

Université du Québec  
Institut national de la recherche scientifique  
INRS-Institut Armand-Frappier

## **GALECTINE-14: LES CARACTÉRISTIQUES D'UNE NOUVELLE GALECTINE DANS LE CANCER**

Par  
Lorena Oliveira Fernandes de Araujo

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

### **Jury d'évaluation**

Président du jury et  
examineur interne

Dr. Charles Gauthier  
INRS-Institut Armand Frappier

Examineur externe

Dr. Carlos Reyes-Moreno  
Département de biologie médicale  
Université du Québec à Trois-Rivières

Directeur de recherche

Dr. Yves St-Pierre  
INRS-Institut Armand Frappier

## REMERCIEMENTS

J'aimerais exprimer ma gratitude à mon directeur de recherche, Dr. Yves St-Pierre, pour les conseils et les encouragements qu'il m'a prodigués tout au long du processus d'apprentissage et de la réalisation de ce projet. Je ne le remercierai jamais assez de m'avoir donné cette grande opportunité et pour toutes les connaissances et le temps qu'il m'a offert.

J'aimerais également remercier les membres du laboratoire de Dr. St-Pierre pour la compagnie et le soutien indirect qu'ils m'ont apportés tout au long de ces deux ans et demi de travail et d'étude. Un merci tout spécial à Marilyne Labrie, pour les conseils pratiques et l'aide au début de ce parcours, et à Marlène Fortier, pour son soutien continu et son aide dans mon travail expérimental tout au long de ma maîtrise.

Enfin et surtout, je voudrais remercier mes proches, en particulier mon père, qui m'ont soutenu tout au long de ce trajet. Je vous serai éternellement reconnaissant pour votre amour.

# LISTE DES RÉALISATIONS SCIENTIFIQUES

## Publications

Labrie, M., **De Araujo, L.O.F.**, Communal, L., Mes-Masson, A., & St-Pierre, Y. (2017). Tissue and plasma levels of galectins in patients with high grade serous ovarian carcinoma as new predictive biomarkers. *Scientific Reports*, 7(1).

**De Araujo L.O.F** and St-Pierre Y. (2018). Galectin-14 expression in ovarian cancer. *BioRxiv*.

## Présentations par affiche

**De Araujo L. O. F.** and St-Pierre Y. Galectin-14: A new galectin expressed in ovarian cancer cells. *11ème Congrès Armand-Frappier* 9-11 November 2017, Manoir des Sables (Orford).

## RÉSUMÉ

Les galectines sont des protéines multifonctionnelles dont l'expression change dans différentes conditions physiologiques ou pathologiques, y compris le cancer. En fait, il a été démontré que ces protéines induisent une immunosuppression locale et systémique en tuant les cellules immunitaires. Cependant, jusqu'à présent, la plupart des études se sont concentrées sur la galectine-1 et la galectine-3, et nous en savons très peu sur les autres galectines, en particulier celles récemment découvertes, comme la galectine-14. La galectine-14 est une galectine du type prototype hautement exprimée à l'interface mère-fœtus et dont l'expression et les fonctions dans les cellules cancéreuses sont encore inconnues.

L'objectif global de ce projet était de caractériser l'expression de cette galectine méconnue et d'explorer son rôle dans le cancer. Plus précisément, nos objectifs comprenaient: 1) l'analyse *in silico* de l'expression du gène de la galectine-14; 2) des expériences *in vitro* pour l'analyse de l'expression de la galectine-14 dans les lignées cellulaires cancéreuses, et enfin, 3) la création d'un modèle cellulaire *in vitro* afin d'explorer les fonctions de cette galectine dans le cancer. Nos résultats montrent qu'il existe une corrélation entre l'ARNm de la galectin-14 et le cancer de l'ovaire, et qu'une expression élevée de cette galectine dans les cellules cancéreuses ovariennes est associée à une survie plus courte. De plus, l'expression de la galectine-14 est détectable dans certaines lignées de cellules cancéreuses ovariennes au niveau de l'ARNm, en particulier dans les lignées d'adénocarcinomes séreux de haut grade (HGSA). Enfin, notre modèle *in vitro* nous a permis d'observer une augmentation de l'activité apoptotique des cellules HEK-293 exprimant des taux élevés de galectine-14.

