G, Pfeifer J & Bax A (1995) NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *Journal of biomolecular NMR* 6(3):277-293.
- Demers M, Biron-Pain K, Hebert J, Lamarre A, Magnaldo T & St-Pierre Y (2007) Galectin-7 in lymphoma: elevated expression in human lymphoid malignancies and decreased lymphoma dissemination by antisense strategies in experimental model. *Cancer research* 67(6):2824-2829.
- Demers M, Magnaldo T & St-Pierre Y (2005) A novel function for galectin-7: promoting tumorigenesis by up-regulating MMP-9 gene expression. *Cancer research* 65(12):5205-5210.
- Demers M, Rose AA, Grosset AA, Biron-Pain K, Gaboury L, Siegel PM & St-Pierre Y (2010) Overexpression of galectin-7, a myoepithelial cell marker, enhances spontaneous metastasis of breast cancer cells. *The American journal of pathology* 176(6):3023-3031.
- Demotte N, Bigirimana R, Wieers G, Stroobant V, Squifflet JL, Carrasco J, Thielemans K, Baurain JF, Van Der Smissen P, Courtoy PJ & van der Bruggen P (2014) A short treatment with galactomannan GM-CT-01 corrects the functions of freshly isolated human tumor-infiltrating lymphocytes. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 20(7):1823-1833.
- Dewar R, Fadare O, Gilmore H & Gown AM (2011) Best practices in diagnostic immunohistochemistry: myoepithelial markers in breast pathology. *Archives of pathology & laboratory medicine* 135(4):422-429.
- Dey N, Barwick BG, Moreno CS, Ordanic-Kodani M, Chen Z, Oprea-Ilie G, Tang W, Catzavelos C, Kerstann KF, Sledge GW, Jr., Abramovitz M, Bouzyk M, De P & Leyland-Jones BR (2013) Wnt signaling in triple negative breast cancer is associated with metastasis. *BMC cancer* 13:537.
- Di Cosimo S & Baselga J (2010) Management of breast cancer with targeted agents: importance of heterogeneity. [corrected]. *Nature reviews. Clinical oncology* 7(3):139-147.
- Di Lella S, Sundblad V, Cerliani JP, Guardia CM, Estrin DA, Vasta GR & Rabinovich GA (2011) When galectins recognize glycans: from biochemistry to physiology and back again. *Biochemistry* 50(37):7842-7857.
- Diamandis EP, Bast RC, Jr., Gold P, Chu TM & Magnani JL (2013) Reflection on the discovery of carcinoembryonic antigen, prostate-specific antigen, and cancer antigens CA125 and CA19-9. *Clinical chemistry* 59(1):22-31.
- Dings RP, Miller MC, Nesmelova I, Astorgues-Xerri L, Kumar N, Serova M, Chen X, Raymond E, Hoyer TR & Mayo KH (2012) Antitumor agent calixarene 0118 targets human galectin-1 as an allosteric inhibitor of carbohydrate binding. *Journal of medicinal chemistry* 55(11):5121-5129.
- Doucet N, Watt ED & Loria JP (2009) The flexibility of a distant loop modulates active site motion and product release in ribonuclease A. *Biochemistry* 48(30):7160-7168.

- Dowsett M, Sestak I, Lopez-Knowles E, Sidhu K, Dunbier AK, Cowens JW, Ferree S, Storhoff J, Schaper C & Cuzick J (2013) Comparison of PAM50 risk of recurrence score with oncotype DX and IHC4 for predicting risk of distant recurrence after endocrine therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 31(22):2783-2790.
- Elad-Sfadia G, Haklai R, Balan E & Kloog Y (2004) Galectin-3 augments K-Ras activation and triggers a Ras signal that attenuates ERK but not phosphoinositide 3-kinase activity. *The Journal of biological chemistry* 279(33):34922-34930.
- Elad-Sfadia G, Haklai R, Ballan E, Gabius HJ & Kloog Y (2002) Galectin-1 augments Ras activation and diverts Ras signals to Raf-1 at the expense of phosphoinositide 3-kinase. *The Journal of biological chemistry* 277(40):37169-37175.
- Elola MT, Ferragut F, Cardenas Delgado VM, Nuges LG, Gentilini L, Laderach D, Troncoso MF, Compagno D, Wolfenstein-Todel C & Rabinovich GA (2014) Expression, localization and function of galectin-8, a tandem-repeat lectin, in human tumors. *Histology and histopathology* 29(9):1093-1105.
- Elston CW & Ellis IO (1991) Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 19(5):403-410.
- Ermakova E, Miller MC, Nesmelova IV, Lopez-Merino L, Berbis MA, Nesmelov Y, Tkachev YV, Lagartera L, Daragan VA, Andre S, Canada FJ, Jimenez-Barbero J, Solis D, Gabius HJ & Mayo KH (2013) Lactose binding to human galectin-7 (p53-induced gene 1) induces long-range effects through the protein resulting in increased dimer stability and evidence for positive cooperativity. *Glycobiology* 23(5):508-523.
- Eude-Le Parco I, Gendronneau G, Dang T, Delacour D, Thijssen VL, Edelman W, Peuchmaur M & Poirier F (2009) Genetic assessment of the importance of galectin-3 in cancer initiation, progression, and dissemination in mice. *Glycobiology* 19(1):68-75.
- Farmer P, Bonnefoi H, Anderle P, Cameron D, Wirapati P, Becette V, Andre S, Piccart M, Campone M, Brain E, Macgrogan G, Petit T, Jassem J, Bibeau F, Blot E, Bogaerts J, Aguet M, Bergh J, Iggo R & Delorenzi M (2009) A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Nature medicine* 15(1):68-74.
- Feilchenfeldt J, Totsch M, Sheu SY, Robert J, Spiliopoulos A, Frilling A, Schmid KW & Meier CA (2003) Expression of galectin-3 in normal and malignant thyroid tissue by quantitative PCR and immunohistochemistry. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 16(11):1117-1123.
- Fernandez-Aguilar S & Noel JC (2008) Expression of cathepsin D and galectin 3 in tubular carcinomas of the breast. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 116(1):33-40.
- Filipe MD, Meijers WC, Rogier van der Velde A & de Boer RA (2014) Galectin-3 and heart failure: Prognosis, prediction & clinical utility. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 10.1016/j.cca.2014.10.009.
- Finak G, Bertos N, Pepin F, Sadekova S, Souleimanova M, Zhao H, Chen H, Omeroglu G, Meterissian S, Omeroglu A, Hallett M & Park M (2008) Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nature medicine* 14(5):518-527.

- Fischer C, Sanchez-Ruderisch H, Welzel M, Wiedenmann B, Sakai T, Andre S, Gabius HJ, Khachigian L, Detjen KM & Rosewicz S (2005) Galectin-1 interacts with the $\alpha_5\beta_1$ fibronectin receptor to restrict carcinoma cell growth via induction of p21 and p27. *The Journal of biological chemistry* 280(44):37266-37277.
- Fletcher JI, Haber M, Henderson MJ & Norris MD (2010) ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nature reviews. Cancer* 10(2):147-156.
- Foulkes WD (2008) Inherited susceptibility to common cancers. *The New England journal of medicine* 359(20):2143-2153.
- Fukumori T, Takenaka Y, Yoshii T, Kim HR, Hogan V, Inohara H, Kagawa S & Raz A (2003) CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. *Cancer research* 63(23):8302-8311.
- Funasaka T, Balan V, Raz A & Wong RW (2013) Nucleoporin Nup98 mediates galectin-3 nuclear-cytoplasmic trafficking. *Biochemical and biophysical research communications* 434(1):155-161.
- Funasaka T, Raz A & Nangia-Makker P (2014) Nuclear transport of galectin-3 and its therapeutic implications. *Seminars in cancer biology* 27:30-38.
- Garner OB & Baum LG (2008) Galectin-glycan lattices regulate cell-surface glycoprotein organization and signalling. *Biochemical Society transactions* 36(Pt 6):1472-1477.
- Gendronneau G, Sidhu SS, Delacour D, Dang T, Calonne C, Houzelstein D, Magnaldo T & Poirier F (2008) Galectin-7 in the control of epidermal homeostasis after injury. *Molecular biology of the cell* 19(12):5541-5549.
- Gizurarson S, Huppertz B, Osol G, Skarphedinsson JO, Mandala M & Meiri H (2013) Effects of placental protein 13 on the cardiovascular system in gravid and non-gravid rodents. *Fetal diagnosis and therapy* 33(4):257-264.
- Glinsky VV & Raz A (2009) Modified citrus pectin anti-metastatic properties: one bullet, multiple targets. *Carbohydrate research* 344(14):1788-1791.
- Gong HC, Honjo Y, Nangia-Makker P, Hogan V, Mazurak N, Bresalier RS & Raz A (1999) The NH2 terminus of galectin-3 governs cellular compartmentalization and functions in cancer cells. *Cancer research* 59(24):6239-6245.
- Gromov P, Gromova I, Bunkenborg J, Cabezon T, Moreira JM, Timmermans-Wielenga V, Roepstorff P, Rank F & Celis JE (2010) Up-regulated proteins in the fluid bathing the tumour cell microenvironment as potential serological markers for early detection of cancer of the breast. *Molecular oncology* 4(1):65-89.
- Grosset AA, Labrie M, Gagne D, Vladioiu MC, Gaboury L, Doucet N & St-Pierre Y (2014) Cytosolic galectin-7 impairs p53 functions and induces chemoresistance in breast cancer cells. *BMC cancer* 14:801.
- Grutzmann R, Pilarsky C, Ammerpohl O, Luttges J, Bohme A, Sipos B, Foerder M, Alldinger I, Jahnke B, Schackert HK, Kalthoff H, Kremer B, Kloppel G & Saeger HD (2004) Gene expression profiling of microdissected pancreatic ductal carcinomas using high-density DNA microarrays. *Neoplasia* 6(5):611-622.
- Grzesiek S, Stahl SJ, Wingfield PT & Bax A (1996) The CD4 determinant for downregulation by HIV-1 Nef directly binds to Nef. Mapping of the Nef binding surface by NMR. *Biochemistry* 35(32):10256-10261.

- Gupta PB, Onder TT, Jiang G, Tao K, Kuperwasser C, Weinberg RA & Lander ES (2009) Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell* 138(4):645-659.
- Hanahan D & Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1):57-70.
- Hanahan D & Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5):646-674.
- Harazono Y, Kho DH, Balan V, Nakajima K, Hogan V & Raz A (2015) Extracellular galectin-3 programs multidrug resistance through Na⁺/K⁺-ATPase and P-glycoprotein signaling. *Oncotarget* 6(23):19592-19604.
- Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, Somerfield MR, Hayes DF & Bast RC, Jr. (2007) American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25(33):5287-5312.
- Hayes EL & Lewis-Wambi JS (2015) Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer: an overview of the proposed roles of noncoding RNA. *Breast cancer research : BCR* 17:40.
- Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Kipari T, Haslett C, Iredale JP, Liu FT, Hughes J & Sethi T (2008) Galectin-3 expression and secretion links macrophages to the promotion of renal fibrosis. *The American journal of pathology* 172(2):288-298.
- Henrick K, Bawumia S, Barboni EA, Mehul B & Hughes RC (1998) Evidence for subsites in the galectins involved in sugar binding at the nonreducing end of the central galactose of oligosaccharide ligands: sequence analysis, homology modeling and mutagenesis studies of hamster galectin-3. *Glycobiology* 8(1):45-57.
- Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, Rasmussen KE, Jones LP, Assefnia S, Chandrasekharan S, Backlund MG, Yin Y, Khrantsov AI, Bastein R, Quackenbush J, Glazer RI, Brown PH, Green JE, Kopelovich L, Furth PA, Palazzo JP, Olopade OI, Bernard PS, Churchill GA, Van Dyke T & Perou CM (2007) Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome biology* 8(5):R76.
- Hirabayashi J & Kasai K (1991) Effect of amino acid substitution by sited-directed mutagenesis on the carbohydrate recognition and stability of human 14-kDa beta-galactoside-binding lectin. *The Journal of biological chemistry* 266(35):23648-23653.
- Hirst J (2013) Mitochondrial complex I. *Annual review of biochemistry* 82:551-575.
- Hu Z, Fan C, Oh DS, Marron JS, He X, Qaqish BF, Livasy C, Carey LA, Reynolds E, Dressler L, Nobel A, Parker J, Ewend MG, Sawyer LR, Wu J, Liu Y, Nanda R, Tretiakova M, Ruiz Orrico A, Dreher D, Palazzo JP, Perreard L, Nelson E, Mone M, Hansen H, Mullins M, Quackenbush JF, Ellis MJ, Olopade OI, Bernard PS & Perou CM (2006) The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC genomics* 7:96.
- Huflejt ME & Leffler H (2004) Galectin-4 in normal tissues and cancer. *Glycoconjugate journal* 20(4):247-255.
- Hughes RC (1999) Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1473(1):172-185.

- Ignatiadis M & Sotiriou C (2013) Luminal breast cancer: from biology to treatment. *Nature reviews. Clinical oncology* 10(9):494-506.
- Inagaki Y, Higashi K, Kushida M, Hong YY, Nakao S, Higashiyama R, Moro T, Itoh J, Mikami T, Kimura T, Shiota G, Kuwabara I & Okazaki I (2008) Hepatocyte growth factor suppresses profibrogenic signal transduction via nuclear export of Smad3 with galectin-7. *Gastroenterology* 134(4):1180-1190.
- Inohara H, Akahani S, Koths K & Raz A (1996) Interactions between galectin-3 and Mac-2-binding protein mediate cell-cell adhesion. *Cancer research* 56(19):4530-4534.
- Irie A, Yamauchi A, Kontani K, Kihara M, Liu D, Shirato Y, Seki M, Nishi N, Nakamura T, Yokomise H & Hirashima M (2005) Galectin-9 as a prognostic factor with antimetastatic potential in breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11(8):2962-2968.
- Issaeva N, Bozko P, Enge M, Protopopova M, Verhoef LG, Masucci M, Pramanik A & Selivanova G (2004) Small molecule RITA binds to p53, blocks p53-HDM-2 interaction and activates p53 function in tumors. *Nature medicine* 10(12):1321-1328.
- Iurisci I, Tinari N, Natoli C, Angelucci D, Cianchetti E & Iacobelli S (2000) Concentrations of galectin-3 in the sera of normal controls and cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 6(4):1389-1393.
- Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD & Knippers R (2001) DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer research* 61(4):1659-1665.
- Jang GB, Kim JY, Cho SD, Park KS, Jung JY, Lee HY, Hong IS & Nam JS (2015) Blockade of Wnt/beta-catenin signaling suppresses breast cancer metastasis by inhibiting CSC-like phenotype. *Scientific reports* 5:12465.
- Jeschke U, Hutter S, Heublein S, Vrekoussis T, Andergassen U, Unverdorben L, Papadakis G & Makrigiannakis A (2013) Expression and function of galectins in the endometrium and at the human fetomaternal interface. *Placenta* 34(10):863-872.
- Jeschke U, Mayr D, Schiessl B, Mylonas I, Schulze S, Kuhn C, Friese K & Walzel H (2007) Expression of galectin-1, -3 (gal-1, gal-3) and the Thomsen-Friedenreich (TF) antigen in normal, IUGR, preeclamptic and HELLP placentas. *Placenta* 28(11-12):1165-1173.
- Jezequel P, Campone M, Gouraud W, Guerin-Charbonnel C, Leux C, Ricolleau G & Campion L (2012) bc-GenExMiner: an easy-to-use online platform for gene prognostic analyses in breast cancer. *Breast cancer research and treatment* 131(3):765-775.
- Jiang J, Jin MS, Kong F, Cao D, Ma HX, Jia Z, Wang YP, Suo J & Cao X (2013) Decreased galectin-9 and increased Tim-3 expression are related to poor prognosis in gastric cancer. *PloS one* 8(12):e81799.
- Jonckheere AI, Smeitink JA & Rodenburg RJ (2012) Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *Journal of inherited metabolic disease* 35(2):211-225.
- Jones C, Mackay A, Grigoriadis A, Cossu A, Reis-Filho JS, Fulford L, Dexter T, Davies S, Bulmer K, Ford E, Parry S, Budroni M, Palmieri G, Neville AM, O'Hare MJ & Lakhani SR (2004) Expression profiling of purified normal human luminal and myoepithelial breast cells: identification of novel prognostic markers for breast cancer. *Cancer research* 64(9):3037-3045.

- Jordan MA & Wilson L (2004) Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature reviews. Cancer* 4(4):253-265.
- Jung EJ, Moon HG, Cho BI, Jeong CY, Joo YT, Lee YJ, Hong SC, Choi SK, Ha WS, Kim JW, Lee CW, Lee JS & Park ST (2007) Galectin-1 expression in cancer-associated stromal cells correlates tumor invasiveness and tumor progression in breast cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 120(11):2331-2338.
- Jung JH, Kim HJ, Yeom J, Yoo C, Shin J, Yoo J, Kang CS & Lee C (2012) Lowered expression of galectin-2 is associated with lymph node metastasis in gastric cancer. *Journal of gastroenterology* 47(1):37-48.
- Junking M, Wongkham C, Sripa B, Sawanyawisuth K, Araki N & Wongkham S (2008) Decreased expression of galectin-3 is associated with metastatic potential of liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Eur J Cancer* 44(4):619-626.
- Junttila MR & de Sauvage FJ (2013) Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature* 501(7467):346-354.
- Juszczynski P, Ouyang J, Monti S, Rodig SJ, Takeyama K, Abramson J, Chen W, Kutok JL, Rabinovich GA & Shipp MA (2007) The AP1-dependent secretion of galectin-1 by Reed Sternberg cells fosters immune privilege in classical Hodgkin lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(32):13134-13139.
- Kageshita T, Kashio Y, Yamauchi A, Seki M, Abedin MJ, Nishi N, Shoji H, Nakamura T, Ono T & Hirashima M (2002) Possible role of galectin-9 in cell aggregation and apoptosis of human melanoma cell lines and its clinical significance. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 99(6):809-816.
- Karlsson A, Follin P, Leffler H & Dahlgren C (1998) Galectin-3 activates the NADPH-oxidase in exudated but not peripheral blood neutrophils. *Blood* 91(9):3430-3438.
- Karnoub AE & Weinberg RA (2008) Ras oncogenes: split personalities. *Nature reviews. Molecular cell biology* 9(7):517-531.
- Kashio Y, Nakamura K, Abedin MJ, Seki M, Nishi N, Yoshida N, Nakamura T & Hirashima M (2003) Galectin-9 induces apoptosis through the calcium-calpain-caspase-1 pathway. *J Immunol* 170(7):3631-3636.
- Kaufman B, Shapira-Frommer R, Schmutzler RK, Audeh MW, Friedlander M, Balmana J, Mitchell G, Fried G, Stemmer SM, Hubert A, Rosengarten O, Steiner M, Loman N, Bowen K, Fielding A & Domchek SM (2015a) Olaparib monotherapy in patients with advanced cancer and a germline BRCA1/2 mutation. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 33(3):244-250.
- Kaufman SA, Harris EE, Bailey L, Chadha M, Dutton SC, Freedman GM, Goyal S, Halyard MY, Horst KC, Novick KL, Park CC, Suh WW, Toppmeyer D, Zook J & Haffty BG (2015b) ACR Appropriateness Criteria(R) Ductal Carcinoma in Situ. *Oncology (Williston Park)* 29(6):446-458, 460-441.
- Kaufmann M, von Minckwitz G, Mamounas EP, Cameron D, Carey LA, Cristofanilli M, Denkert C, Eiermann W, Gnant M, Harris JR, Karn T, Liedtke C, Mauri D, Rouzier R, Ruckhaeberle E, Semiglazov V, Symmans WF, Tutt A & Pusztai L (2012) Recommendations from an international consensus conference on the current status and future of neoadjuvant systemic therapy in primary breast cancer. *Annals of surgical oncology* 19(5):1508-1516.