Ainsi, bien que l'étude de cette galectine n'en soit qu'à ses débuts, nous avons été en mesure de fournir de nouvelles connaissances sur les modes d'expression de cette protéine et son implication dans le cancer. À long terme, nos résultats contribueront à l'élaboration de nouvelles stratégies visant à cibler ces molécules afin de surmonter l'immunosuppression associée au cancer, de freiner la croissance tumorale et de prévenir les métastases dans le carcinome ovarien et d'autres types de cancer.

## ABSTRACT

Galectins are multifunctional proteins whose expression changes under different physiological or pathological conditions, including cancer. In fact, these proteins have been shown to induce local and systemic immunosuppression by killing immune cells. However, so far, most studies have focused on galectin-1 and galectin-3, and we know very little about other galectins, especially the recently discovered ones, such as galectin-14. Galectin-14 is a prototype galectin highly expressed at the maternal-fetal interface and whose expression and functions in cancer cells is still unknown.

The overall goal of this project was to characterize the expression of this poorly known galectin and to explore its role in cancer. More specifically, our objectives included: 1) *in silico* analysis of galectin-14 gene expression; 2) *in vitro* experiments for analysis of galectin-14 expression in cancer cell lines, and lastly, 3) the creation of an *in vitro* cell model in order to explore the functions of this galectin in cancer. Our results show that there is a correlation between galectin-14 mRNA and ovarian cancer, and that high expression of this galectin in ovarian cancer cells is associated with a shorter survival. Additionally, galectin-14 expression is detectable in some ovarian cancer cell lines at the mRNA level, especially in high grade serous adenocarcinoma (HGSA) cell lines. Lastly, our *in vitro* model allowed us to observe an increase in apoptotic activity of HEK-293 cells expressing high levels of galectin-14.

Thus, although the study of this galectin is still in its infancy, we were able to provide novel insights into the expression patterns of this protein and its involvement in cancer. On a long-term basis, our results will contribute to the development of new strategies to target these molecules in order to overcome cancer-associated immunosuppression, restrain tumor growth and prevent metastatic disease in ovarian carcinoma and other types of cancer.

# TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS .....	II
LISTE DES RÉALISATIONS SCIENTIFIQUES .....	III
RÉSUMÉ .....	IV
ABSTRACT .....	V
TABLE DES MATIÈRES .....	VI
LISTE DES TABLEAUX .....	VIII
LISTE DES FIGURES .....	IX
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	XI
CHAPITRE 1 .....	1
1.1 LES GALECTINES .....	2
1.1.1 <i>Galectines: Contexte historique</i> .....	2
1.1.2 <i>Famille des galectines: Classification, structure et caractéristiques générales</i> ...	4
1.1.2.1 <i>Classification des galectines</i> .....	4
1.1.2.2 <i>Architecture des galectines et leur comportement fonctionnel</i> .....	6
1.1.2.3 <i>Conception structurale et propriétés moléculaires</i> .....	8
1.1.3 <i>Expression et distribution</i> .....	9
1.1.4 <i>Activités biologiques et fonctions des galectines</i> .....	11
1.1.4.1 <i>Fonctions intracellulaires</i> .....	11
1.1.4.2 <i>Fonctions extracellulaires</i> .....	13
1.1.4.3 <i>Apoptose : Modulation des voies de mort cellulaire par les galectines</i> ..	15
1.1.5 <i>Les galectines dans le cancer</i> .....	17
1.2 LES GALECTINES MOINS CONNUES .....	21
1.2.1 <i>Galectine-10</i> .....	21
1.2.2 <i>Galectine-12</i> .....	22
1.2.3 <i>Galectine-13</i> .....	23
1.2.4 <i>Galectine-16</i> .....	24
1.3 LA GALECTINE-14 .....	25
1.3.1 <i>Caractéristiques des gènes et des protéines</i> .....	25
1.3.2 <i>Structure protéique</i> .....	29
1.3.3 <i>Localisation et profils d'expression de la galectine-14</i> .....	31
1.3.4 <i>Fonctions et associations physiopathologiques</i> .....	34
CHAPITRE 2 .....	37
CHAPITRE 3 .....	66