- Kaufmann T, Schlipf S, Sanz J, Neubert K, Stein R & Borner C (2003) Characterization of the signal that directs Bcl-x(L), but not Bcl-2, to the mitochondrial outer membrane. *The Journal of cell biology* 160(1):53-64.
- Kenny HA, Lal-Nag M, White EA, Shen M, Chiang CY, Mitra AK, Zhang Y, Curtis M, Schryver EM, Bettis S, Jadhav A, Boxer MB, Li Z, Ferrer M & Lengyel E (2015) Quantitative high throughput screening using a primary human three-dimensional organotypic culture predicts in vivo efficacy. *Nature communications* 6:6220.
- Kim HJ, Jeon HK, Lee JK, Sung CO, Do IG, Choi CH, Kim TJ, Kim BG, Bae DS & Lee JW (2013a) Clinical significance of galectin-7 in epithelial ovarian cancer. *Anticancer research* 33(4):1555-1561.
- Kim HR, Lin HM, Biliran H & Raz A (1999) Cell cycle arrest and inhibition of anoikis by galectin-3 in human breast epithelial cells. *Cancer research* 59(16):4148-4154.
- Kim SJ, Hwang JA, Ro JY, Lee YS & Chun KH (2013b) Galectin-7 is epigenetically-regulated tumor suppressor in gastric cancer. *Oncotarget* 4(9):1461-1471.
- Klyosov A, Zomer E & Platt D (2012) *DAVANAT® (GM-CT-01) and colon cancer: preclinical and clinical (Phase I and II) studies*. American Chemical Society,
- Kneller D & Kuntz I (1993) UCSF Sparky: an NMR display. *Annotation and Assignment Tool, University of California, San Francisco* 254.
- Kohrenhagen N, Voelker HU, Kapp M, Dietl J & Kammerer U (2010) The expression of galectin-1 in vulvar neoplasia. *Anticancer research* 30(5):1547-1552.
- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G & Kallioniemi OP (1998) Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature medicine* 4(7):844-847.
- Koo JS & Jung W (2011) Clinicopathologic and immunohistochemical characteristics of triple negative invasive lobular carcinoma. *Yonsei medical journal* 52(1):89-97.
- Kopitz J, Andre S, von Reitzenstein C, Versluis K, Kaltner H, Pieters RJ, Wasano K, Kuwabara I, Liu FT, Cantz M, Heck AJ & Gabius HJ (2003) Homodimeric galectin-7 (p53-induced gene 1) is a negative growth regulator for human neuroblastoma cells. *Oncogene* 22(40):6277-6288.
- Kopitz J, von Reitzenstein C, Muhl C & Cantz M (1994) Role of plasma membrane ganglioside sialidase of human neuroblastoma cells in growth control and differentiation. *Biochemical and biophysical research communications* 199(3):1188-1193.
- Kouros-Mehr H, Bechis SK, Slorach EM, Littlepage LE, Egeblad M, Ewald AJ, Pai SY, Ho IC & Werb Z (2008) GATA-3 links tumor differentiation and dissemination in a luminal breast cancer model. *Cancer cell* 13(2):141-152.
- Kufe DW (2009) Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nature reviews. Cancer* 9(12):874-885.
- Kuwabara I, Kuwabara Y, Yang RY, Schuler M, Green DR, Zuraw BL, Hsu DK & Liu FT (2002) Galectin-7 (PIG1) exhibits pro-apoptotic function through JNK activation and mitochondrial cytochrome c release. *The Journal of biological chemistry* 277(5):3487-3497.
- Labrie M, Vladoiu M, Leclerc BG, Grosset AA, Gaboury L, Stagg J & St-Pierre Y (2015) A Mutation in the Carbohydrate Recognition Domain Drives a Phenotypic Switch in the Role of Galectin-7 in Prostate Cancer. *PLoS one* 10(7):e0131307.

- Labrie M, Vladoiu MC, Grosset AA, Gaboury L & St-Pierre Y (2014) Expression and functions of galectin-7 in ovarian cancer. *Oncotarget* 5(17):7705-7721.
- Laderach DJ, Gentilini LD, Giribaldi L, Delgado VC, Nugnes L, Croci DO, Al Nakouzi N, Sacca P, Casas G, Mazza O, Shipp MA, Vazquez E, Chauchereau A, Kutok JL, Rodig SJ, Elola MT, Compagno D & Rabinovich GA (2013) A unique galectin signature in human prostate cancer progression suggests galectin-1 as a key target for treatment of advanced disease. *Cancer research* 73(1):86-96.
- Lakshminarayan R, Wunder C, Becken U, Howes MT, Benzing C, Arumugam S, Sales S, Ariotti N, Chambon V, Lamaze C, Loew D, Shevchenko A, Gaus K, Parton RG & Johannes L (2014) Galectin-3 drives glycosphingolipid-dependent biogenesis of clathrin-independent carriers. *Nature cell biology* 16(6):595-606.
- Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y & Pietenpol JA (2011) Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of clinical investigation* 121(7):2750-2767.
- Lehmann BD & Pietenpol JA (2014) Identification and use of biomarkers in treatment strategies for triple-negative breast cancer subtypes. *The Journal of pathology* 232(2):142-150.
- Leong AS & Zhuang Z (2011) The changing role of pathology in breast cancer diagnosis and treatment. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology* 78(2):99-114.
- Leonidas DD, Vatzaki EH, Vorum H, Celis JE, Madsen P & Acharya KR (1998) Structural basis for the recognition of carbohydrates by human galectin-7. *Biochemistry* 37(40):13930-13940.
- Levi G & Teichberg VI (1981) Isolation and physicochemical characterization of electrolectin, a beta-D-galactoside binding lectin from the electric organ of *Electrophorus electricus*. *The Journal of biological chemistry* 256(11):5735-5740.
- Levy Y, Arbel-Goren R, Hadari YR, Eshhar S, Ronen D, Elhanany E, Geiger B & Zick Y (2001) Galectin-8 functions as a matricellular modulator of cell adhesion. *The Journal of biological chemistry* 276(33):31285-31295.
- Li B, Rosen JM, McMenamin-Balano J, Muller WJ & Perkins AS (1997) neu/ERBB2 cooperates with p53-172H during mammary tumorigenesis in transgenic mice. *Molecular and cellular biology* 17(6):3155-3163.
- Li LC, Li J & Gao J (2014) Functions of galectin-3 and its role in fibrotic diseases. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 351(2):336-343.
- Liang M, Ueno M, Oomizu S, Arikawa T, Shinonaga R, Zhang S, Yamauchi A & Hirashima M (2008) Galectin-9 expression links to malignant potential of cervical squamous cell carcinoma. *Journal of cancer research and clinical oncology* 134(8):899-907.
- Lim E, Vaillant F, Wu D, Forrest NC, Pal B, Hart AH, Asselin-Labat ML, Gyorki DE, Ward T, Partanen A, Feleppa F, Huschtscha LI, Thorne HJ, Fox SB, Yan M, French JD, Brown MA, Smyth GK, Visvader JE & Lindeman GJ (2009) Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nature medicine* 15(8):907-913.
- Lin HM, Pestell RG, Raz A & Kim HR (2002) Galectin-3 enhances cyclin D(1) promoter activity through SP1 and a cAMP-responsive element in human breast epithelial cells. *Oncogene* 21(52):8001-8010.

- Liu FT, Patterson RJ & Wang JL (2002) Intracellular functions of galectins. *Biochimica et biophysica acta* 1572(2-3):263-273.
- Liu FT & Rabinovich GA (2005) Galectins as modulators of tumour progression. *Nature reviews. Cancer* 5(1):29-41.
- Logullo AF, Lopes AB, Nonogaki S, Soares FA, Netto MM, Nishimoto IN & Brentani MM (2007) C-erbB-2 expression is a better predictor for survival than galectin-3 or p53 in early-stage breast cancer. *Oncology reports* 18(1):121-126.
- Lu J, Pei H, Kaeck M & Thompson HJ (1997) Gene expression changes associated with chemically induced rat mammary carcinogenesis. *Molecular carcinogenesis* 20(2):204-215.
- Luck AA, Evans AJ, Green AR, Rakha EA, Paish C & Ellis IO (2008) The influence of basal phenotype on the metastatic pattern of breast cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 20(1):40-45.
- Lui K, An J, Montalbano J, Shi J, Corcoran C, He Q, Sun H, Sheikh MS & Huang Y (2013) Negative regulation of p53 by Ras superfamily protein RBEL1A. *Journal of cell science* 126(Pt 11):2436-2445.
- Machado I, Lopez Guerrero JA, Navarro S, Mayordomo E, Scotlandi K, Picci P & Llombart-Bosch A (2013) Galectin-1 (GAL-1) expression is a useful tool to differentiate between small cell osteosarcoma and Ewing sarcoma. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 462(6):665-671.
- Macias H & Hinck L (2012) Mammary gland development. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology* 1(4):533-557.
- Mackinnon AC, Gibbons MA, Farnworth SL, Leffler H, Nilsson UJ, Delaine T, Simpson AJ, Forbes SJ, Hirani N, Gauldie J & Sethi T (2012) Regulation of transforming growth factor-beta1-driven lung fibrosis by galectin-3. *American journal of respiratory and critical care medicine* 185(5):537-546.
- Madden SF, Clarke C, Gaule P, Aherne ST, O'Donovan N, Clynes M, Crown J & Gallagher WM (2013) BreastMark: an integrated approach to mining publicly available transcriptomic datasets relating to breast cancer outcome. *Breast cancer research : BCR* 15(4):R52.
- Madsen P, Rasmussen HH, Flint T, Gromov P, Kruse TA, Honore B, Vorum H & Celis JE (1995) Cloning, expression, and chromosome mapping of human galectin-7. *The Journal of biological chemistry* 270(11):5823-5829.
- Magnaldo T, Bernerd F & Darmon M (1995) Galectin-7, a human 14-kDa S-lectin, specifically expressed in keratinocytes and sensitive to retinoic acid. *Developmental biology* 168(2):259-271.
- Magnaldo T, Fowles D & Darmon M (1998) Galectin-7, a marker of all types of stratified epithelia. *Differentiation; research in biological diversity* 63(3):159-168.
- Marusyk A, Tabassum DP, Altmann PM, Almendro V, Michor F & Polyak K (2014) Non-cell-autonomous driving of tumour growth supports sub-clonal heterogeneity. *Nature* 514(7520):54-58.
- Matarrese P, Tinari A, Mormone E, Bianco GA, Toscano MA, Ascione B, Rabinovich GA & Malorni W (2005) Galectin-1 sensitizes resting human T lymphocytes to Fas (CD95)-

- mediated cell death via mitochondrial hyperpolarization, budding, and fission. *The Journal of biological chemistry* 280(8):6969-6985.
- Matsen CB & Neumayer LA (2013) Breast cancer: a review for the general surgeon. *JAMA surgery* 148(10):971-979.
- Matsui Y, Ueda S, Watanabe J, Kuwabara I, Ogawa O & Nishiyama H (2007) Sensitizing effect of galectin-7 in urothelial cancer to cisplatin through the accumulation of intracellular reactive oxygen species. *Cancer research* 67(3):1212-1220.
- Matsukawa S, Morita K, Negishi A, Harada H, Nakajima Y, Shimamoto H, Tomioka H, Tanaka K, Ono M, Yamada T & Omura K (2014) Galectin-7 as a potential predictive marker of chemo- and/or radio-therapy resistance in oral squamous cell carcinoma. *Cancer medicine* 3(2):349-361.
- Matsumoto N, Katoh S, Yanagi S, Arimura Y, Tokojima M, Ueno M, Hirashima M & Nakazato M (2013) A possible role of galectin-9 in the pulmonary fibrosis of patients with interstitial pneumonia. *Lung* 191(2):191-198.
- Mauri D, Pavlidis N, Polyzos NP & Ioannidis JP (2006) Survival with aromatase inhibitors and inactivators versus standard hormonal therapy in advanced breast cancer: meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute* 98(18):1285-1291.
- McCullough PA, Olobatoke A & Vanhecke TE (2011) Galectin-3: a novel blood test for the evaluation and management of patients with heart failure. *Reviews in cardiovascular medicine* 12(4):200-210.
- Medema JP (2013) Cancer stem cells: the challenges ahead. *Nature cell biology* 15(4):338-344.
- Mercier S, St-Pierre C, Pelletier I, Ouellet M, Tremblay MJ & Sato S (2008) Galectin-1 promotes HIV-1 infectivity in macrophages through stabilization of viral adsorption. *Virology* 371(1):121-129.
- Miko E, Meggyes M, Bogar B, Schmitz N, Barakonyi A, Varnagy A, Farkas B, Tamas P, Bodis J, Szekeres-Bartho J, Illes Z & Szereday L (2013) Involvement of Galectin-9/TIM-3 pathway in the systemic inflammatory response in early-onset preeclampsia. *PloS one* 8(8):e71811.
- Miwa HE, Koba WR, Fine EJ, Giricz O, Kenny PA & Stanley P (2013) Bisected, complex N-glycans and galectins in mouse mammary tumor progression and human breast cancer. *Glycobiology* 23(12):1477-1490.
- Mohsin SK, Weiss H, Havighurst T, Clark GM, Berardo M, Roanh le D, To TV, Qian Z, Love RR & Allred DC (2004) Progesterone receptor by immunohistochemistry and clinical outcome in breast cancer: a validation study. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 17(12):1545-1554.
- Moisa A, Fritz P, Eck A, Wehner HD, Murdter T, Simon W & Gabius HJ (2007) Growth/adhesion-regulatory tissue lectin galectin-3: stromal presence but not cytoplasmic/nuclear expression in tumor cells as a negative prognostic factor in breast cancer. *Anticancer research* 27(4B):2131-2139.
- Moisan S, Demers M, Mercier J, Magnaldo T, Potworowski EF & St-Pierre Y (2003) Upregulation of galectin-7 in murine lymphoma cells is associated with progression toward an aggressive phenotype. *Leukemia* 17(4):751-759.
- Morris S, Ahmad N, Andre S, Kaltner H, Gabius HJ, Brenowitz M & Brewer F (2004) Quaternary solution structures of galectins-1, -3, and -7. *Glycobiology* 14(3):293-300.

- Muller PA & Vousden KH (2014) Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer cell* 25(3):304-317.
- Nakahara S, Hogan V, Inohara H & Raz A (2006) Importin-mediated nuclear translocation of galectin-3. *The Journal of biological chemistry* 281(51):39649-39659.
- Nakahara S, Oka N & Raz A (2005) On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 10(2):267-275.
- Nangia-Makker P, Honjo Y, Sarvis R, Akahani S, Hogan V, Pienta KJ & Raz A (2000) Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. *The American journal of pathology* 156(3):899-909.
- Nangiamakker P, Thompson E, Hogan C, Ochieng J & Raz A (1995) Induction of tumorigenicity by galectin-3 in a nontumorigenic human breast-carcinoma cell-line. *International journal of oncology* 7(5):1079-1087.
- Nesmelova IV, Berbis MA, Miller MC, Canada FJ, Andre S, Jimenez-Barbero J, Gabius HJ & Mayo KH (2012) 1H, 13C, and 15N backbone and side-chain chemical shift assignments for the 31 kDa human galectin-7 (p53-induced gene 1) homodimer, a pro-apoptotic lectin. *Biomolecular NMR assignments* 6(2):127-129.
- Nesmelova IV, Ermakova E, Daragan VA, Pang M, Menendez M, Lagartera L, Solis D, Baum LG & Mayo KH (2010) Lactose binding to galectin-1 modulates structural dynamics, increases conformational entropy, and occurs with apparent negative cooperativity. *Journal of molecular biology* 397(5):1209-1230.
- Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, Hernandez-Boussard T, Livasy C, Cowan D, Dressler L, Akslen LA, Ragaz J, Gown AM, Gilks CB, van de Rijn M & Perou CM (2004) Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10(16):5367-5374.
- Nobumoto A, Nagahara K, Oomizu S, Katoh S, Nishi N, Takeshita K, Niki T, Tominaga A, Yamauchi A & Hirashima M (2008) Galectin-9 suppresses tumor metastasis by blocking adhesion to endothelium and extracellular matrices. *Glycobiology* 18(9):735-744.
- Nocito A, Bubendorf L, Tinner EM, Suess K, Wagner U, Forster T, Kononen J, Fijan A, Bruderer J, Schmid U, Ackermann D, Maurer R, Alund G, Knonagel H, Rist M, Anabitarte M, Hering F, Hardmeier T, Schoenenberger AJ, Flury R, Jager P, Fehr JL, Schraml P, Moch H, Mihatsch MJ, Gasser T & Sauter G (2001) Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade. *The Journal of pathology* 194(3):349-357.
- Nuciforo P, Radosevic-Robin N, Ng T & Scaltriti M (2015) Quantification of HER family receptors in breast cancer. *Breast cancer research : BCR* 17:53.
- Oakes SR, Gallego-Ortega D & Ormandy CJ (2014) The mammary cellular hierarchy and breast cancer. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 71(22):4301-4324.
- Ochieng J (2014) Extracellular Functions of Galectin-3: An Update. *JSM Clin Oncol Res* 2(1):1006.
- Ochieng J, Fridman R, Nangia-Makker P, Kleiner DE, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG & Raz A (1994) Galectin-3 is a novel substrate for human matrix metalloproteinases-2 and -9. *Biochemistry* 33(47):14109-14114.

- Ohtsubo K & Marth JD (2006) Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* 126(5):855-867.
- Okano K, Uchida K, Nitta K & Hayashida T (2008) Galectin-1 suppresses alpha2(I) collagen through Smad3 in renal epithelial cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65(20):3304-3311.
- Oltean S & Bates DO (2014) Hallmarks of alternative splicing in cancer. *Oncogene* 33(46):5311-5318.
- Ouellet M, Mercier S, Pelletier I, Bounou S, Roy J, Hirabayashi J, Sato S & Tremblay MJ (2005) Galectin-1 acts as a soluble host factor that promotes HIV-1 infectivity through stabilization of virus attachment to host cells. *J Immunol* 174(7):4120-4126.
- Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T, Hiller W, Fisher ER, Wickerham DL, Bryant J & Wolmark N (2004) A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *The New England journal of medicine* 351(27):2817-2826.
- Park JE, Chang WY & Cho M (2009) Induction of matrix metalloproteinase-9 by galectin-7 through p38 MAPK signaling in HeLa human cervical epithelial adenocarcinoma cells. *Oncology reports* 22(6):1373-1379.
- Park JW, Voss PG, Grabski S, Wang JL & Patterson RJ (2001) Association of galectin-1 and galectin-3 with Gemin4 in complexes containing the SMN protein. *Nucleic acids research* 29(17):3595-3602.
- Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, Davies S, Fauron C, He X, Hu Z, Quackenbush JF, Stijleman IJ, Palazzo J, Marron JS, Nobel AB, Mardis E, Nielsen TO, Ellis MJ, Perou CM & Bernard PS (2009) Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27(8):1160-1167.
- Partridge EA, Le Roy C, Di Guglielmo GM, Pawling J, Cheung P, Granovsky M, Nabi IR, Wrana JL & Dennis JW (2004) Regulation of cytokine receptors by Golgi N-glycan processing and endocytosis. *Science* 306(5693):120-124.
- Patel A, Patel M, Yang X & Mitra AK (2014) Recent advances in protein and Peptide drug delivery: a special emphasis on polymeric nanoparticles. *Protein and peptide letters* 21(11):1102-1120.
- Paz A, Haklai R, Elad-Sfadia G, Ballan E & Kloog Y (2001) Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation. *Oncogene* 20(51):7486-7493.
- Peng W, Wang HY, Miyahara Y, Peng G & Wang RF (2008) Tumor-associated galectin-3 modulates the function of tumor-reactive T cells. *Cancer research* 68(17):7228-7236.
- Perez-Herrero E & Fernandez-Medarde A (2015) Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 93:52-79.
- Perillo NL, Pace KE, Seilhamer JJ & Baum LG (1995) Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature* 378(6558):736-739.
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslén LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning

- PE, Borresen-Dale AL, Brown PO & Botstein D (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406(6797):747-752.
- Petitjean A, Achatz MI, Borresen-Dale AL, Hainaut P & Olivier M (2007) TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene* 26(15):2157-2165.
- Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW & Vogelstein B (1997) A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 389(6648):300-305.
- Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, He X & Perou CM (2010) Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast cancer research : BCR* 12(5):R68.
- Prat A & Perou CM (2009) Mammary development meets cancer genomics. *Nature medicine* 15(8):842-844.
- Prat A & Perou CM (2011) Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular oncology* 5(1):5-23.
- Quinta HR, Pasquini JM, Rabinovich GA & Pasquini LA (2014) Glycan-dependent binding of galectin-1 to neuropilin-1 promotes axonal regeneration after spinal cord injury. *Cell death and differentiation* 21(6):941-955.
- Rabbani A, Finn RM & Ausio J (2005) The anthracycline antibiotics: antitumor drugs that alter chromatin structure. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 27(1):50-56.
- Rabinovich GA & Croci DO (2012) Regulatory circuits mediated by lectin-glycan interactions in autoimmunity and cancer. *Immunity* 36(3):322-335.
- Rabinovich GA & Toscano MA (2009) Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nature reviews. Immunology* 9(5):338-352.
- Rakha EA, Reis-Filho JS & Ellis IO (2008) Basal-like breast cancer: a critical review. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26(15):2568-2581.
- Ramhorst RE, Giribaldi L, Fraccaroli L, Toscano MA, Stupirski JC, Romero MD, Durand ES, Rubinstein N, Blaschitz A, Sedlmayr P, Genti-Raimondi S, Fainboim L & Rabinovich GA (2012) Galectin-1 confers immune privilege to human trophoblast: implications in recurrent fetal loss. *Glycobiology* 22(10):1374-1386.
- Rios AC, Fu NY, Lindeman GJ & Visvader JE (2014) In situ identification of bipotent stem cells in the mammary gland. *Nature* 506(7488):322-327.
- Rios Moreno MJ, Galera-Ruiz H, De Miguel M, Lopez MI, Illanes M & Galera-Davidson H (2011) Immunohistochemical profile of solid cell nest of thyroid gland. *Endocrine pathology* 22(1):35-39.
- Robbins & Cotran (2005) *Pathologic basis of disease*. Elsevier Saunders, Pennsylvania, 7. 1525 p
- Rodriguez-Pinilla SM, Sarrío D, Moreno-Bueno G, Rodríguez-Gil Y, Martínez MA, Hernández L, Hardisson D, Reis-Filho JS & Palacios J (2007) Sox2: a possible driver of the basal-like phenotype in sporadic breast cancer. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 20(4):474-481.