3.1 SOMMAIRE DES RÉSULTATS .....	67
3.2 NOUVEAUX APERÇUS SUR LA GALECTINE-14 .....	67
3.2.1 <i>Expression de la galectine-14 dans les tissus normaux</i> .....	67
3.2.2 <i>Anticorps contre la galectine-14</i> .....	68
3.2.3 <i>Galectine-14 recombinante</i> .....	69
3.2.4 <i>Galectine-14 dans le cancer</i> .....	71
3.3 EXPRESSION DANS LE CANCER DE L'OVAIRE .....	72
3.4 POTENTIEL APOPTOTIQUE DE LA GALECTINE-14 .....	74
3.5 PROCHAINES ÉTAPES ET PERSPECTIVES .....	75
<b>CHAPITRE 4 .....</b>	<b>78</b>
<b>RÉFÉRENCES .....</b>	<b>80</b>

## **LISTE DES TABLEAUX**

TABLEAU 1.1 DISTRIBUTION PRÉDOMINANTE DES GALECTINES .....	10
TABLEAU 2.1 OVARIAN CANCER CELL LINES .....	65

## LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1 LES TROIS SOUS-FAMILLES DES GALECTINES .....	5
FIGURE 1.2 RÉSEAU DE GALECTINE HUMAINE, CLASSIFICATION ET RELATIONS PHYLOGÉNÉTIQUES SELON LES TYPES DE CRD .....	6
FIGURE 1.3 LES TROIS TYPES DE GALECTINES ET LEURS INTERACTIONS AVEC LES GLYCOCONJUGUÉS .....	7
FIGURE 1.4 LES DIVERS PARTENAIRES DE LIAISON INTRACELLULAIRE DE CERTAINES GALECTINES .....	12
FIGURE 1.5 FONCTIONS PRO ET ANTI-TUMORALES DES GALECTINES DANS LES CELLULES CANCÉREUSES .....	18
FIGURE 1.6 EXPRESSION DE LA GALECTINE (ÉLEVÉE/FAIBLE) DANS DIVERS TYPES DE CANCER AU SEIN DE DIFFÉRENTS SYSTÈMES PHYSIOLOGIQUES .....	20
FIGURE 1.7 VISUALISATION 3D DE LA GALECTINE-16 .....	24
FIGURE 1.8 GÉNOME DE CERTAINS DES GÈNES IMPRIMÉS ET EXPRIMÉS DE FAÇON MONOALLÉLIQUE DANS LE PLACENTA HUMAIN .....	26
FIGURE 1.9 PREMIER ALIGNEMENT DES SÉQUENCES D'ACIDES AMINÉS PUTATIFS DU PPL 13 AVEC LES GALECTINES PROTOTYPIQUES CONNUES .....	27
FIGURE 1.10 ALIGNEMENT DE SÉQUENCES MULTIPLES DE GALECTINES HUMAINES .	28
FIGURE 1.11 SUPERPOSITION DE STRUCTURES DE GALECTINES HUMAINES CONSERVÉES .....	30
FIGURE 1.12 MODÈLES BASÉS SUR L'HOMOLOGIE DES GALECTINES LES PLUS RÉCENTES .....	31
FIGURE 1.13 LE PROFIL D'EXPRESSION GÉNÉTIQUE D'UN PANEL D'ADNC DE 48 TISSUS HUMAINS .....	32
FIGURE 1.14 L'EXPRESSION DES GALECTINES DU CLUSTER CHR19 DANS L'INTERFACE MÈRE-FOETUS .....	33
FIGURE 2.1 EXPRESSION OF LGALS14 IN NORMAL HUMAN TISSUES .....	52
FIGURE 2.2 LGALS14 EXPRESSION IN CANCER TISSUES AND CELL LINES .....	53
FIGURE 2.3 EXPRESSION OF LGALS14 IN HUMAN OVARIAN CANCER CELL LINES .....	54
FIGURE 2.4 KAPLAN-MEIER SURVIVAL ANALYSIS .....	55
FIGURE 2.5 EXPRESSION OF LGALS14 IN OVARIAN CANCER SIGNIFICANTLY HIGHER THAN EXPRESSION IN NORMAL OVARIAN EPITHELIAL CELLS .....	56
FIGURE 2.6 GENOMIC ALTERATIONS IN GALECTIN GENES IN OVARIAN CANCER .....	57

FIGURE 2.7 GALECTIN-14 EXPRESSION IN OVARIAN CANCER CELL LINES ..... 58

FIGURE 2.8 PARP-1 EXPRESSION IN HEK-293 TRANSFECTANTS ..... 59

FIGURE S2.1 *LGALS14* ALTERATIONS IN CANCER ..... 61

FIGURE S2.2 OVERALL SURVIVAL OF OVARIAN CANCER PATIENTS ACCORDING TO THE PRESENCE OF GENETIC ALTERATIONS IN *LGALS14* ..... 62

FIGURE S2.3 VALIDATION OF AMPLICONS USING GAL-14-SPECIFIC PRIMERS ..... 63

FIGURE S2.4 CELL PROLIFERATION FOLLOWING *DE NOVO* EXPRESSION OF *LGALS14* ..... 64

..... 64

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ARNm	Acide ribonucléique messager
ASF	Asialofetuin
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CEO	Cancer épithélial de l'ovaire
CLC	Charcot-Leyden Crystal
CRD	Carbohydrate recognition domain (domaine de reconnaissance aux glucides)
Chr	Chromosome
ECM	Matrice extracellulaire
EST	Expressed sequence tag (séquences exprimées)
EVT	Extravascular trophoblast (trophoblaste extravasculaire)
Gal	Galectine
HCC	Cellules d'hépatocarcinome
IFN $\gamma$	Interferon gamma
JNK	Kinases c-Jun N-terminales
LacNAc	<i>N</i> -acetyllactosamine
PARP-1	Poly [ADP-ribose] polymerase 1
PP13	Protéine placentaire 13
PPL13	Placental Protein 13-like
SHG	Sérum de haut grade
Treg	Regulatory T cell (cellules T régulatrices)

# **CHAPITRE 1**

## **REVUE DE LITTÉRATURE**

## 1.1 LES GALECTINES

Les galectines sont des petites protéines solubles de faible masse moléculaire faisant partie d'une famille de lectines animales ayant une affinité pour les  $\beta$ -galactosides. Cette liaison à ces sucres, qui sont des glucides contenant un galactose, se fait par l'intermédiaire de leur domaine de reconnaissance des glucides (*carbohydrate recognition domain*, CRD) (Barondes *et al.*, 1994b). À ce jour, dix-neuf galectines ont été identifiées chez les mammifères. Certaines d'entre elles, comme la galectine-1 et la galectine-3, ont été bien caractérisées, tandis que d'autres sont à peine connues (Cummings *et al.*, 2017). En général, les galectines jouent un rôle important dans un large éventail de processus physiologiques et de fonctions cellulaires, tels que le développement embryonnaire, l'apoptose, la migration cellulaire, l'adhésion intercellulaire et la croissance cellulaire (Elola *et al.*, 2007). Elles sont également impliquées dans la régulation de la réponse immunitaire et dans certaines conditions pathologiques telles que l'inflammation, le développement et la progression des tumeurs (M. K. Kim *et al.*, 2011). En fait, les galectines sont principalement considérées comme des régulateurs négatifs de la réponse anti-tumorale en induisant la mort des cellules immunitaires, créant ainsi une immunosuppression locale et systémique. Elles ont aussi la capacité de se fixer à la surface des cellules cancéreuses pour former des treillis qui modulent l'expression des récepteurs des facteurs de croissance ou de facteurs qui induisent la motilité cellulaire (Cedeno-Laurent *et al.*, 2012). Par conséquent, ces protéines facilitent l'évasion immunitaire des tumeurs et augmentent les propriétés invasives des cellules cancéreuses (Labrie *et al.*, 2014).