- Roh JL, Ko JH, Moon SJ, Ryu CH, Choi JY & Koch WM (2012) The p53-reactivating small-molecule RITA enhances cisplatin-induced cytotoxicity and apoptosis in head and neck cancer. *Cancer letters* 325(1):35-41.
- Rondanino C, Bousser MT, Monsigny M & Roche AC (2003) Sugar-dependent nuclear import of glycosylated proteins in living cells. *Glycobiology* 13(7):509-519.
- Rorive S, Eddafali B, Fernandez S, Decaestecker C, Andre S, Kaltner H, Kuwabara I, Liu FT, Gabius HJ, Kiss R & Salmon I (2002) Changes in galectin-7 and cytokeratin-19 expression during the progression of malignancy in thyroid tumors: diagnostic and biological implications. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 15(12):1294-1301.
- Ross JS, Fletcher JA, Bloom KJ, Linette GP, Stec J, Symmans WF, Pusztai L & Hortobagyi GN (2004) Targeted therapy in breast cancer: the HER-2/neu gene and protein. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 3(4):379-398.
- Rubinstein N, Alvarez M, Zwirner NW, Toscano MA, Ilarregui JM, Bravo A, Mordoh J, Fainboim L, Podhajcer OL & Rabinovich GA (2004) Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer cell* 5(3):241-251.
- Saal I, Nagy N, Lensch M, Lohr M, Manning JC, Decaestecker C, Andre S, Kiss R, Salmon I & Gabius HJ (2005) Human galectin-2: expression profiling by RT-PCR/immunohistochemistry and its introduction as a histochemical tool for ligand localization. *Histology and histopathology* 20(4):1191-1208.
- Salomonsson E, Carlsson MC, Osla V, Hendus-Altenburger R, Kahl-Knutson B, Oberg CT, Sundin A, Nilsson R, Nordberg-Karlsson E, Nilsson UJ, Karlsson A, Rini JM & Leffler H (2010) Mutational tuning of galectin-3 specificity and biological function. *The Journal of biological chemistry* 285(45):35079-35091.
- Samavat H & Kurzer MS (2015) Estrogen metabolism and breast cancer. *Cancer letters* 356(2 Pt A):231-243.
- Satelli A, Rao PS, Thirumala S & Rao US (2011) Galectin-4 functions as a tumor suppressor of human colorectal cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 129(4):799-809.
- Sato S, Bhaumik P, St-Pierre G & Pelletier I (2014) Role of galectin-3 in the initial control of Leishmania infection. *Critical reviews in immunology* 34(2):147-175.
- Sato S, St-Pierre C, Bhaumik P & Nieminen J (2009) Galectins in innate immunity: dual functions of host soluble beta-galactoside-binding lectins as damage-associated molecular patterns (DAMPs) and as receptors for pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). *Immunological reviews* 230(1):172-187.
- Saussez S, Cludts S, Capouillez A, Mortuaire G, Smetana K, Jr., Kaltner H, Andre S, Leroy X, Gabius HJ & Decaestecker C (2009) 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. *International journal of oncology* 34(2):433-439.
- Saussez S, Cucu DR, Decaestecker C, Chevalier D, Kaltner H, Andre S, Wacreniez A, Toubeau G, Camby I, Gabius HJ & Kiss R (2006) Galectin 7 (p53-induced gene 1): a new prognostic predictor of recurrence and survival in stage IV hypopharyngeal cancer. *Annals of surgical oncology* 13(7):999-1009.

- Saussez S, Decaestecker C, Lorfèvre F, Chevalier D, Mortuaire G, Kaltner H, Andre S, Toubeau G, Gabius HJ & Leroy X (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(4):483-493.
- Schneider G, Henrich A, Greiner G, Wolf V, Lovas A, Wieczorek M, Wagner T, Reichardt S, von Werder A, Schmid RM, Weih F, Heinzl T, Saur D & Kramer OH (2010) Cross talk between stimulated NF-kappaB and the tumor suppressor p53. *Oncogene* 29(19):2795-2806.
- Shackleton M, Vaillant F, Simpson KJ, Stingl J, Smyth GK, Asselin-Labat ML, Wu L, Lindeman GJ & Visvader JE (2006) Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* 439(7072):84-88.
- Shalom-Feuerstein R, Levy R, Makovski V, Raz A & Kloog Y (2008) Galectin-3 regulates RasGRP4-mediated activation of N-Ras and H-Ras. *Biochimica et biophysica acta* 1783(6):985-993.
- Sharer JD (2005) The adenine nucleotide translocase type 1 (ANT1): a new factor in mitochondrial disease. *IUBMB life* 57(9):607-614.
- Shaw P, Freeman J, Bovey R & Iggo R (1996) Regulation of specific DNA binding by p53: evidence for a role for O-glycosylation and charged residues at the carboxy-terminus. *Oncogene* 12(4):921-930.
- Shen Y, Chu Y, Yang Y & Wang Z (2012) Mitochondrial localization of P-glycoprotein in the human breast cancer cell line MCF-7/ADM and its functional characterization. *Oncology reports* 27(5):1535-1540.
- Shetty P, Bargale A, Patil BR, Mohan R, Dinesh US, Vishwanatha JK, Gai PB, Patil VS & Amsavardani TS (2015) Cell surface interaction of annexin A2 and galectin-3 modulates epidermal growth factor receptor signaling in Her-2 negative breast cancer cells. *Molecular and cellular biochemistry* 10.1007/s11010-015-2584-y.
- Shimizu Y, Kabir-Salmani M, Azadbakht M, Sugihara K, Sakai K & Iwashita M (2008) Expression and localization of galectin-9 in the human uterodome. *Endocrine journal* 55(5):879-887.
- Shimura T, Takenaka Y, Tsutsumi S, Hogan V, Kikuchi A & Raz A (2004) Galectin-3, a novel binding partner of beta-catenin. *Cancer research* 64(18):6363-6367.
- Shostak K & Chariot A (2011) NF-kappaB, stem cells and breast cancer: the links get stronger. *Breast cancer research : BCR* 13(4):214.
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A & McGuire WL (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235(4785):177-182.
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J & Norton L (2001) Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *The New England journal of medicine* 344(11):783-792.
- Slodkowska EA & Ross JS (2009) MammaPrint 70-gene signature: another milestone in personalized medical care for breast cancer patients. *Expert review of molecular diagnostics* 9(5):417-422.

- Société canadienne du cancer (2015a) *Qu'est-ce que le cancer du sein?*, <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/breast/breast-cancer/?region=qc>
- Société canadienne du cancer (2015b) *Statistiques sur le cancer du sein.*, <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/breast/statistics/?region=qc>
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lonning PE & Borresen-Dale AL (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(19):10869-10874.
- Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lonning PE, Brown PO, Borresen-Dale AL & Botstein D (2003) Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(14):8418-8423.
- St-Pierre Y, Campion CG & Grosset AA (2012) A distinctive role for galectin-7 in cancer ? *Front Biosci (Landmark Ed)* 17:438-450.
- Stillman BN, Hsu DK, Pang M, Brewer CF, Johnson P, Liu FT & Baum LG (2006) Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induce T cell death. *J Immunol* 176(2):778-789.
- Storci G, Sansone P, Trere D, Tavolari S, Taffurelli M, Ceccarelli C, Guarnieri T, Paterini P, Pariali M, Montanaro L, Santini D, Chieco P & Bonafe M (2008) The basal-like breast carcinoma phenotype is regulated by SLUG gene expression. *The Journal of pathology* 214(1):25-37.
- Streetly MJ, Maharaj L, Joel S, Schey SA, Gribben JG & Cotter FE (2010) GCS-100, a novel galectin-3 antagonist, modulates MCL-1, NOXA, and cell cycle to induce myeloma cell death. *Blood* 115(19):3939-3948.
- Sturm A, Lensch M, Andre S, Kaltner H, Wiedenmann B, Rosewicz S, Dignass AU & Gabius HJ (2004) Human galectin-2: novel inducer of T cell apoptosis with distinct profile of caspase activation. *J Immunol* 173(6):3825-3837.
- Takenaka Y, Fukumori T, Yoshii T, Oka N, Inohara H, Kim HR, Bresalier RS & Raz A (2004) Nuclear export of phosphorylated galectin-3 regulates its antiapoptotic activity in response to chemotherapeutic drugs. *Molecular and cellular biology* 24(10):4395-4406.
- Takeuchi T, Tamura M, Ishii N, Ishikida H, Sugimoto S, Suzuki D, Nishiyama K, Takahashi H, Natsugari H & Arata Y (2015) Purification of galectin-1 mutants using an immobilized Galactosebeta1-4Fucose affinity adsorbent. *Protein expression and purification* 111:82-86.
- Tao JJ, Castel P, Radosevic-Robin N, Elkabets M, Auricchio N, Aceto N, Weitsman G, Barber P, Vojnovic B, Ellis H, Morse N, Viola-Villegas NT, Bosch A, Juric D, Hazra S, Singh S, Kim P, Bergamaschi A, Maheswaran S, Ng T, Penault-Llorca F, Lewis JS, Carey LA, Perou CM, Baselga J & Scaltriti M (2014) Antagonism of EGFR and HER3 enhances the response to inhibitors of the PI3K-Akt pathway in triple-negative breast cancer. *Science signaling* 7(318):ra29.

- Teichberg VI, Silman I, Beitsch DD & Resheff G (1975) A beta-D-galactoside binding protein from electric organ tissue of *Electrophorus electricus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72(4):1383-1387.
- Than NG, Balogh A, Romero R, Karpati E, Erez O, Szilagy A, Kovalszky I, Sammar M, Gizurarson S, Matko J, Zavodszky P, Papp Z & Meiri H (2014) Placental Protein 13 (PP13) - A Placental Immunoregulatory Galectin Protecting Pregnancy. *Frontiers in immunology* 5:348.
- Than NG, Romero R, Goodman M, Weckle A, Xing J, Dong Z, Xu Y, Tarquini F, Szilagy A, Gal P, Hou Z, Tarca AL, Kim CJ, Kim JS, Haidarian S, Uddin M, Bohn H, Benirschke K, Santolaya-Forgas J, Grossman LI, Erez O, Hassan SS, Zavodszky P, Papp Z & Wildman DE (2009) A primate subfamily of galectins expressed at the maternal-fetal interface that promote immune cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(24):9731-9736.
- Thijssen VL & Griffioen AW (2014) Galectin-1 and -9 in angiogenesis: a sweet couple. *Glycobiology* 24(10):915-920.
- Thijssen VL, Postel R, Brandwijk RJ, Dings RP, Nesmelova I, Satijn S, Verhofstad N, Nakabeppu Y, Baum LG, Bakkers J, Mayo KH, Poirier F & Griffioen AW (2006) Galectin-1 is essential in tumor angiogenesis and is a target for antiangiogenesis therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(43):15975-15980.
- Tinari N, Kuwabara I, Huflejt ME, Shen PF, Iacobelli S & Liu FT (2001) Glycoprotein 90K/MAC-2BP interacts with galectin-1 and mediates galectin-1-induced cell aggregation. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 91(2):167-172.
- Todt F, Cakir Z, Reichenbach F, Emschermann F, Lauterwasser J, Kaiser A, Ichim G, Tait SW, Frank S, Langer HF & Edlich F (2015) Differential retrotranslocation of mitochondrial Bax and Bak. *The EMBO journal* 34(1):67-80.
- Traber PG, Chou H, Zomer E, Hong F, Klyosov A, Fiel MI & Friedman SL (2013a) Regression of fibrosis and reversal of cirrhosis in rats by galectin inhibitors in thioacetamide-induced liver disease. *PloS one* 8(10):e75361.
- Traber PG & Zomer E (2013b) Therapy of experimental NASH and fibrosis with galectin inhibitors. *PloS one* 8(12):e83481.
- Tribulatti MV, Figini MG, Carabelli J, Cattaneo V & Campetella O (2012) Redundant and antagonistic functions of galectin-1, -3, and -8 in the elicitation of T cell responses. *J Immunol* 188(7):2991-2999.
- Tripodi D, Quemener S, Renaudin K, Ferron C, Malard O, Guisle-Marsollier I, Sebille-Rivain V, Verger C, Geraut C & Gratas-Rabbia-Re C (2009) Gene expression profiling in sinonasal adenocarcinoma. *BMC medical genomics* 2:65.
- Tsai CJ, Sulman EP, Eifel PJ, Jhingran A, Allen PK, Deavers MT & Klopp AH (2013) Galectin-7 levels predict radiation response in squamous cell carcinoma of the cervix. *Gynecologic oncology* 131(3):645-649.
- Tsai CM, Guan CH, Hsieh HW, Hsu TL, Tu Z, Wu KJ, Lin CH & Lin KI (2011) Galectin-1 and galectin-8 have redundant roles in promoting plasma cell formation. *J Immunol* 187(4):1643-1652.

- Turbin DA, Cheang MC, Bajdik CD, Gelmon KA, Yorlida E, De Luca A, Nielsen TO, Huntsman DG & Gilks CB (2006) MDM2 protein expression is a negative prognostic marker in breast carcinoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 19(1):69-74.
- Turner BM, Skinner KA, Tang P, Jackson MC, Soukiazian N, Shayne M, Huston A, Ling M & Hicks DG (2015) Use of modified Magee equations and histologic criteria to predict the Oncotype DX recurrence score. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 10.1038/modpathol.2015.50.
- Turner NC & Reis-Filho JS (2013) Tackling the diversity of triple-negative breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19(23):6380-6388.
- Ueda S, Kuwabara I & Liu FT (2004) Suppression of tumor growth by galectin-7 gene transfer. *Cancer research* 64(16):5672-5676.
- Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson A, Kampf C, Sjostedt E, Asplund A, Olsson I, Edlund K, Lundberg E, Navani S, Szigartyo CA, Odeberg J, Djureinovic D, Takanen JO, Hober S, Alm T, Edqvist PH, Berling H, Tegel H, Mulder J, Rockberg J, Nilsson P, Schwenk JM, Hamsten M, von Feilitzen K, Forsberg M, Persson L, Johansson F, Zwahlen M, von Heijne G, Nielsen J & Ponten F (2015) Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 347(6220):1260419.
- Uhlen M, Oksvold P, Fagerberg L, Lundberg E, Jonasson K, Forsberg M, Zwahlen M, Kampf C, Wester K, Hober S, Wernerus H, Bjorling L & Ponten F (2010) Towards a knowledge-based Human Protein Atlas. *Nature biotechnology* 28(12):1248-1250.
- Ullman CG, Frigotto L & Cooley RN (2011) In vitro methods for peptide display and their applications. *Briefings in functional genomics* 10(3):125-134.
- Ursini-Siegel J, Schade B, Cardiff RD & Muller WJ (2007) Insights from transgenic mouse models of ERBB2-induced breast cancer. *Nature reviews. Cancer* 7(5):389-397.
- Vamesu S (2006) Angiogenesis and tumor grading in primary breast cancer patients: an analysis of 158 needle core biopsies. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie* 47(3):251-257.
- van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R & Friend SH (2002) Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415(6871):530-536.
- Vander Ghinst M, Rummelink M, Mansbach AL, Hassid S & Choufani G (2012) Galectin-1, -3, -7 expressions in congenital and acquired pediatric cholesteatomas compared to external auditory canal skin. *Clinical and experimental otorhinolaryngology* 5(2):62-67.
- Vasta GR (2009) Roles of galectins in infection. *Nature reviews. Microbiology* 7(6):424-438.
- Vasta GR, Ahmed H, Nita-Lazar M, Banerjee A, Pasek M, Shridhar S, Guha P & Fernandez-Robledo JA (2012) Galectins as self/non-self recognition receptors in innate and adaptive immunity: an unresolved paradox. *Frontiers in immunology* 3:199.
- Villeneuve C, Baricault L, Canelle L, Barboulet N, Racca C, Monsarrat B, Magnaldo T & Larminat F (2011) Mitochondrial proteomic approach reveals galectin-7 as a novel BCL-2 binding protein in human cells. *Molecular biology of the cell* 22(7):999-1013.

- Vinothkumar KR, Zhu J & Hirst J (2014) Architecture of mammalian respiratory complex I. *Nature* 515(7525):80-84.
- Visvader JE & Lindeman GJ (2011) The unmasking of novel unipotent stem cells in the mammary gland. *The EMBO journal* 30(24):4858-4859.
- Vladoiu MC, Labrie M, Letourneau M, Egesborg P, Gagne D, Billard E, Grosset AA, Doucet N, Chatenet D & St-Pierre Y (2015) Design of a peptidic inhibitor that targets the dimer interface of a prototypic galectin. *Oncotarget* 10.18632/oncotarget.5403.
- Vladoiu MC, Labrie M & St-Pierre Y (2014) Intracellular galectins in cancer cells: potential new targets for therapy (Review). *International journal of oncology* 44(4):1001-1014.
- Voss PG, Gray RM, Dickey SW, Wang W, Park JW, Kasai K, Hirabayashi J, Patterson RJ & Wang JL (2008) Dissociation of the carbohydrate-binding and splicing activities of galectin-1. *Archives of biochemistry and biophysics* 478(1):18-25.
- Vyakarnam A, Lenneman AJ, Lakkides KM, Patterson RJ & Wang JL (1998) A comparative nuclear localization study of galectin-1 with other splicing components. *Experimental cell research* 242(2):419-428.
- Wade M, Li YC & Wahl GM (2013) MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy. *Nature reviews. Cancer* 13(2):83-96.
- Wallace DC (2005) A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annual review of genetics* 39:359-407.
- Wang H, Zhou M, Shi B, Zhang Q, Jiang H, Sun Y, Liu J, Zhou K, Yao M, Gu J, Yang S, Mao Y & Li Z (2011) Identification of an exon 4-deletion variant of epidermal growth factor receptor with increased metastasis-promoting capacity. *Neoplasia* 13(5):461-471.
- Wang JL, Gray RM, Haudek KC & Patterson RJ (2004) Nucleocytoplasmic lectins. *Biochimica et biophysica acta* 1673(1-2):75-93.
- Wang LP, Chen SW, Zhuang SM, Li H & Song M (2013) Galectin-3 accelerates the progression of oral tongue squamous cell carcinoma via a Wnt/beta-catenin-dependent pathway. *Pathology oncology research : POR* 19(3):461-474.
- Wang Y, Nangia-Makker P, Tait L, Balan V, Hogan V, Pienta KJ & Raz A (2009) Regulation of prostate cancer progression by galectin-3. *The American journal of pathology* 174(4):1515-1523.
- Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G & Hayes DF (2013) Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 31(31):3997-4013.
- Yang RY, Hsu DK & Liu FT (1996) Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(13):6737-6742.
- Yang RY, Rabinovich GA & Liu FT (2008) Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert reviews in molecular medicine* 10:e17.

- Yang WH, Kim JE, Nam HW, Ju JW, Kim HS, Kim YS & Cho JW (2006) Modification of p53 with O-linked N-acetylglucosamine regulates p53 activity and stability. *Nature cell biology* 8(10):1074-1083.
- Yoshii T, Fukumori T, Honjo Y, Inohara H, Kim HR & Raz A (2002) Galectin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest. *The Journal of biological chemistry* 277(9):6852-6857.
- Yu F, Finley RL, Jr., Raz A & Kim HR (2002) Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation. *The Journal of biological chemistry* 277(18):15819-15827.
- Zhang H, Luo M, Liang X, Wang D, Gu X, Duan C, Gu H, Chen G, Zhao X, Zhao Z & Liu C (2014) Galectin-3 as a marker and potential therapeutic target in breast cancer. *PloS one* 9(9):e103482.
- Zhao CY, Szekely L, Bao W & Selivanova G (2010a) Rescue of p53 function by small-molecule RITA in cervical carcinoma by blocking E6-mediated degradation. *Cancer research* 70(8):3372-3381.
- Zhao Q, Barclay M, Hilken J, Guo X, Barrow H, Rhodes JM & Yu LG (2010b) Interaction between circulating galectin-3 and cancer-associated MUC1 enhances tumour cell homotypic aggregation and prevents anoikis. *Molecular cancer* 9:154.
- Zhu H, Wu TC, Chen WQ, Zhou LJ, Wu Y, Zeng L & Pei HP (2013) Roles of galectin-7 and S100A9 in cervical squamous carcinoma: Clinicopathological and in vitro evidence. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 132(5):1051-1059.
- Zhu X, Ding M, Yu ML, Feng MX, Tan LJ & Zhao FK (2010) Identification of galectin-7 as a potential biomarker for esophageal squamous cell carcinoma by proteomic analysis. *BMC cancer* 10:290.

ANNEXES

ANNEXE I

UN RÔLE DISTINCT POUR LA GALECTINE-7 DANS LE CANCER?

A distinctive role for galectin-7 in cancer ?

Yves St-Pierre¹, Carole G. Campion 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

Galectin-7 in cancer

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 "PIC's", for *p53-induced genes*) out of

Galectin-7 in cancer

Table 2. Stimuli that increase galectin-7 expression

Compound	Specificity	Model system	References
Dimethylallylglycine	2-oxoglutarate (2-OG) dependent dioxygenase inhibitor	Human mammary MCF-7 tumor cells	(89)
5 ^h -deoxyazacytidine	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/Bl6 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	Bitransgenic 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,

Galectin-7 in cancer

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-diamminedichloroplatinum (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 basal-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 in situ; 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)

Galectin-7 in cancer

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)

Galectin-7 in cancer

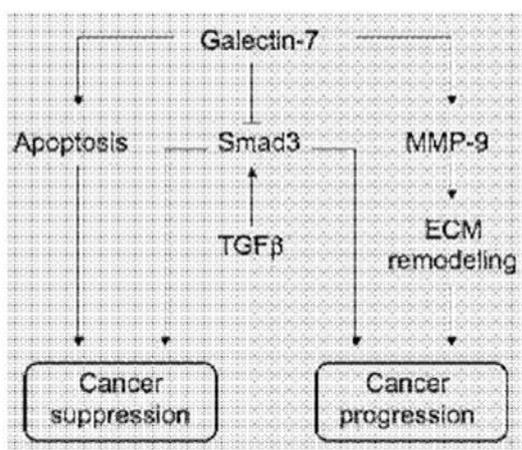


Figure 1. Dual roles of galectin-7 in suppressing and promoting tumor growth. In cancer, the effect of galectin-7 response is highly contextual. *De novo* expression of galectin-7 by p53 is associated with apoptosis, thereby inhibiting tumor growth. Alternatively, galectin-7 may modulate cancer progression 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. Lobanov 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, Karigsberg 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, Henrick 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)

Galectin-7 in cancer

9. Kubach J, Lutter P, Bopp T, Stoll S, Becker C, Huter E, et al: Human CD4+CD25+ regulatory T cells: proteome analysis identifies galectin-10 as a novel marker essential for their anergy and suppressive function. *Blood* 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, Vershuis 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 Cellinog* 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)

Galectin-7 in cancer

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, Glinoe 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, Lorfevre 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, Lorfevre 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)

Galectin-7 in cancer

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. Hittlet 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)

Galectin-7 in cancer

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-Mullerian Hormone Receptor Gene *Amhr2*. *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, Glenn L, Appelhoff RJ, Ratcliffe PJ, Ragoussis J, Gleade JM: Concordant regulation of gene expression by hypoxia and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase inhibition: the role of HIF-1 α , HIF-2 α , and other pathways. *J Biol Chem* 281, 15215-26 (2006)
90. Koster MI, Kim S, Huang J, Williams T, Roop DR: TAp63 α induces AP-2 γ as an early event in epidermal morphogenesis. *Dev Biol* 289, 253-61 (2006)
91. Lucerna M, Pomyje J, Mechteheriakova 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)

Galectin-7 in cancer

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, Kaek 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, Subramanyam 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, Eddafali 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, Swethadri 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, André 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, Devereux 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, Orntoft 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>

ANNEXE II

LA SUREXPRESSION DE LA GALECTINE-7, UN MARQUEUR DE CELLULES MYOÉPITHÉLIALES, AUGMENTE LES MÉTASTASES SPONTANÉES DES CELLULES DU CANCER DU SEIN

Tumorigenesis and Neoplastic Progression

Overexpression of Galectin-7, A Myoepithelial Cell Marker, Enhances Spontaneous Metastasis of Breast Cancer Cells

Mélanie Demers,* April A.N. Rose,[†]
Andrée-Anne Grosset,[‡] Katherine Biron-Pain,*
Louis Gaboury,[‡] Peter M. Siegel,[†]
and Yves St-Pierre*

From the Institut national de la recherche scientifique-Institut Armand-Frappier,* Laval, Québec; the Goodman Cancer Centre,[†] McGill University, Montreal, Québec; and the Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie,[‡] Montreal, Québec, Canada

Galectins are members of a family of β -galactoside-binding proteins that have recently emerged as novel modulators in different aspects of cancer. The expression of galectins in tumors and/or the tissue surrounding them has been well documented. Since galectin-7 expression has been associated with epithelial tissues and varies significantly in various types of cancer, we have investigated for the first time its role in breast cancer. Using two preclinical mouse models, high levels of galectin-7 expression in breast cancer cells drastically increased their ability to metastasize to lungs and bones. Significant increases in the number of pulmonary metastases and osteolytic lesions were induced by overexpression of galectin-7 compared with control cells. In human tissues, galectin-7 was specifically found in myoepithelial cells of normal human breast tissue, but not in luminal cells. Its expression was severely altered in breast carcinoma, many samples showing greater than 70% of galectin-7 positive cells. High expression levels of galectin-7 were restricted to high-grade breast carcinomas, including HER2 overexpressing and basal-like groups. In HER2 overexpressing cases, galectin-7 expression was associated with lymph node axillary metastasis. Taken together, our results indicate that galectin-7 may represent a potential target for both specific detection and therapeutic inhibition of metastatic breast cancer. (*Am J Pathol* 2010, 176:3023–3031; DOI: 10.2353/ajpath.2010.090876)

Members of the galectin family share a unique carbohydrate recognition domain that confers specificity for β -galactoside derivatives. Based on structural features, the 15 mammalian galectins known to date have been classified as proto, chimera, or tandem repeat types. Numbered according to the order of their discovery, galectins 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14, and 15 are of the prototype; galectins 4, 6, 8, 9, and 12 are of the tandem repeat type; and galectin 3 is the only galectin of the chimera type.¹ Most galectins are nonglycosylated soluble proteins that can be found both intracellularly (cytoplasm and/or nucleus) and extracellularly depending on the cell type, cell cycle stage, and differentiation state. Accordingly, galectins have been implicated in a wide range of cellular functions, including embryonic development, wound healing, apoptosis, intercellular adhesion, cell migration, immune response, and cancer.²

Galectin-7 was initially described as a marker that reflected the differentiation status of keratinocytes.^{3,4} Functionally, its intracellular form has been associated with UVB-induced apoptosis in epidermis since sunburn/apoptotic keratinocytes express abnormally high levels of galectin-7.⁵ Early studies suggested that galectin-7 might function as an apoptosis regulator when it was identified as 1 of 14 transcripts induced in colorectal cancer cells undergoing p53-dependent apoptosis.⁶ Additional studies have since confirmed that galectin-7

Supported by grants to Y.S.P. from the Canadian Institute for Health Research (grant number MOP-89697) and P.M.S. from the Canadian Breast Cancer Research Alliance (grant number MOP-84386). M.D., K.B.P., and A.A.N.R. were supported by studentships from the Fond de la Recherche en Santé du Québec. P.M.S. is a research scientist of the Canadian Cancer Society.

Accepted for publication February 18, 2010.

CME Disclosure: None of the authors disclosed any relevant financial relationships.

Supplemental material for this article can be found on <http://ajp.amjpathol.org>.

Current address for M.D.: Immune Disease Institute, Harvard Medical School, Boston, MA.

Address reprint requests to Yves St-Pierre, Ph.D., INRS-Institut Armand-Frappier, 531 Blvd Des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7. E-mail: yves.st-pierre@af.inrs.ca.

can render tumor cells more susceptible to apoptotic stimuli^{7,8}; although others have also shown that extracellular binding of galectin-7 to cell surface receptors can trigger signals that reduce neuroblastoma cell growth without the appearance of features characteristic of classical apoptosis.⁹

Given its pro-apoptotic role, galectin-7 might be expected to aid in the elimination of tumor cells. However, in sharp contrast to such negative roles played by galectin-7 in tumor development, Lu et al¹⁰ have previously found that galectin-7 is overexpressed in chemically-induced mammary carcinomas. They reported that *galectin-7* expression was restricted to mammary carcinomas and was not detected in any other normal tissues examined in the adult rat, providing the first indication that galectin-7 could be associated with tumor progression. Rorive et al¹¹ later observed that galectin-7 expression was markedly higher in different forms of papillary carcinomas than in benign thyroid tumors. Recent work in lymphoma further supported the idea that galectin-7 may promote tumorigenesis. Mice injected with lymphoma cells ectopically expressing galectin-7 constitutively developed large metastatic tumors in the liver and kidneys with massive infiltration of tumor cells in the parenchyma.¹² In contrast, only a few scattered foci of tumor cells with limited infiltration were observed in mice injected with control lymphoma cells. Suppression of galectin-7-expression by using specific antisense approaches significantly delayed metastasis of lymphoma cells.¹³ Taken together, these results have uncovered a novel functional role for galectin-7: its ability to promote tumor progression.

To investigate the role of galectin-7 in breast cancer, we have examined its expression in normal and malignant human breast tissues to determine whether galectin-7 was associated with any particular subtype, or biological or clinical feature. Together, our data indicate that galectin-7 is expressed in aggressive phenotype of breast carcinomas and is a critical determinant in spontaneous metastasis of lung and bone-homing breast tumor cells. This suggests that galectin-7 is not only a potentially novel therapeutic target in the treatment of breast cancer metastasis, but may also prove to be a valuable marker to monitor disease progression.

Materials and Methods

Cell Lines and Reagents

Immortalized human keratinocytes (HaCaT) were a kind gift of Dr. Thierry Magnaldo (Génétique et physiopathologie des cancers épidermiques, FRE3086 IGMRC CNRS, Faculté de Médecine, Université de Nice). MCF-7 and MDA-MB-231 cells lines were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium complete medium (supplemented with 8% [v/v] fetal calf serum, 2 mmol/L L-glutamine, 10 mmol/L HEPES buffer, and for 1 mmol/L Sodium Pyruvate for MCF-7). The 4T1 and 66c14 cell lines 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). All cell culture products were purchased from Life Technologies (Burlington, ON, Canada). All other reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO), unless otherwise indicated.

Generation of Stable Transfectants Expressing Galectin-7

To obtain stable 4T1 and 66c14 breast carcinoma transfectants expressing galectin-7, the cDNA encoding the murine *galectin-7*¹² was cloned in Sr α eukaryotic expression vector (kindly provided by Dr. François Denis) by using SpeI and NotI restriction enzymes. Controls were generated by using 4T1 and 66c14 breast carcinoma cells transfected with the empty Sr α vector. Transfection was performed by using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions (Invitrogen Canada, Inc., Burlington, ON). After 48 hours of culture, transfected cells were allowed to grow in complete medium containing 8 μ g/ml of puromycin. Individual colonies were expanded, PCR analysis was performed on genomic DNA for assessing vector insertion, and galectin-7 expression was monitored by Western blot analysis.

Western Blot Analysis

Cells were homogenized and resuspended in lysis buffer (10 mmol/L Tris, pH 7.5, 2.5% Triton X-100) containing protease inhibitors (Roche, Laval, QC, Canada). Equal amounts of whole-cell (50 μ g) extracts were separated on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis gel and transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada). The membranes were first blocked with 10% milk in PBS/0.5% Tween 20 overnight and subsequently blotted for 2 hours with a goat anti-mouse galectin-7 polyclonal antibody (1:1000; R&D Systems Minneapolis, MN), a rabbit anti-Poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP)-1 (p25) polyclonal antibody (1:1000; Epitomics, Burlingame, CA), or mouse anti- β -actin antibodies. Secondary antibodies consisted of horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit or anti-mouse IgG (Sigma). Detection was performed by the enhanced chemiluminescence method (Amersham Baile d'Urfé, QC, Canada).

RNA Isolation and RT-PCR

Total RNA was isolated by using Trizol reagent according to the manufacturer's protocol (Invitrogen). Briefly, total RNA (2 μ g) was reverse transcribed by using the OmniScript reverse transcriptase (Qiagen, Mississauga, ON, Canada), and PCR was amplified by using the following conditions: 94°C for 1 minute, 62°C for 1 minute, and 72°C for 1 minute followed by a final extension step at 72°C for 10 minutes. The primers used for PCR amplification were the following: human *mmp-9*, 5'-CAACATCACCTATTGGATCC-3' (sense) and 5'-CGGGTGTAGAGTCTCTCGCT-3' (antisense); for β -actin 5'-CATGGATGACGATATCGCTGCGC-3' (sense) and

(5'-GCTGTCGCCACGCTCGGTCAGGAT-3' (antisense); human *galectin-7*, 5'-ACCAACCCGGTCCCAG-3' (sense) and 5'-GCGGGCTAACGCTTTATTTGC-3' (antisense); mouse *galectin-7*, 5'-CCATGTCTGCTACCCATCAC-3' (sense) and 5'-GCTTAGAAGATATTCATGAATGC-3' (antisense); and *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, 5'-CGGAGTCAACGGATTGGTCGTAT-3' (sense) and 5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3' (antisense). Thirty or 35 cycles of amplification were performed in a thermal cycler (model PTC-100 TM, MJ Research, Watertown, MA). Each assay was repeated three times to verify the accuracy of the results. Thirty or 35 cycles of amp-PCR assays using equal amounts of RNAs that were reverse-transcribed and amplified by PCR for 25 to 40 cycles with gene-specific primers confirmed that the amplification was in the linear range for each gene. As an internal control, amplification of β -actin or *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* mRNA was performed by RT-PCR using specific primers. Amplified products were analyzed by electrophoresis on 1% agarose gels by using ethidium bromide staining and UV illumination. Loading was equalized to the internal control mRNA.

Metastasis Assays

Female BALB/c mice (4 to 8 weeks old) were purchased from Charles River Laboratories (St-Constant, QC, Canada). The mice were housed in facilities managed by the Institut national de la recherche scientifique (INRS) Experimental Biology Center or the McGill University Animal Resources Centre (Montreal, QC, Canada). All animal experiments were conducted under an INRS- or McGill University-approved Animal Use Protocol in accordance with guidelines established by the Canadian Council on Animal Care. For experimental metastasis assays using the 66c14 model, 10^5 vector control or Galectin-7 expressing 66c14 cells were resuspended in 100 μ l PBS and injected into the left cardiac ventricle of 4- to 5-week-old BALB/c mice as previously described.¹⁴ A total of nine mice were injected with vector control, and 13 animals were injected with galectin-7 expressing 66c14 breast cancer cells. All mice were sacrificed when the first mouse appeared cachectic at 13 days postinjection. For the 4T1 model, the procedure was performed as described¹⁵ with minor modifications. Briefly, female BALB/c mice, aged 6 to 8 weeks, were injected with vector control or stable transfectants expressing galectin-7 tumor into the mammary fat pad. The size of the primary tumors was monitored twice a week, and the number of metastatic nodules on the lung was evaluated by histological examination at necropsy.

Quantification of Osteolytic Lesions

Immediately before sacrifice, mice were anesthetized, and digital X-rays were obtained with a Faxitron Specimen Radiography System (model MX-20 digital, Faxitron X-Ray LLC, Toronto, ON, Canada). At the termination of these experiments, all digital X-rays were blinded and scored by two independent researchers. Each X-ray was

examined for the presence of osteolytic lesions in the following six sites: proximal humerus, distal femur, and proximal tibia (left and right side). The number of mice possessing at least one osteolytic lesion was divided by the total number of animals in each cohort to determine the percentage of mice developing bone metastases. At the time of necropsy, hind limbs from three and four mice injected with vector control or galectin-7 stable transfectants, respectively, were removed and fixed in 4% paraformaldehyde. Fixed tissues were paraffin embedded, sectioned, stained with H&E. Routine histology services were provided by the Centre for Bone and Periodontal Research (McGill University) histology platform. For each cohort, 12 H&E stained bone (femur or tibia) sections were scanned with an Aperio slide scanner (Aperio Technologies, Inc., Vista, CA) at 20 \times magnification. Total bone area and metastatic lesion area were quantified by using Aperio ImageScope software (version 9.1.19). The

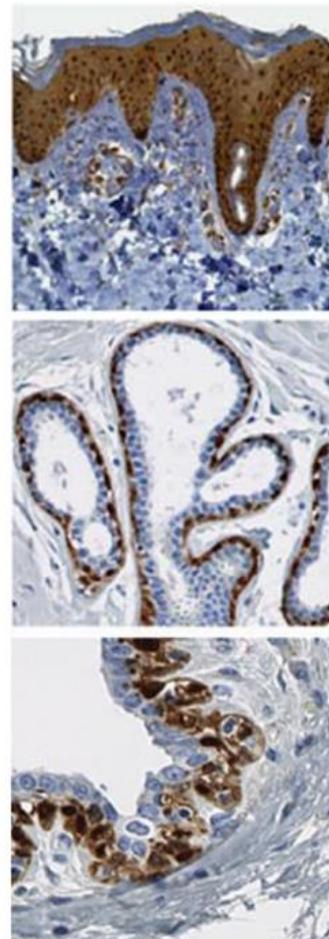


Figure 1. Galectin-7 expression in normal mammary myoepithelial cells. Immunohistological analysis of human normal tissues showing expression of galectin-7 in the stratified epithelium of the skin (upper panel) and in mammary tissues showing specific expression in myoepithelial cells (central and lower panels). Note the presence of intense galectin-7 protein immunoreactivity in the mammary myoepithelial cells and its absence in the lumens of normal ducts and adjacent stroma. Strong galectin-7 cytoplasmic and nuclear protein staining was found in myoepithelial cells.

metastatic lesion area was expressed as a percentage of the total tissue area.

Immunohistochemistry

Paraffin-embedded sections were deparaffinized in xylenes and rehydrated through a graded alcohol series. Antigen retrieval was performed for 10 minutes in 1 mmol/L EDTA (pH 8.0), preheated to 95°C to 100°C in a steamer. Tissue sections were blocked in 1% bovine serum albumin and 5% N-hydroxysuccinimide in 1× PBS and incubated overnight at 4°C with a mouse anti-human galectin-7 monoclonal antibody (R&D Systems). This antibody shows an identical pattern of expression with previously raised rabbit anti-human galectin-7 polyclonal antibody generated by Magnaldo and colleagues^{4,12} when tested against various tissue sections, including human mammary tissues. For instance, although both antibodies react against the skin epithelium and the mammary myoepithelial cells, they do not react against skeletal muscle

and the thyroid gland. The specificity of the antibody for galectin-7 has also been validated by the manufacturer, which reports less than 0.5% cross-reactivity with human gal-1, gal-3, gal-4, and gal-8. For double staining of tissue sections, reactions for galectin-7 and GATA-3 were performed by using the Discovery XT automated immunostainer (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) on

Table 1. Histoclinical Correlations of Breast Cancers According to Galectin-7 Expression

Characteristics	Galectin-7-positive cases	P
Age, yr		
<45	7/29	NS
≥45	24/147	
Pathological type		
Ductal	29/158	NS
Medullar	1/11	
Molecular subtype		
Basal-like	20/41	<0.0001
HER-2	6/25	
Luminal A	0/34	
Luminal B	0/6	
Elston-Ellis-modified Scarff-Bloom-Richardson grade		
I (low)	0/34	<0.0001
II	0/13	
III (high)	31/131	
Lymph node metastasis		
Negative	17/107	NS
Positive	12/66	
ER status		
Negative	31/90	<0.0001
Positive	0/69	
PR status		
Negative	30/113	<0.0001
Positive	0/40	
HER-2 status		
Negative	24/124	NS
Positive	6/31	
ER/PR/HER-2 status		
Triple negative	22/51	<0.0001
Other	7/99	
CK5/6 status		
Negative	9/110	<0.0001
Positive	20/46	
CK14 status		
Negative	19/126	0.0022
Positive	11/25	
Ki-67 status		
Negative	7/81	0.0009
Positive	23/76	
Epidermal growth factor receptor status		
Negative	5/98	<0.0001
Positive	23/54	
GATA-3 status		
Negative	31/89	<0.0001
Positive	0/68	
MMP-3 status		
Negative	3/25	NS
Positive	25/86	
CD276 status		
Negative	6/72	0.0047
Positive	20/76	

To assess differences in clinicopathologic features between the two groups of patients, Fisher's exact test was used for qualitative variables with discrete categories.

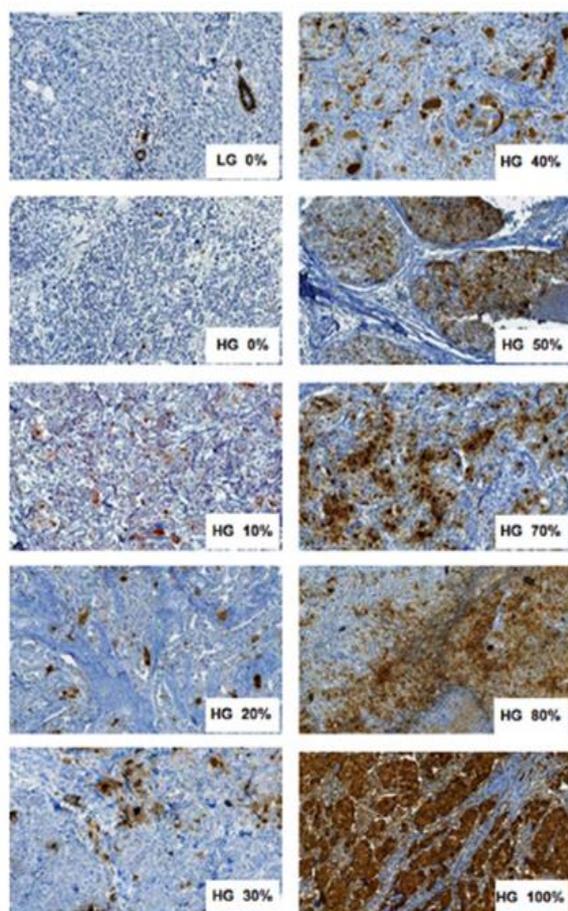


Figure 2. Galectin-7 expression in human breast carcinomas. Scoring of tissue microarrays constructed from human breast carcinomas specimens were stained (3,3'-diaminobenzidine, brown) with anti-galectin-7 antibody. Specimens were scored for percentages of galectin-7-positive cells by IHC of paraffin-embedded tissue in low grade (LG) and high grade (HG) carcinoma. The absence of a signal was scored as '0.'

deparaffinized sections incubated in EDTA buffer (pH 8) for antigen retrieval. The anti-human galectin-7 antibody and an anti-GATA-3 HG3-31 monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) were used at 1:50 and 1:250 dilutions, respectively, for 60 minutes. To reveal the reaction, DABmap (brown) and REDmap (red) kits were used (Ventana Medical Systems), and the slides were counterstained with hematoxylin. Each section was scanned at a high resolution (Nanozoomer, Hamamatsu Photonics K.K.).

Patients and Tumor Materials

A cohort of 213 patients diagnosed with primary breast cancer between 2003 and 2008 at the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal was used for the study. Tumors were selected on the basis of the histological diagnosis according to the classification of Nottingham modified by Elston and Ellis.¹⁶ The cohort consisted of both low-grade and high-grade ductal carcinomas and of medullary carcinomas (typical and atypical). Estrogen receptor (ER) α status was positive in all low-grade carcinomas. The study was approved by the research ethics committee of the research center at the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal.

Tissue Microarrays and Immunohistochemistry

Formalin-fixed paraffin-embedded material from each primary tumor sample was used to construct tissue microarrays with an automated arrayer design to construct high-density tissue microarray blocks (ATA-27 Beecher Instruments, Sun Prairie, WI). To that end, triplicate 1 mm cores from each tumor and control tissues were punched out and arrayed into six recipient blocks. For immunohistochemical analysis, 3- μ m thick sections were prepared from each tissue microarray. Immunostaining reactions for galectin-7 were performed by using the Discovery XT automated immunostainer (Ventana Medical Systems). Deparaffinized sections were incubated in cell conditioning 1 (pH 8.0) for antigen retrieval and then stained for 60 minutes with the anti-human galectin-7 monoclonal antibody using a 1:150 dilution. The slides were counterstained with hematoxylin and bicarbonate. Each section

was scanned at a high resolution by using the Nanozoomer Digital Pathology (Hamamatsu, Bridgewater, NJ).

Results

Galectin-7 Expression in Human Breast Tissues

To date, there have been no published descriptions of galectin-7 protein expression and localization in normal breast tissue and breast cancer. Specimens from normal regions of human mammary glands were stained by immunohistochemistry (IHC) with anti-galectin-7 antibody. Initial staining with control skin sections showed extensive staining of stratified epithelium, consistent with previous studies reporting that galectin-7 is considered a marker of stratified epithelia.^{3,4} IHC staining of normal breast tissues showed that cytoplasm and nuclei of human myoepithelial cells but not luminal epithelial cells were positive for galectin-7 (Figure 1). The expression of galectin-7 was representative of pre- and postmenopausal individuals (aged between 44 and 49 years old). Additional IHC studies in samples from younger individuals showed a similar pattern of expression (Supplemental Figure S1, see <http://ajp.amjpathol.org>).

To examine the expression of galectin-7 in human mammary tumors, paraffin-embedded tissue sections were selected from patients with breast cancer to construct tissue microarrays and immunostained with an anti-human galectin-7 monoclonal antibody. We found that galectin-7 expression was severely altered in breast carcinoma tissues (Figure 2). The range of percentage positive cells varied greatly among samples. Elevated expression of galectin-7 was restricted to high-grade breast carcinomas ($P < 0.001$; Table 1). None of the low-grade carcinoma samples expressed galectin-7. Galectin-7-positive cases were mostly associated with a basal-like phenotype ($P < 0.0001$). On all galectin-7-positive cases found, all were ER and progesterone-receptor-negative. Six cases were HER2 positive. This association with basal-like tumors was further demonstrated by positive correlations between galectin-7 and "basal" keratins, such as CK-5/6 ($P < 0.0001$). All cases were negative for GATA-3 ($P < 0.0001$), a defining marker of the luminal subtype.¹⁷ Interestingly, all HER2/galectin-7-

Table 2. Histoclinical Correlations of Her2-Positive Breast Cancer According to Galectin-7 Expression

Characteristics	HER-2 ⁻ /gal-7 ⁺ (n = 24)	P	HER-2 ⁺ /gal-7 ⁺ (n = 6)	P
Age, yr				
<45	6/29	NS	1/29	NS
≥45	18/146		5/146	
LN metastasis				
Negative	17/107	NS	0/107	0.0066
Positive	6/65		5/65	
GATA-3 status				
Negative	24/88	<0.0001	6/88	0.0359
Positive	0/68		0/68	
Epidermal growth factor receptor status				
Negative	3/98	<0.0001	2/98	0.0359
Positive	19/54		4/54	

The LN status for two patients was not available.

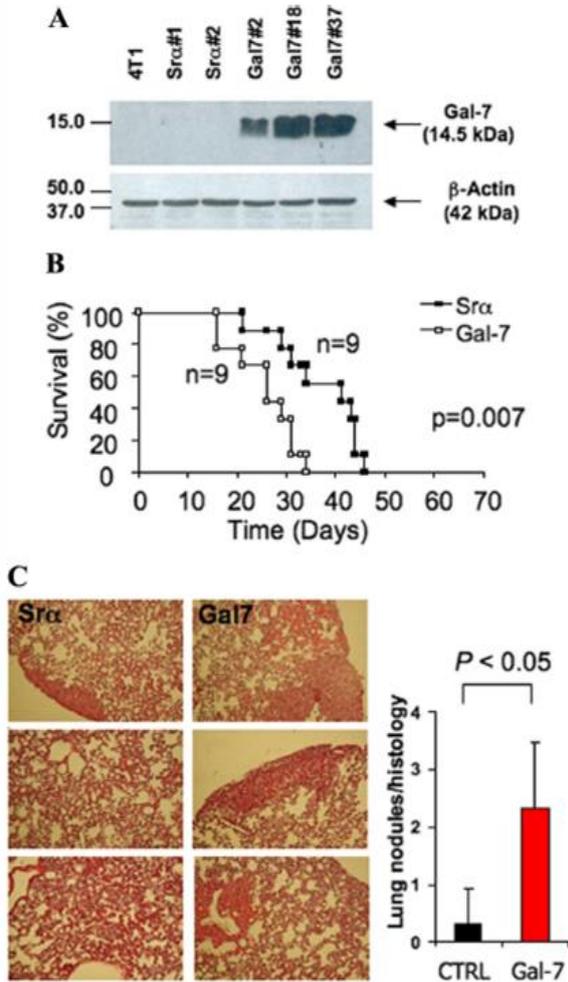


Figure 3. Effect of galectin-7 expression on lung metastasis induced by 4T1 cells. **A**, 4T1 cells were transfected with the *Sra*/puro expression vector containing the murine *galectin-7* cDNA and stable transfectants (Gal7#2, Gal7#18, and Gal7#37) constitutively expressing galectin-7 were obtained. The levels of endogenous and overexpressed galectin-7 protein were determined by Western blotting. β -actin was used as a loading control. The expression of galectin-7 in transfectants was not decreased on long-term *in vitro* culture of the clones but was nevertheless always assessed by Western blot analysis before their *in vivo* testing. Control transfectants (*Sra*) included 4T1 cells transfected with the *Sra*/puro expression vector without cDNA insert. **B**, Survival analysis of syngeneic BALB/c mice injected into the mammary fat pad with transfectants (open box) or controls (filled box). **C**, At necropsy, lungs were harvested and fixed in 10% formalin for histological examination to study the effect of galectin-7 on 4T1 tumor cells that spontaneously metastasize into the lung.

positive were also positive for lymph node metastasis ($P = 0.0066$; Table 2), supporting the hypothesis that galectin-7 may have a role in metastatic breast cancer.

Galectin-7 Overexpression Increases Lung and Bone Metastasis

To examine the role of galectin-7 in breast cancer metastasis, the 4T1 and the 66c14 breast cancer models were used. The 4T1 line metastasizes to the lungs after inoculation into the mammary gland while 66c14 cells



Figure 4. Galectin-7 expression promotes bone metastasis of 66c14 breast cancer cells after cardiac injection. **A**, 66c14 breast carcinoma cells were transfected with the *Sra*/puro expression vector containing the murine galectin-7 cDNA, and stable transfectants constitutively expressing galectin-7 were obtained and tested for galectin-7 by Western blot analyses. Control transfectants (*Sra*) also included 66c14 cells transfected with the *Sra*/puro expression vector without cDNA insert. **B**, X-ray images of tibiae derived from BALB/c mice injected into the left cardiac ventricle with either 66c14 control cells containing an empty vector (left panel, 66c14/vector control) or two independent clones expressing Galectin-7 (right panel, 66c14/Galectin-7). Arrows indicate regions of bone destruction.

spontaneously metastasize to the lung, but not to bone when injected into the arterial system via the left ventricle.¹⁸ All these lines were derived from the same spontaneous mammary carcinoma in a BALB/c/C3H mouse.¹⁹ A series of stable transfectants overexpressing galectin-7 was first generated in 4T1 cells along with control transfectants derived from 4T1 cells transfected with an empty vector (Figure 3A). The cells were then assessed for their ability to spontaneously metastasize after injection in the mammary fat pad in syngeneic BALB/c mice. No significant difference in the growth rate or the final tumor

Table 3. Quantification of Bone Metastases after Cardiac Injection of 66c14 Cells

Construct	Mice* with bone metastases (x-ray), %	Bones with metastases (H&E), %	Lesion area/tissue† (H&E), %
pSR α /Empty	0.0	50.0	12.1
pSR α /Gal-7	53.8	100.0	48.5
<i>P</i>	0.01 [§]	0.01 [§]	<0.0001 [¶]

*pSR α /Empty ($n = 9$); pSR α /Gal-7 ($n = 13$).
[†]Multiple bone samples were taken from individual mice; pSR α /empty ($n = 3$ mice; $n = 12$ bones); pSR α /Gal-7 ($n = 4$ mice; $n = 12$ bones).
[‡]Includes only those bones with metastatic lesions.
[§]Fisher's exact test (two tails).
[¶]t-test for independent samples (two tails).

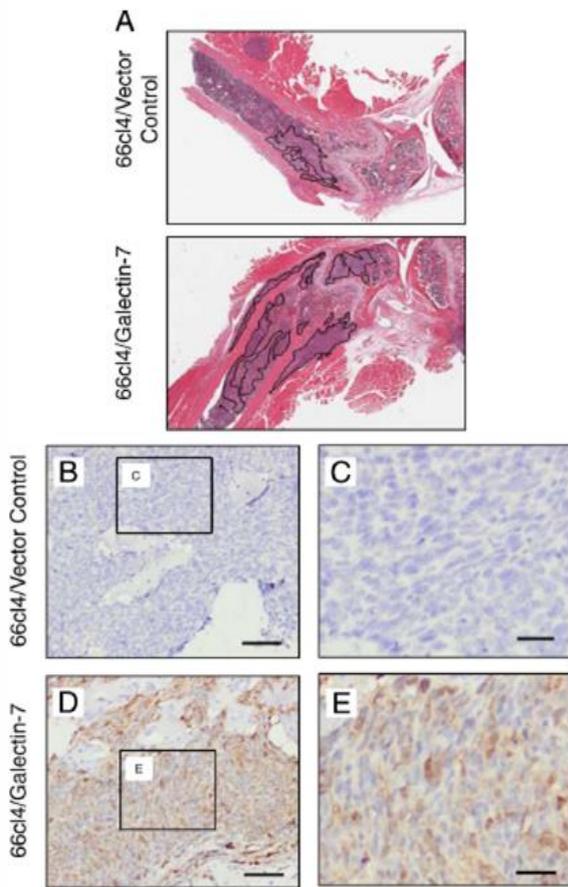


Figure 5. Immunohistological analyses of bone metastases induced by 66c14 transfectants. **A:** H&E stained images revealing the proximal tibia of an animal injected with 66c14Srα cells harboring an empty vector (**upper panel**, 66c14/vector control) or 66c14Gal7 expressing galectin-7 (**lower panel**, 66c14/Galectin-7). **Outlined regions** indicate areas of 66c14-derived lesions growing in the bone. **B–E:** Immunohistochemical staining for Galectin-7 in lesions resulting from 66c14/vector control cells (**B** and **C**) and 66c14/Galectin-7 (**D** and **E**) breast cancer cells. The **open boxes** found in **C** and **D** indicate regions that are shown at higher magnification in panels **B** and **D**. Scales bars = 75 μmol/L (**B** and **D**); 25 μmol/L (**C** and **E**).

weight at the completion of the experiment was found between control transfectants or those expressing galectin-7 (data not shown). Similarly, there was no difference between the proliferation rates of Srα control cells and

4T1 cells expressing galectin-7 cells *in vitro*, although galectin-7 expression was stable in transfectants for the duration of the experiments (data not shown), suggesting that galectin-7 did not alter tumor growth at the primary site. We found, however, that galectin-7 accelerated the development of metastases to lung, as the mean survival time of the mice injected with galectin-7 transfectants was significantly shorter than that of mice injected with controls (25.7 ± 6.5 days vs. 37 ± 8.5 days, respectively; $P = 0.007$; Figure 3B). Detailed histopathological analysis showed that 4T1 cells expressing galectin-7 developed significantly more metastatic foci in the lungs (Figure 3C). In contrast only few scattered foci of tumor cells were observed in mice injected with control cells.

Because osteolytic lesions contribute to breast cancer associated morbidity,²⁰ the relationship between galectin-7 expression and bone metastasis was studied by using the 66c14 variant. A series of transfectants expressing high levels of galectin-7 (66c14Gal7) and control cells (66c14Srα) were thus generated as in the case of 4T1 cells after transfection and selection by puromycin resistance and tested by Western blot analysis (Figure 4A). We had indeed found that aggressive variants of 66c14 breast cancer cells isolated from the bone marrow overexpressed galectin-7 as compared with poorly metastatic cells and their parental cells (Supplemental Figure S2, see <http://ajp.amjpathol.org>).^{7,15} As in the case of 4T1 cells, no significant difference in the growth rate or the final tumor weight at the completion of the experiment was found between control transfectants or those expressing galectin-7 (data not shown), confirming that galectin-7 did not alter tumor growth at the primary site. Examination of macroscopic lesions in mice injected with 66c14Srα showed that galectin-7 expression in 66c14 significantly enhanced their capacity to metastasize to the bone ($P < 0.01$; Figure 4B and Table 3). Histological examination of sections of tibia and femoral bones of mice showed a significant increase in the frequency of bone lesions induced by 66c14Gal7 cells as compared with control 66c14Srα cells (Table 3). Moreover, the osteolytic lesions were significantly ($P < 0.001$) larger with 66c14Gal7 cells than those induced by 66c14Srα cells, further emphasizing the protumorigenic potential of galectin-7 (Figure 5A and Table 3). IHC staining confirmed the expression of galectin-7 in metastatic lesions derived from 66c14Gal7 stable transfectants and a lack thereof in control cells (Figure 5, B–E).

The dissemination of breast cancer cells at distant sites is dictated by the emergence of tumor cells with increased invasive behavior associated with increased expression of members of the matrix metalloproteinase family, such as *mmp-9*. Because our previous studies in lymphomas had shown that galectin-7 increased the expression of *mmp-9*, we have examined the level of *mmp-9* in nonaggressive parental cells and its aggressive variants overexpressing galectin-7. We found, however, that both the 4T1 parental cells and the 4T1 transfectants expressed similar levels of *mmp-9* (Figure 6, A and B). Similar results were obtained with 66c14 (data not shown). Because other members of the galectin family increase the metastatic behavior by conferring protection

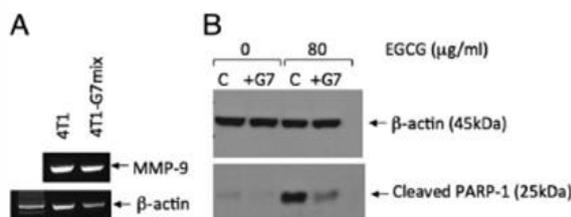


Figure 6. Expression of MMP-9 and PARP-1 cleavage in 4T1 cells expressing galectin-7. **A:** Expression of *mmp-9* in 4T1 control cells (transfected with the control vector) and from cells (a mix of three transfectants expressing galectin-7 [G7]). **B:** Western blot analysis of PARP-1 cleavage in control 4T1 cells or 4T1 cells transfected with G7 after overnight exposure to 80 mg/ml of (-)-epigallocatechin gallate. β -actin was used as a loading control. C, control 4T1 cells.

from apoptosis,^{21,22} we have thus examined whether galectin-7 can protect from apoptosis. Our result showed that galectin-7 protects 4T1 cells from apoptosis induced after exposure of (-)-epigallocatechin galatte, a pharmacological agent known to induce apoptosis in 4T1 cells.²³

Discussion

Galectin-7 is primarily found in stratified epithelia, especially in epidermis. It was identified as a stratified epithelial marker following searches for epidermal genes responsive to retinoic acid and for genes that were down-regulated in actively dividing keratinocytes. Its expression in human breast cancer tissues and its possible role in breast cancer metastasis have never been investigated to date. In the present work, we provide evidence that it plays a pivotal role in controlling the metastatic behavior of breast cancer cells while its expression is associated with aggressive subtypes of breast carcinomas.

Using anti-galectin-7 specific monoclonal antibody on tissue microarrays constructed from samples obtained from normal breast tissues and breast carcinomas, we found that galectin-7 is specifically expressed at the protein level in mammary myoepithelial cells in tissues of normal individuals. These results are consistent with microarray studies from normal breast luminal and myoepithelial cells identifying *galectin-7* as the first gene on the list among the 42 most predictive genes that distinguish luminal epithelial cells from myoepithelial cells.^{24,25} Galectin-7 expression is thus very distinct from that of galectin-3, a member of the galectin family associated in breast cancer expressed in normal luminal epithelial but not myoepithelial cells.²⁴ Moreover, in contrast to galectin-7, acquisition of an invasive phenotype via galectin-3 is associated with a decreased expression of this galactoside-binding lectin rather than an increased expression as we observed in the case of galectin-7.²⁶

Apart from the results of Lu et al,¹⁰ who showed that galectin-7 was expressed in rat mammary tissues after chemically-induced mammary tumorigenesis, the first indication that galectin-7 might be expressed in human breast cancer was reported in the genomic profiling data from Perou et al,²⁷ who provided a molecular portrait of 65 surgical specimens obtained from 42 individuals. Their microarray data revealed that although galectin-7 transcripts were expressed at very low levels in normal breast tissues, they were highly expressed in cell lines with a basal-like phenotype. Here, we extended these results by showing that galectin-7 was expressed at the protein level and was highly expressed in basal-like breast cancer cells with an ER/PR negative status and expressing basal keratins 5/6 and epidermal growth factor receptor. The association between galectin-7 and progression of breast cancer is further supported by the correlation between galectin-7 and high tumor grade and the fact that all HER-2-positive tumors are also positive for lymph node metastasis. This increase of galectin-7 expression in mammary epithelial cells is most likely modulated at the transcriptional level and

possibly involve epigenetic mechanisms, such as DNA methylation^{28,29} (Supplemental Figures S2 and S3, see <http://ajp.amjpathol.org>).^{7,15} Finally, we found an inverse relationship between overexpression of galectin-7 and absence of GATA-3, a transcription factor known to suppress tumor dissemination of breast cancer.³⁰ Whether the emergence of a GATA-3-negative/galectin-7-positive population is distinctively aggressive during tumor progression is a likely possibility. Indeed, constitutive galectin-7 expression by gene transfer approaches in cell lines that express low or undetectable level of galectin-7 resulted in an increased metastatic behavior to the lung and bone and larger osteolytic lesions.

Our preliminary attempts to determine the exact mechanism(s) used by galectin-7 to increase the invasive behavior using *in vitro* migration assays have not permitted to conclude that galectin-7 increases the invasive behavior of breast cancer cells. We indeed found that both 4T1 and 66c14 cells already express constitutive levels of *mmp-9*, which are not affected by transfection with galectin-7. We rather believe that lower survival rates and increased metastases in mice injected with breast cancer cells overexpressing galectin-7 are related to the ability of galectin-7 to protect from apoptosis, as previously shown in the case of galectin-3.^{31,32} This hypothesis is supported by our results showing that expression of galectin-7 in breast cancer cells inhibits PARP-1 cleavage (Figure 6B). The ability of galectin-7 to render mammary cells more resistant to apoptosis is also reminiscent with *in vivo* data in keratinocytes from galectin-7-deficient mice.³³ Like galectin-3, galectin-7 contains a highly conserved XWGR motif corresponding to the BH1 domain of Bcl-2 and mutation of WGR→WAR motif in the α helix of Bcl-2 and has been shown to disrupt Bcl-2 anti-apoptotic function.³⁴ Because this motif has been shown to be responsible for binding to nucleic acid, a role for galectin-7 in the nucleus would be consistent with its strong nuclear staining we observed in breast cancer cells. This mechanism would be consistent with our statistically significant correlation between galectin-7 and Ki-67. Further studies regarding the role of galectin-7 in resistance to apoptosis is currently under investigation.

Acknowledgments

We thank Diane Tremblay for her excellent technical support, Dr. François Denis for providing the Sr α vector, and Dr. Edouard F. Potworowski for a critical reading of the article.

References

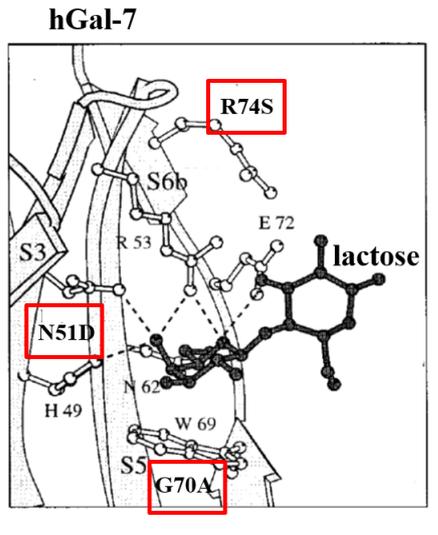
1. Elola MT, Wolfenstein-Todel C, Troncoso MF, Vasta GR, Rabinovich GA: Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival. *Cell Mol Life Sci* 2007, 64:1679–1700
2. Liu FT, Rabinovich GA: Galectins as modulators of tumor progression. *Nat Rev Cancer* 2005, 5:29–41
3. Madsen P, Rasmussen HH, Flint T, Gromov P, Kruse TA, Honoré B, Vorum H, Celis JE: Cloning, expression, and chromosome mapping of human galectin-7. *J Biol Chem* 1995, 270:5823–5829
4. 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* 1995, 168:259–271
5. 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, 96:11329–11334
 6. Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B: A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 1997, 389:300–305
 7. Kuwabara I, Kuwabara Y, Yang RY, Schuler M, Green DR, Zuraw BL, Hsu DK, Liu FT: Galectin-7 (PIG1) exhibits pro-apoptotic function through JNK activation and mitochondrial cytochrome c release. *J Biol Chem* 2002, 277:3487–3497
 8. Ueda S, Kuwabara I, Liu FT: Suppression of tumor growth by galectin-7 gene transfer. *Cancer Res* 2004, 64:5672–5676
 9. Kopitz J, André S, von Reitzenstein C, Versluis K, Kaltner H, Pieters RJ, Wasano K, Kuwabara I, Liu FT, Cantz M, Heck AJ, Gabius HJ: Homodimeric galectin-7 (p53-induced gene 1) is a negative growth regulator for human neuroblastoma cells. *Oncogene* 2003, 22:6277–6288
 10. Lu J, Pei H, Kaeck M, Thompson HJ: Gene expression changes associated with chemically induced rat mammary carcinogenesis. *Mol Carcinog* 1997, 20:204–215
 11. Rorive S, Eddafali B, Fernandez S, Decaestecker C, André S, Kaltner H, Kuwabara I, Liu FT, Gabius HJ, Kiss R, Salmon I: Changes in galectin-7 and cytokeratin-19 expression during the progression of malignancy in thyroid tumors: diagnostic and biological implications. *Mod Pathol* 1997, 15:1294–1301
 12. 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, 65:5205–5210
 13. Demers M, Biron-Pain K, Hébert 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* 2007, 67:2824–2829
 14. Rosa AA, Pepin F, Russo C, Abou Khalil JE, Hallett M, Siegel PM: Osteocalcin promotes breast cancer metastasis to bone. *Mol Cancer Res* 2007, 5:1001–1014
 15. Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM, Cordon-Cardo C, Guise TA, Massagué J: A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* 2003, 3:537–549
 16. Elston CW, Ellis IO: Pathological prognostic factors in breast cancer: I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow up. *Histopathology* 1991, 19:403–410
 17. Wilson BJ, Giguère V: Meta-analysis of human cancer microarrays reveals GATA3 is integral to the estrogen receptor alpha pathway. *Mol Cancer* 2009, 7:49
 18. Eckhardt BL, Parker BS, van Laar RK, Restall CM, Natoli AL, Tavaría MD, Stanley KL, Sloan EK, Moseley JM, Anderson RL: Genomic analysis of a spontaneous model of breast cancer metastasis to bone reveals a role for the extracellular matrix. *Mol Cancer Res* 2005, 3:1–13
 19. Aslakson CJ, Miller FR: Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res* 1992, 52:1399–1405
 20. Mundy GR: Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2002, 2:594–593
 21. Akahani S, Nangia-Makker P, Inohara H, Kim H-RC, Raz A: Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family. *Cancer Res* 1997, 57:5272–5276
 22. Yu F, Finley RL, Raz A, and Kim H-RC: Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. *J Biol Chem* 2002, 277:15819–15827
 23. Baliga MS, Meleth S, Katiyar SK: Growth inhibitory and antimetastatic effect of green tea polyphenols on metastasis-specific mouse mammary carcinoma 4T1 cells in vitro and in vivo systems. *Clin Cancer Res* 2005, 11:1918–1927
 24. Jones C, Mackay A, Grigoriadis A, Cossu A, Reis-Filho JS, Fulford L, Dexter T, Davies S, Bulmer K, Ford E, Parry S, Budroni M, Palmieri G, Neville AM, O'Hare MJ, Lakhani SR: Expression profiling of purified normal human luminal and myoepithelial breast cells: identification of novel prognostic markers for breast cancer. *Cancer Res* 2004, 64:3037–3045
 25. Chung CH, Bernard PS, Percu CM: Molecular portraits and the family tree of cancer. *Nat Genet* 2002, 32:533–540
 26. Castronovo V, Van Den Brule FA, Jackers P, Clause N, Liu FT, Gillet C, Sobel ME: Decreased expression of galectin-3 is associated with progression of human breast cancer. *J Pathol* 1996, 179:43–48
 27. Perou CM, Serlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikow A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, Bolstein D: Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000, 406:747–752
 28. 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* 2009, 387:425–429
 29. Chiariotti L, Salvatore P, Frunzio R, Bruni CB: Galectin genes: regulation of expression. *Glycoconj J* 2004, 19:441–449
 30. Kourou-Mehr H, Bechis SK, Slorach EM, Littlepage LE, Egeblad M, Ewald AJ, Ewald AJ, Pai SY, Ho IC, Werb Z: GATA-3 links tumor differentiation and dissemination in a luminal breast cancer model. *Cancer Cell* 2008, 13:141–152
 31. Nakahara S, Oka N, Raz A: On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. *Apoptosis* 2005, 10:267–275
 32. Lin CI, Whang EE, Abramson MA, Donner DB, Bertagnoli MM, Moore FD Jr, Ruan DT: Galectin-3 regulates apoptosis and doxorubicin chemoresistance in papillary thyroid cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009, 379:626–631
 33. Gendronneau G, Sidhu SS, Delacour D, Dang T, Calonne C, Houzelstein D, Magnaldo T, Poirier F: Galectin-7 in the control of epidermal homeostasis after injury. *Mol Biol Cell* 2008, 19:5541–5549
 34. Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ: BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 1994, 369:321–323

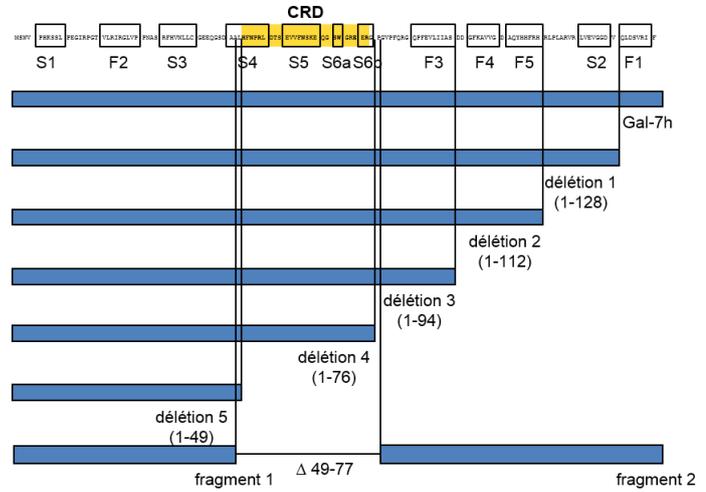
ANNEXE III

GÉNÉRATION DE MUTANTS DE LA GALECTINE-7

A Mutants ponctuels



Mutants par délétions



B

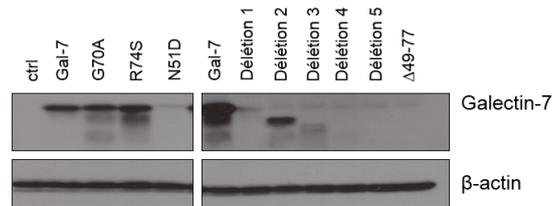


Figure AIII.1 Génération et expression de mutants de la galectine-7 (A) Conception de mutants ponctuels (schéma de gauche) et par délétions (schéma de droite) de la galectine-7. Analyse par immunobuvardage de type *western* de l'expression des différentes protéines mutantes de la galectine-7 par transfection transitoire des cellules du cancer du sein humain MCF-7. Modifié de (Leonidas *et al.*, 1998)

ANNEXE IV

INTERACTION DE LA GALECTINE-7 AVEC LES PROTÉINES DE LA FAMILLE DE BCL-2

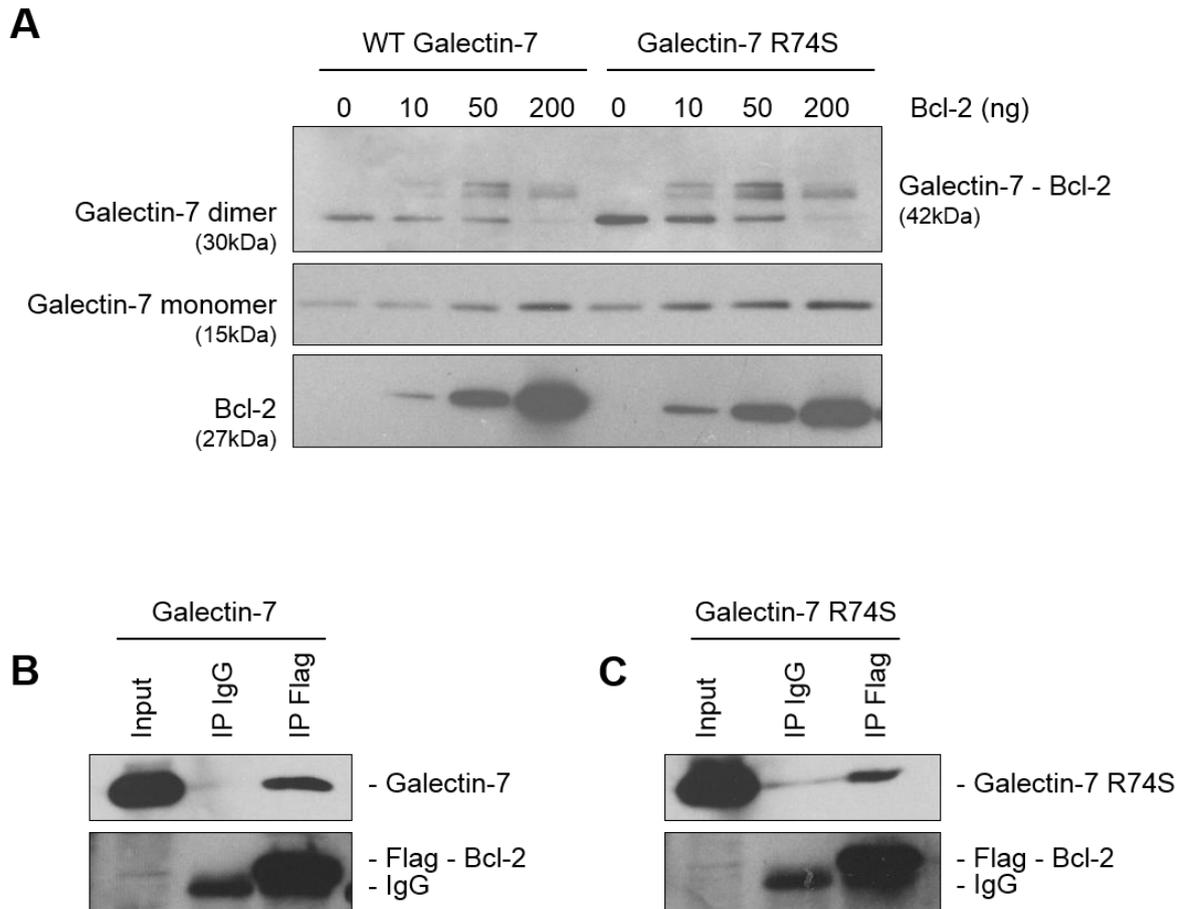


Figure AIV.1 Interaction entre la galectine-7 et Bcl-2. (A) Analyses par immunobuvardage de type *western* d'un gel natif de l'interaction *in vitro* de protéines recombinantes (galectine-7 normale, galectine-7 mutée R74S et Bcl-2). Immunoprécipitation démontrant l'interaction entre (B) la galectine-7 et Bcl-2, ainsi que (C) la galectine-7 mutée R74S et Bcl-2. Les lysats cellulaires ont été récupérés de cellules du cancer du sein humain MCF-7 transfectées avec une construction permettant l'expression de Bcl-2. Les lysats ont été immunoprécipités avec un anti-flag ou un anticorps contrôle IgG et une analyse par immunobuvardage de type *western* a été réalisée à l'aide d'un anticorps anti-galectine-7.

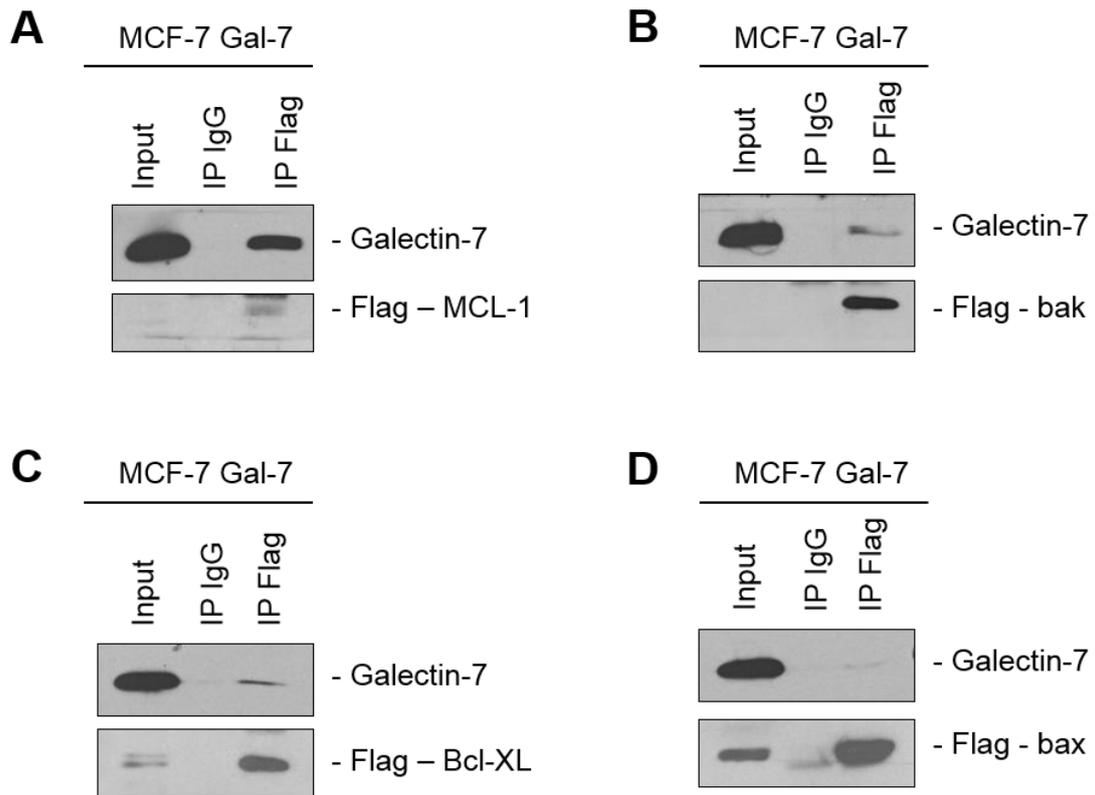


Figure AIV.2 Interaction entre la galectine-7 et les différents membres de la famille de Bcl-2. Immunoprécipitation démontrant l'interaction entre la galectine-7 et (A) MCL-1, (B) bak, (C) Bcl-XL et (D) bax. Les lysats cellulaires ont été récupérés de cellules du cancer du sein humain MCF-7 transfectées avec une construction permettant l'expression des différents membres de la famille de Bcl-2. Les lysats ont été immunoprécipités avec un anti-flag ou un anticorps contrôle IgG et une analyse par immunobuvardage de type *western* a été réalisée à l'aide d'un anticorps anti-galectine-7.

ANNEXE V

MUTATION G70A (WG/AR) DE LA GALECTINE-7

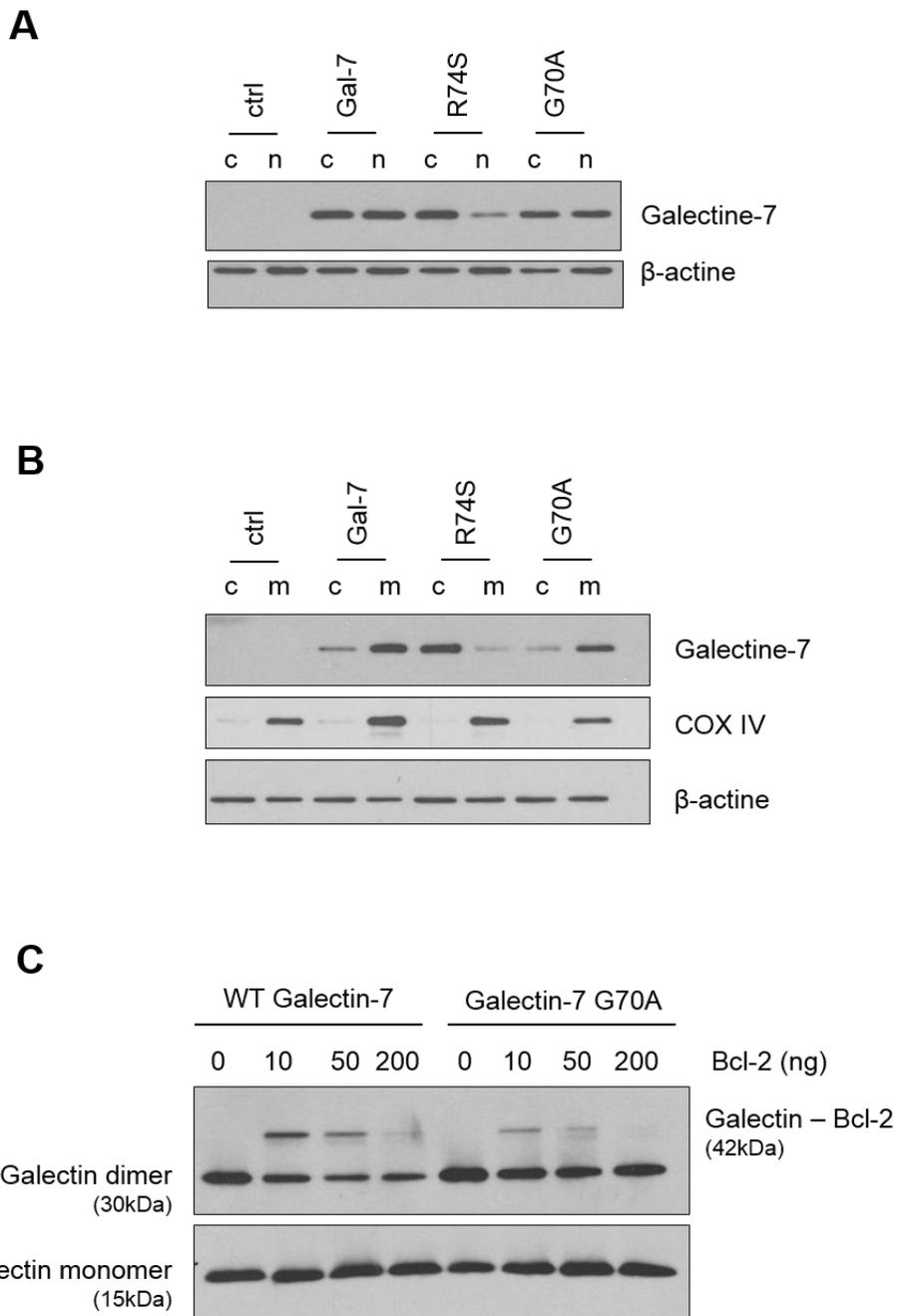


Figure AV.1 La mutation G70A de la galectine-7 n'a aucun effet sur sa localisation intracellulaire et son interaction avec Bcl-2. Fractions subcellulaires cytosoliques et (A) nucléaires ou (B) mitochondriales des cellules MCF-7. L'immunobuvardage de type *western* révèle une localisation non altérée de la galectine-7 mutée G70A lorsque comparée à la protéine normale. (C) Analyses par immunobuvardage de type *western* d'un gel natif de l'interaction *in vitro* de protéines recombinantes (galectine-7 normale, galectine-7 mutée G70A et Bcl-2).

ANNEXE VI

L'EXPRESSION DE LA GALECTINE-7 POTENTIALISE LE PHÉNOTYPE HER-2 POSITIF DANS LE CANCER DU SEIN

Galectin-7 Expression Potentiates HER-2-Positive Phenotype in Breast Cancer

Andrée-Anne Grosset^{1,2}, Françoise Poirier³, Louis Gaboury² and Yves St-Pierre^{1*}

¹ INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, QC, Canada,

² IRIC | Université de Montréal, Montreal, QC, Canada,

³ Institut Jacques Monod, CNRS, UMR 7592, Univ Paris Diderot,
Sorbonne Paris Cité, Paris, France.

Short title: Galectin-7 in breast cancer

***Corresponding author:**

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

Abstract

HER-2 positive tumors are among the most aggressive subtypes of breast cancer and are frequently associated with metastasis and poor outcome. As with other aggressive subtypes of breast cancer, it is associated with abnormally high expression of galectin-7 (gal-7), which confers metastatic breast tumor cells with increased invasive behavior. Although previous studies in the rat model of breast tumorigenesis have shown that gal-7 is also increased in primary breast tumor, its contribution in the development of the primary breast tumors remains unclear. In the present work, we have used genetically-engineered gal-7-deficient mice to examine the role of gal-7 in the development of the mammary gland and of breast cancer. Using histological and immunohistological analysis of whole mammary glands at different stages, we detected no significant changes between normal and gal-7-deficient mice. To test the involvement of gal-7 in breast cancer, we next examined the effects of loss of gal-7 on mammary tumor development by crossing gal-7-deficient mice with the mammary tumor transgenic mouse strain FVB-Tg(MMTV-ErbB2)NK1Mul/J. Finally, assessment of mice survival and tumor volume showed a delay of mammary tumor growth in the absence of systemic gal-7. These data suggest that gal-7 could potentiate the phenotype of HER-2 positive primary breast cancer.

Introduction

Breast cancer is among the most commonly diagnosed cancer among women and is a major cause of cancer-associated mortality [1]. Historically classified according to histomorphological features, breast cancer is now considered a group of highly heterogeneous disease that can be better distinguished at the molecular level according to hormone receptor status, HER-2 gene over-expression or amplification and the proliferative fraction or on gene expression profile [2, 3]. Tumors with increased levels of HER-2 are referred to HER-2-positive

breast cancer. They represent approximately 20-30% all breast cancer cases and harbor too many copies of the *ErbB2* gene, resulting in greater than normal amounts of the HER-2 protein [4]. Together with triple-negative breast cancer, they tend to grow and spread more aggressively than other breast cancers and are considered among the most aggressive subtypes of breast cancer. A considerable amount of knowledge on the biological and molecular features of these cancers has been obtained using a number of transgenic mouse models, including the development of mice harboring an *ErbB2* gene under the control of the MMTV promoter. Overexpression of this gene has been shown to induce multifocal tumors at an average age of seven months [5]. Signaling pathways regulated by HER-2 have also been identified through the use of MMTV-*ErbB2* mice. Not surprisingly, such mouse models are commonly used to study the role of other proteins in HER-2 positive breast carcinomas.

Galectins are a family of widely expressed proteins that contains 15 members, named according to the order of their discovery [6, 7]. All galectins share an approximately 130 amino acid-long highly conserved sequence that encodes a carbohydrate recognition domain (CRD) with affinity to β -galactosides epitopes attached to cell surface glycoproteins following N- and O-glycosylation. Binding of galectins on glycans is well-known to induce the formation of cell surface lattices that regulate surface retention and signaling threshold of cell surface glycoreceptors [8]. This has been well established for galectin-1 (gal-1) and gal-3. For example, lattice formation following binding of gal-3 to β -1,6-N-acetylglucosamine branched glycans leads to alterations in the clustering of membrane glycoreceptors, resulting in functional advantages for tumor cells [9]. Not surprisingly, alterations in the expression level of gal-3 plays a central role in modulating the tumor progression, most notably in the case of breast cancer where gal-3 is expressed at abnormally high levels in both cancer and stromal cells [10-14].

There is no doubt that most of our knowledge on the role of galectin in breast cancer derives from studies that focuses on gal-1 and gal-3, the most studied members of the galectin family. There is increasing indications, however, that other members of the galectin family are also important in tumor progression. We have recently shown that multiple galectins are expressed in highly aggressive breast cancer tissues [15]. This is especially true for gal-7. We and others have reported that gal-7 is expressed at high levels in aggressive subtypes of breast cancer, including HER-2-positive subtype [2, 16, 17]. The expression of gal-7 in breast cancer cells confers tumor cell with increasing metastatic behavior, suggesting that gal-7 plays a central role in late stages of the disease. Using a mouse model, we have shown that ectopic expression of gal-7 in breast cancer cells increases their ability to form bone and lung metastasis. In humans, we found that high levels of gal-7 expression correlates with lymph nodes metastasis in patients with HER-2-positive breast carcinoma [16]. Whether gal-7 modulates the early stage of the disease, however, remains unclear. Yet, there are indications that gal-7 could modulate the onset of the disease. For example, gal-7 is constitutively expressed in myoepithelial cells of the adult mammary gland [16, 18]. Lu *et al.* have also shown that gal-7 expression is rapidly induced in chemically-induced rat mammary tumors [19]. In the present work, we have investigated the role of gal-7 in regulating mammary tumor development using gal-7-deficient mice (KOG7) and the mouse model of breast cancer FVB-Tg(MMTV-ErbB2)NK1Mul/J in which an activated form of ErbB2 is specifically expressed in mammary tissue. Our results showed that genetic ablation of gal-7 does not significantly impair the development at different stages of the mammary gland. Absence of gal-7, however, significantly prolongs the survival of mice with mammary tumors and reduces the size of the primary mammary tumors as compared to mice expressing gal-7.

Materials and Methods

Mice

C57BL/6 mice and FVB-Tg(MMTV-ErbB2)NK1Mul/J transgenic mice [20] were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). *Lgals7* knock-out (KOG7) mice have been previously described [21]. Mice were maintained on a 12 hours light and dark cycle on a normal chow diet. The mice had access to water and diet ad libitum. The MMTV-ErbB2 mice were crossed with C57BL/6-*lgals7*^{-/-} mice. F1 mice were bred with *lgals7*^{+/-} females to yield MMTV-ErbB2^{+/-}/*lgals7*^{+/+}, MMTV-ErbB2^{+/-}/*lgals7*^{+/-}, and MMTV-ErbB2^{+/-}/*lgals7*^{-/-} littermates. All experiments were conducted using virgin females. Tumor development was monitored by measuring the length and width with calipers. Statistical analyses of tumor growth curves were conducted on the natural log of tumor volumes in the two groups and compared with the wild type with unpaired t test. All animal studies were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (CISAU) of INRS-Institut Armand-Frappier (Protocols #0702-08 and #0706-01).

Genotyping by PCR

DNA was extracted from the end of the tail. *ErbB2* transgene (sense primer: 5'- CCC CGG GAG TAT GTG AGT GA -3' and antisense primer: 5'- ACA GTC GGA AGT TTT GTC GAG T -3'), *galectin-7* (sense primer: 5'- GGG CTT TGT GGG AAT ATT GAT AAC C -3' and antisense primer: 5'- GGT ACA TTT GGA CGA TAC GCC ACT C -3'), *Neo-A3* (sense primer: 5'- TCA TTA TTT GAC CCT CCG TTA CTG G -3' and antisense primer: 5'- GCA CTG TTT ACC TTC ATC GTG CAG A -3') and *GAPDH* (sense primer: 5'- CGT CGT GGA TCT GAC GTG CCG -3' and antisense primer: 5'- GGG GTC GTT CCT GTG ACT CGT T -3') were amplified using the following conditions: 94°C for 3 min, followed by 39 cycles of the following: 94°C for 1 min, 60°C for 1 min, 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 (Eppendorf, Mississauga, ON, Canada). The amplified products were analyzed by electrophoresis using 1% agarose gels and SYBR Safe (Life Technologies) staining and UV illumination.

Cell Lines and Reagents

The MCF-7 neo (clone 1) and MCF-7 HER-2 (clone 18) cell lines were a generous gift from Dr. Mien-Chie Hung (The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, TX). These cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) high glucose / F12 (1:1) supplemented with 10% (v/v) FBS, 2 mM L-glutamine and 10 mM HEPES buffer. All cell culture products were purchased from Life Technologies (Burlington, ON, Canada). Immunohistochemical reactions on smear cells were realized as described below.

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'- ATG TCC AAC GTC CCC CAC AAG -3' and antisense primer: 5'- CTC CAC GAG TAG TAG CGC AGT -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, 62°C for 1 min, 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 (Eppendorf, Mississauga, ON, Canada). The amplified products were analyzed

by electrophoresis using 1% agarose gels and SYBR Safe (Life Technologies) staining and UV illumination.

Histological Analysis

Whole mammary glands collected at different stages of development were formalin-fixed and paraffin-embedded. Then, sections of 4 μm were stained with hematoxylin and eosin and scanned at a high resolution using the Nanozoomer Digital Pathology (Hamamatsu, Bridgewater, NJ).

Tissue Microarrays and Immunohistochemistry

Formalin-fixed paraffin-embedded material from each primary tumor sample and normal mammary gland was used to construct tissue microarrays with an automated arrayer design to construct high-density tissue microarray blocks (ATA-27 Beecher Instruments, Sun Prairie, WI). To that end, triplicate 1 mm cores from each tumor and control tissues were punched out and arrayed into two recipient blocks. For immunohistochemical analysis, three-micrometer thick sections were prepared from each TMA. Immunostaining reactions were carried out using the Discovery XT automated immunostainer (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). Deparaffinized sections were incubated in cell conditioning pH 8 for antigen retrieval and then with primary antibodies for 1 to 3 hrs: goat polyclonal anti-galectin-7 (1:100; R&D Systems, Minneapolis, MN), rabbit monoclonal anti-estrogen receptor α (1:50; EMD Millipore, Darmstadt, Germany), rabbit polyclonal anti-keratin 5 (1:100; Biolegend, San Diego, CA), rabbit polyclonal anti-HER-2 (1:100; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), rabbit monoclonal anti-Ki-67 (1:1000; Biocare Medical, Concord, CA). The slides were counterstained with hematoxylin and bicarbonate. Each section was scanned at a high resolution using the Nanozoomer Digital Pathology.

Results and Discussion

Mammary glands development in gal-7-deficient mice.

Previous studies have shown that gal-7-deficient mice live and reproduce normally, at least in animal house conditions [21]. Observations over several years have also failed to reveal any obvious abnormalities with regards to feeding of pups, litter size or body weights of pups during lactation. However, because gal-7 is constitutively expressed in mammary myoepithelial cells and is an important regulator of cell homeostasis [16, 21-23], and given the key role of myoepithelial cells during mammary gland development [24], we carried out a histological analysis of the mammary tissues at different stages of development to determine whether absence of gal-7 may alter the epithelial integrity of the mammary gland. Our results showed no detectable difference in pubertal mammary gland between virgin *lgals7^{-/-}* and age-matched wild-type (WT) female mice. No differences were also detected in mice at 15 days of pregnancy or during lactation and post-lactational involution (**Fig. 1**). Furthermore, the absence of gal-7 did not prevent the epithelial expression of the estrogen receptor or cytokeratin 5 (K5), a specific marker of mammary myoepithelial cells (**Fig. 2**). Our results are somewhat similar to those of Gendronneau *et al.* who showed that absence of gal-7 does not affect the expression profiles of markers of different epidermis layers, such as CK5, CK10 and loricrin [21]. They also support the view that deletion of a single galectin has limited impact in the overall development of mice, at least for the cases of gal-1, gal-3, gal-7, and gal-9 [21, 25-27]. In fact, even mice that are genetically-deficient for both gal-1 and gal-3 appears normal [26]. Whether this is due the compensatory role of other galectins is a real possibility since multiple galectins in a given tissue, including gal-1, gal-3, gal-8 and gal-9, in the case of the mammary gland [15, 18, 28].

Gal-7 in mammary tumorigenesis.

Previous studies using gal-3-deficient mice have revealed a role for this galectin in breast cancer progression [29]. Thus, even though absence of gal-7 had no significant effect on the integrity of the mammary gland, we next examined whether it has a role in mammary tumorigenesis. For this purpose, we crossed MMTV-ErbB2 transgenic mice, a well-established preclinical model for HER-2 positive subtype of breast carcinoma [20], with gal-7-deficient mice for two generations in order to obtain mice that were either gal-7-deficient (KOG7) or that had at least one allele of wild-type gal-7 (**Fig. S1**). All mammary tumors were then collected and used to construct tissue microarrays (TMAs) in order to compare the expression of gal-7, HER-2, ER, and Ki-67 in each tumor by immunohistochemistry staining (**Fig. 3**). Our results showed a significant difference in the frequency of HER-2-positive tumors between KOG7 mice and gal-7-positive mice ($p = 0.0076$). Indeed, tumors derived from KOG7 were rarely HER-2 positive tumors (**Table 1**). Such an association between expression of gal-7 and HER-2-positive staining was also observed when we examined gal-7-positive tumors and gal-7-negative tumors ($p = 0.0037$). As expected for MMTV-ErbB2 transgenic mice, ER status was negative for all tumors (*data not shown*) [30]. Kaplan-Meier survival curves also showed that mice with gal-7-positive tumors had a significant ($p = 0.086$) lower median survival time (289 days) as compared to gal-7-negative tumors derived from KOG7 mice (358 days) (**Fig. 4A**). Tumors that were gal-7-positive were also significantly ($p < 0.05$) larger than tumors of KOG7 mice (**Fig. 4B**).

Table 1. Comparison of markers expression in presence or absence of gal-7 in mice

Characteristics	G7+	KOG7	<i>p</i>	G7+	G7-	<i>p</i>
HER-2 membrane expression						
≤ 30% of tumor cells	1/10	5/6	0.0076	1/10	6/7	0.0037
> 30% of tumor cells	9/10	1/6		9/10	1/7	
Ki-67 expression						
< 20% of tumor cells	1/12	2/15	NS	1/12	7/15	0.0433
≥ 20% of tumor cells	11/12	13/15		11/12	8/15	

Conclusion

In the present work, we have shown that absence of gal-7: 1) doesn't significantly affect normal development of mammary epithelium; 2) delays progression of MMTV-ErbB2 mammary tumors, and 3) favors the emergence of mammary tumors towards a HER-2-negative phenotype. Taken together, these results support the view that gal-7 plays an important role in primary breast cancer by accelerating tumor progression. They also confirm previous studies that linked gal-7 with the HER-2-positive molecular subtype. Whether expression of gal-7 and HER-2 is linked at the molecular level is an interesting possibility supported by preliminary findings using MCF-7 neo and MCF-7 HER-2 breast cancer cell lines. There again, we found that the presence of HER-2 in MCF-7 cells correlated with increased *gal-7* mRNA expression (**Fig. S2**). Such cell model will thus be useful to clarify a functional link between gal-7 and

HER-2. Future studies will also be necessary to establish the mechanism by which gal-7 accelerates the development of primary breast cancer.

Acknowledgements

We thank Diane Tremblay for essential technical assistance and Gaëlle Gendronneau for the generation of *galectin-7* knock-out mice. We also thank Julie Hinsinger, Micheline Fortin and Melina Narlis for their technical support at IRIC's histology core facility. This work was supported by a grant from the Canadian Institutes for Health Research (Grant No. MOP-89697).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AAG, YSP. Performed the experiments and analyzed the data: AAG, YSP. Contributed reagents/materials: FP, LG. Wrote the paper: AAG, YSP. Revised the manuscript: FP, LG.

References

1. Canadian Cancer Society's Advisory Committee on Cancer Statistics. Canadian Cancer Statistics 2014. Toronto, ON: Canadian Cancer Society: 2014.
2. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-52.
3. 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*. 2001;98(19):10869-74.
4. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987;235(4785):177-82.
5. Ursini-Siegel J, Schade B, Cardiff RD, Muller WJ. Insights from transgenic mouse models of ERBB2-induced breast cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(5):389-97.
6. Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, et al. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell*. 1994;76(4):597-8.
7. Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem*. 1994;269(33):20807-10.

8. Nabi IR, Shankar J, Dennis JW. The galectin lattice at a glance. *J Cell Sci.* 2015;128(13):2213-9.
9. Fortuna-Costa A, Gomes AM, Kozlowski EO, Stelling MP, Pavao MS. Extracellular galectin-3 in tumor progression and metastasis. *Front Oncol.* 2014;4:138.
10. Shekhar MP, Nangia-Makker P, Tait L, Miller F, Raz A. Alterations in galectin-3 expression and distribution correlate with breast cancer progression: functional analysis of galectin-3 in breast epithelial-endothelial interactions. *Am J Pathol.* 2004;165(6):1931-41.
11. Moisa A, Fritz P, Eck A, Wehner HD, Murdter T, Simon W, et al. Growth/adhesion-regulatory tissue lectin galectin-3: stromal presence but not cytoplasmic/nuclear expression in tumor cells as a negative prognostic factor in breast cancer. *Anticancer Res.* 2007;27(4B):2131-9.
12. Zhang H, Luo M, Liang X, Wang D, Gu X, Duan C, et al. Galectin-3 as a marker and potential therapeutic target in breast cancer. *PLoS One.* 2014;9(9):e103482.
13. Fernandez-Aguilar S, Noel JC. Expression of cathepsin D and galectin 3 in tubular carcinomas of the breast. *APMIS.* 2008;116(1):33-40.
14. Koo JS, Jung W. Clinicopathologic and immunohistochemical characteristics of triple negative invasive lobular carcinoma. *Yonsei Med J.* 2011;52(1):89-97.
15. Grosset AA, Labrie M, Vladoiu MC, Yousef EM, Gaboury L, St-Pierre Y. Galectin signatures contribute to the heterogeneity of breast cancer and provide new prognostic information and therapeutic targets. *Oncotarget.* 2016. doi: 10.18632/oncotarget.7784.
16. 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.* 2010;176(6):3023-31.
17. Miwa HE, Koba WR, Fine EJ, Giricz O, Kenny PA, Stanley P. Bisected, complex N-glycans and galectins in mouse mammary tumor progression and human breast cancer. *Glycobiology.* 2013;23(12):1477-90.
18. 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.* 2004;64(9):3037-45.
19. Lu J, Pei H, Kaeck M, Thompson HJ. Gene expression changes associated with chemically induced rat mammary carcinogenesis. *Mol Carcinog.* 1997;20(2):204-15.
20. Muller WJ, Sinn E, Pattengale PK, Wallace R, Leder P. Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene. *Cell.* 1988;54(1):105-15.
21. 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.* 2008;19(12):5541-9.
22. 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.* 1999;96(20):11329-34.
23. Gendronneau G, Sanii S, Dang T, Deshayes F, Delacour D, Pichard E, et al. Overexpression of galectin-7 in mouse epidermis leads to loss of cell junctions and defective skin repair. *PLoS One.* 2015;10(3):e0119031.

24. Moumen M, Chiche A, Cagnet S, Petit V, Raymond K, Faraldo MM, et al. The mammary myoepithelial cell. *Int J Dev Biol.* 2011;55(7-9):763-71.
25. Poirier F, Robertson EJ. Normal development of mice carrying a null mutation in the gene encoding the L14 S-type lectin. *Development.* 1993;119(4):1229-36.
26. Colnot C, Fowles D, Ripoche MA, Bouchaert I, Poirier F. Embryonic implantation in galectin 1/galectin 3 double mutant mice. *Dev Dyn.* 1998;211(4):306-13.
27. Seki M, Oomizu S, Sakata KM, Sakata A, Arikawa T, Watanabe K, et al. Galectin-9 suppresses the generation of Th17, promotes the induction of regulatory T cells, and regulates experimental autoimmune arthritis. *Clin Immunol.* 2008;127(1):78-88.
28. DE Oliveira JT, DE Matos AJ, Barros R, Ribeiro C, Chen A, Hespanhol V, et al. Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in canine non-malignant and malignant mammary tissues and in progression to metastases in mammary tumors. *Anticancer Res.* 2014;34(5):2211-21.
29. Kouo T, Huang L, Pucsek AB, Cao M, Solt S, Armstrong T, et al. Galectin-3 Shapes Antitumor Immune Responses by Suppressing CD8+ T Cells via LAG-3 and Inhibiting Expansion of Plasmacytoid Dendritic Cells. *Cancer Immunol Res.* 2015;3(4):412-23.
30. Lu C, Speers C, Zhang Y, Xu X, Hill J, Steinbis E, et al. Effect of epidermal growth factor receptor inhibitor on development of estrogen receptor-negative mammary tumors. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(24):1825-33.

Figure Legends

Figure 1. No significant effects on mammary gland stages in the absence of gal-7. Histology assessment of whole mammary glands (H&E stained) of wild-type (C57BL/6) and KOG7 mice. Three mice were used for each group of mammary gland stages: puberty (6 weeks of age), pregnancy (5, 10 and 15 days), lactation (0, 5 and 10 days) and involution (1 and 5 days). Most representative mammary gland tissue of each stage is shown for the comparison between wild-type and KOG7 mice. Scale bars, 1 mm and 100 μ m (small box).

Figure 2. Normal mammary epithelial cells protein expression in knock-out gal-7 mice. Immunohistochemical detection of gal-7 (G7; as a control), estrogen receptor (ER; mammary luminal epithelial cell marker) and keratin 5 (K5; mammary myoepithelial cell marker) on normal mammary tissues of wild-type (C57BL/6) and KOG7 mice. Scale bars, 50 μ m and 25 μ m (small box).

Figure 3. Immunohistological analysis of mammary tumour markers in presence or absence of gal-7. Immunohistochemical detection of G7 to distinguish G7+ and G7- tumor groups, HER-2 to count positive cells for its membrane localization and Ki-67 as a proliferative marker. Scale bars, 50 μm and 25 μm (small box).

Figure 4. Decreased survival and higher tumor volume in presence of gal-7 in MMTV-ErbB2 mammary tumorigenesis. A) Kaplan-Meier survival curves for each group: G7+ (presence of gal-7 in mammary carcinoma), G7- (absence of gal-7 in mammary carcinoma) and KOG7 (lack of gal-7 throughout the body). The median survival of each group is: 289 days (G7+), 316 days (G7-) and 358 days (KOG7). The *p* value was calculated between G7+ and KOG7 groups. B) Average tumor volume of all mice from the specified group. The onset of the tumor was measured and identified as the first week post-appearance. The *p* value was calculated between G7+ and KOG7 groups, three weeks after tumor appearance.

Figure 1

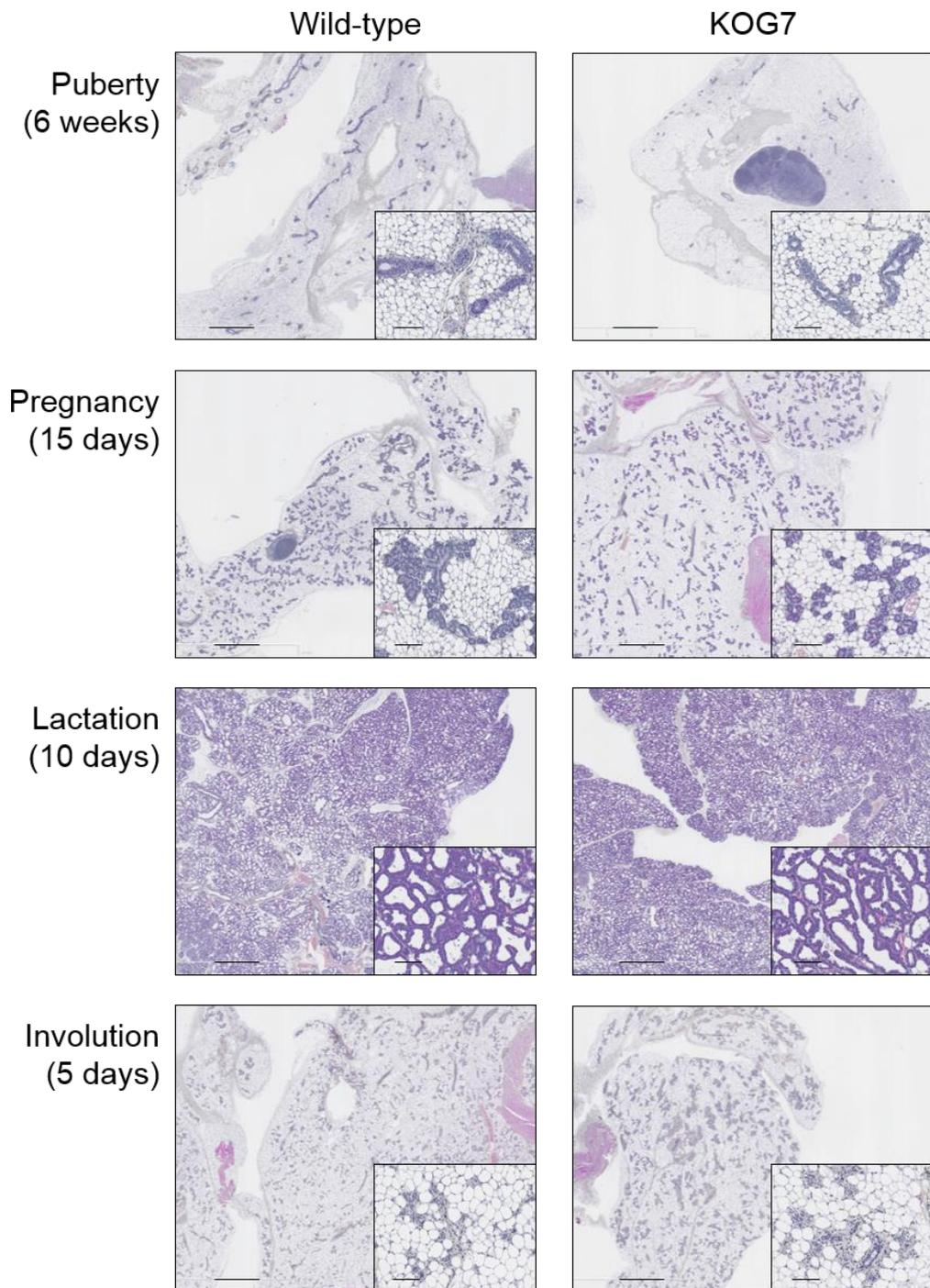


Figure 2

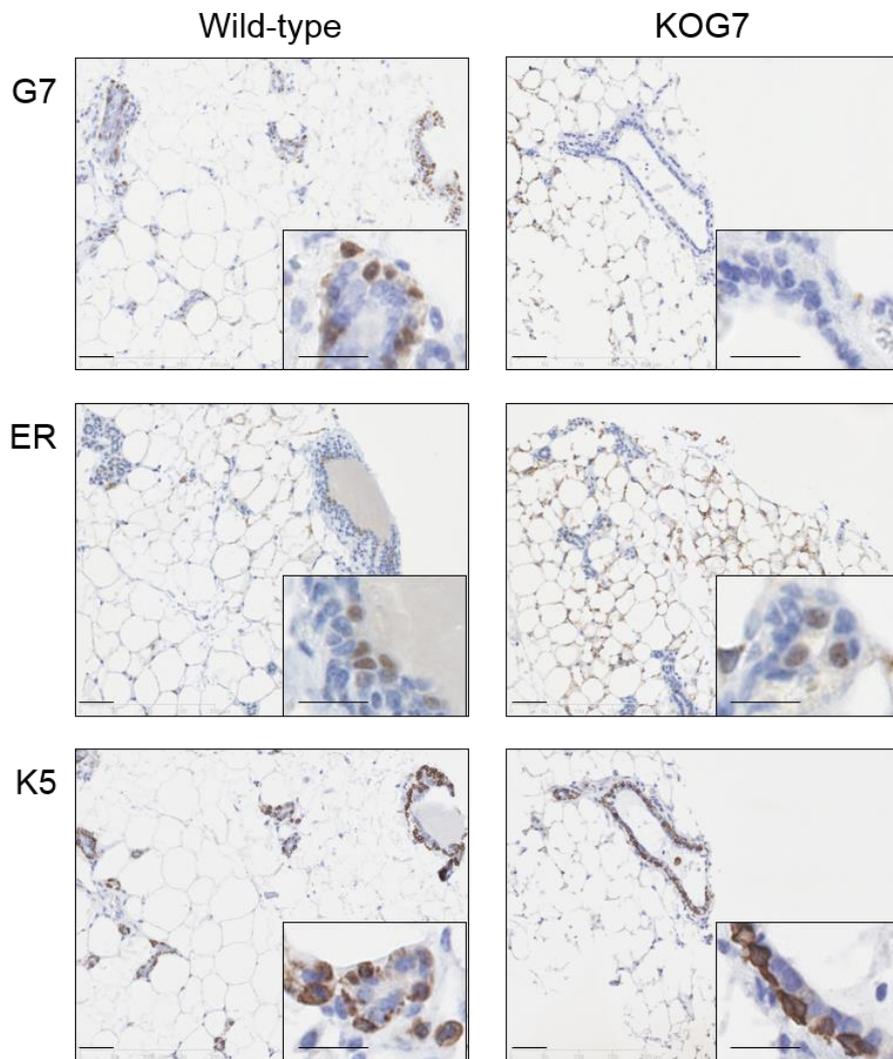


Figure 3

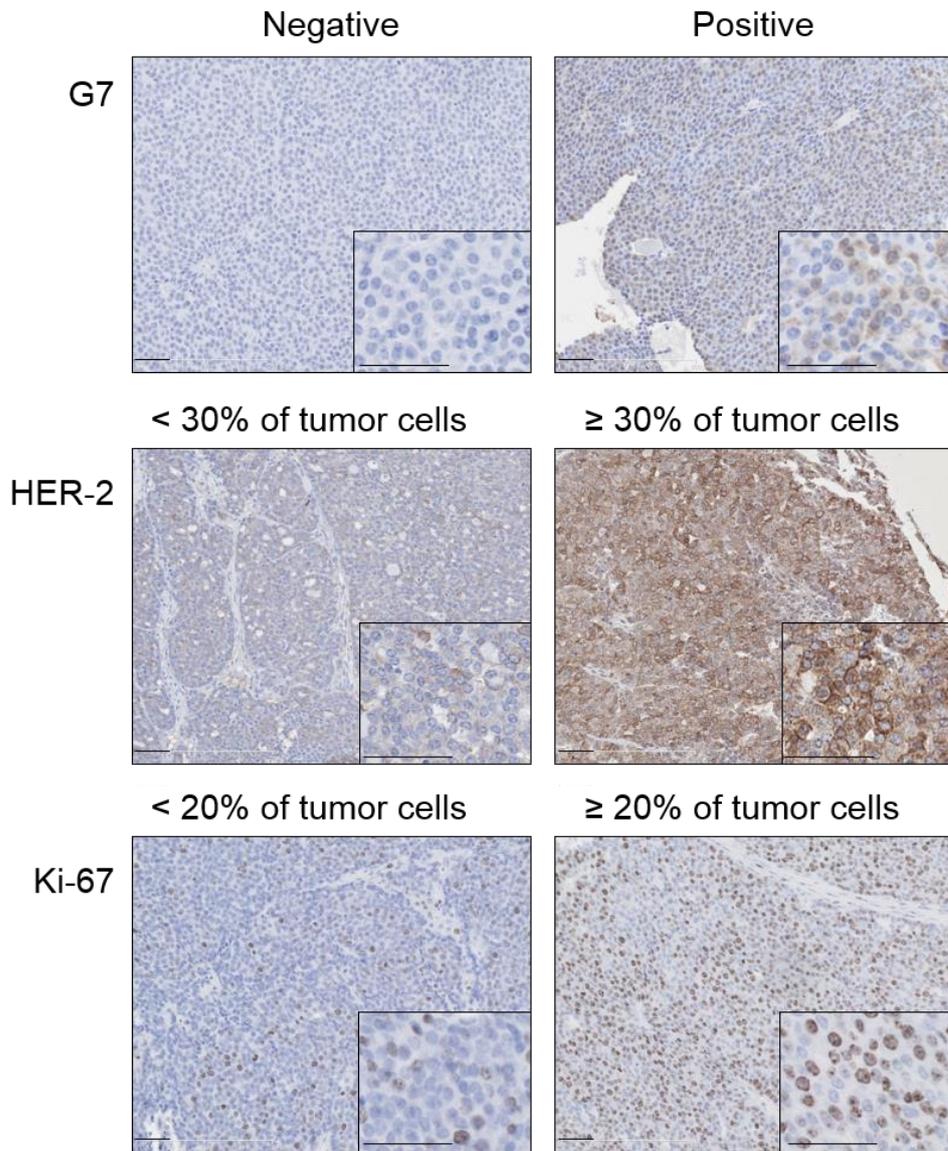
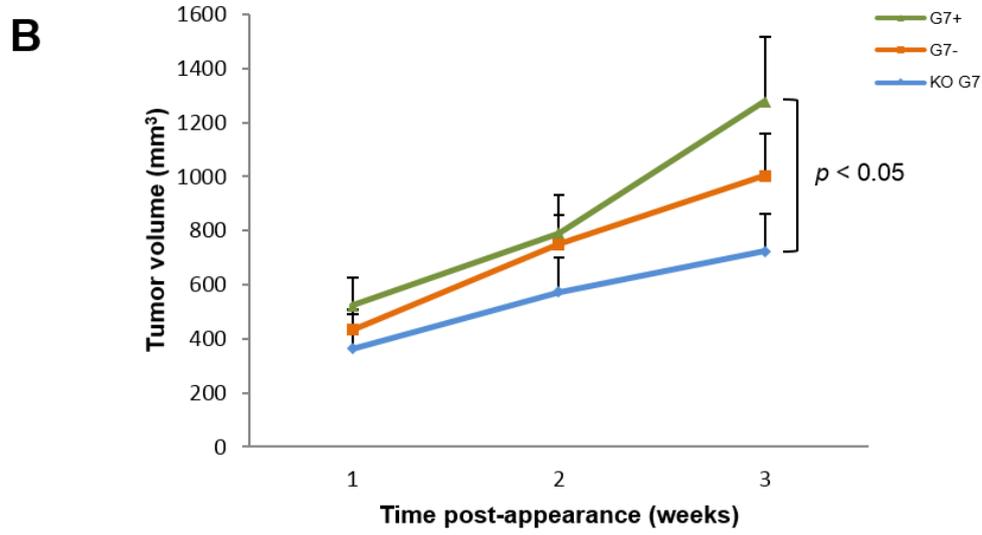
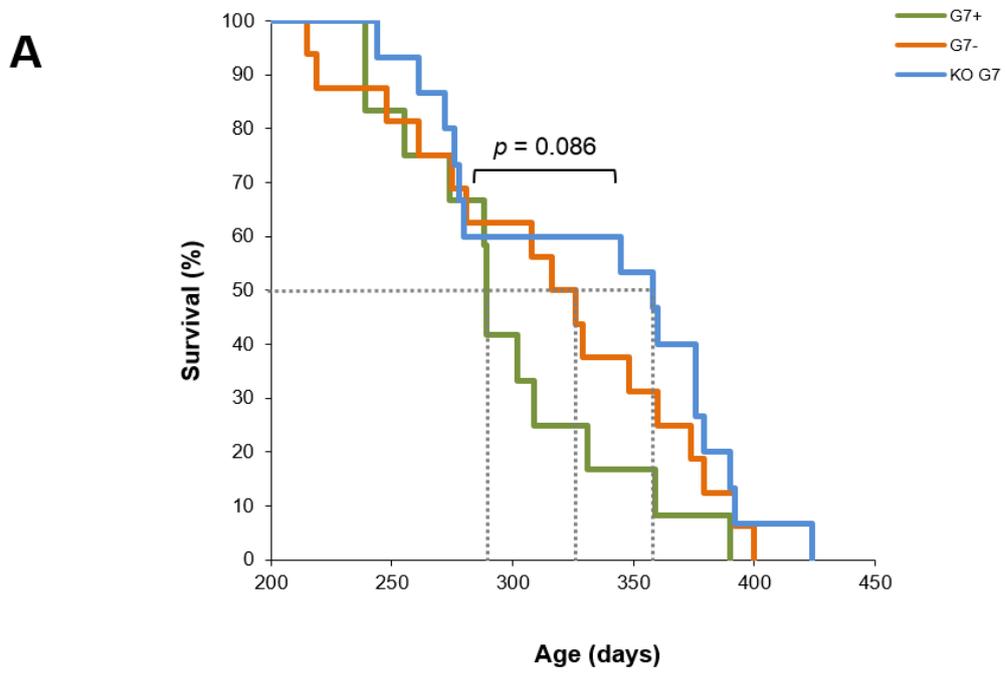


Figure 4

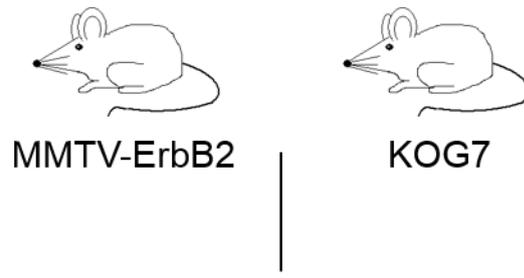


Supplementary Figure Legends

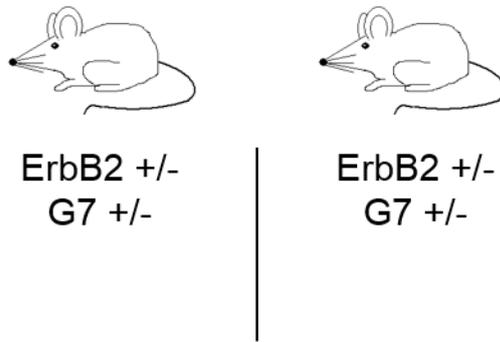
Figure S1. Experimental design. MMTV-ErbB2 mice were cross with KOG7 mice to generate heterozygous: *Igals7^{+/-}* and *ErbB2^{+/-}*. Then, heterozygous mice were cross to generate the second generation, the latter having been observed for approximately 425 days. Only mice with ErbB2 transgene has developed tumors (experimental groups). PCR genotyping and immunohistochemistry were used for the distinction of three groups of tumor: KOG7, G7+ and G7-.

Figure S2. mRNA upregulation of gal-7 by HER-2 in MCF-7 cells. A) mRNA levels of *gal-7* and *GAPDH* (as a loading control) were assayed by semi-quantitative RT-PCR in MCF-7 neo and MCF-7 HER-2 cells. B) Immunohistochemical reactions on smear cells were realized for HER-2 membrane localization. Scale bars, 100 μ m.

Figure S1



1st generation



2nd generation

	Experimental groups			Control groups		
ErbB2	+	+	+	-	-	-
G7	-/-	+/+	+/-	-/-	+/+	+/-
	↓	↓	↓			
	Tumors KOG7	Tumors G7+ or G7-	Tumors G7+ or G7-			

Figure S2