### 1.1.1. Galectines: Contexte historique

La découverte des premières galectines s'est faite dans le cadre d'une recherche de protéines capables de reconnaître des structures oligosaccharidiques exprimées à la surface des cellules (Barondes *et al.*, 1976, Chang *et al.*, 1975). Cette recherche était basée sur l'hypothèse que les récepteurs glycosylés à la surface cellulaire pourraient jouer un rôle dans l'adhésion cellule-cellule ou cellule-matrice par le biais d'interactions protéines-glycoconjugués (Barondes, 1997). À l'époque, même si la compréhension des associations moléculaires et des principes de reconnaissance cellulaire était limitée, plusieurs d'études avaient mis en évidence la présence de macromolécules contenant des glucides à la périphérie des cellules, suggérant leur implication dans les processus de division cellulaire et de reconnaissance cellulaire par divers mécanismes (Bennett *et al.*, 1977, Danielli *et al.*, 2016, Gahmberg *et al.*, 1976, Ito, 1974,

Rambourg, 1971). Par exemple, un mécanisme suggéré était l'association entre un récepteur d'oligosaccharide sur la membrane d'une cellule et une protéine spécifique de ce récepteur à la surface d'une autre cellule (Barondes *et al.*, 1976).

Le chemin qui a mené à la découverte des galectines a commencé avec la recherche sur les lectines de graines de plantes, puis la découverte des hémagglutinines dans les extraits de cerveau et l'étude des lectines de moisissure gluante, en utilisant le système modèle *Dictyostelium discoideum*. Ces recherches ont atteint leur apogée avec la découverte de "l'électrolectine", une lectine de liaison  $\beta$ -galactoside trouvée dans les extraits de tissus solubles de l'anguille électrique (Barondes, 1997, Kilpatrick, 2002, Rosen *et al.*, 1973, Teichberg *et al.*, 1975). L'identification de l'électroélectine a incité les scientifiques à rechercher et à purifier des lectines apparentées provenant d'autres tissus de vertébrés et, par conséquent, d'autres lectines spécifiques du  $\beta$ -galactose, telles que la galectine-1 et la galectine-3.

Un détail intéressant dans le récit historique des galectines est le fait que la première galectine observée n'était pas la galectine-1, mais une protéine cristalline détectée il y a plus de 160 ans. Les auteurs de cette découverte étaient les scientifiques Charcot, Robin et Leyden qui ont observé et décrit des structures bi-pyramidales hexagonales microscopiques, appelées cristaux de Charcot-Leyden (CLC), présentes dans les tissus pathologiques et dans les expectorations d'individus asthmatiques (Gleich *et al.*, 1976, Sakula, 1986). La recherche subséquente et plus récente de ces protéines a permis d'élucider leur structure moléculaire et de mettre en évidence des similitudes avec certains membres de la famille des galectines, notamment au niveau de l'homologie des séquences d'acides aminés et une certaine affinité, bien que faible, pour les glucides contenant de la galactosamine, ce qui a abouti à leur désignation comme étant la galectine-10 (Steven J. Ackerman *et al.*, 2002, Dyer *et al.*, 1997, Leonidas *et al.*, 1995).

Les galectines ont d'abord été reconnues comme lectines spécifiques du lactose, ou plus spécifiquement comme " *$\beta$ -galactoside-binding lectins*", un groupe de protéines solubles largement présentes dans les extraits de tissus vertébrés et dont l'activité pourrait être inhibée par le lactose, le galactose ou des glucides apparentés, comme la *N*-acétylgalactosamine (Cooper *et al.*, 1999, Kilpatrick, 2002, Varki *et al.*, 1999). La découverte d'autres protéines similaires, avec des séquences d'acides aminés apparentées ayant une affinité pour les  $\beta$ -galactosides a conduit à leur classification comme des lectines de type "S", l'une des familles structurales des lectines animales (Varki *et al.*, 1999). Cette terminologie a placé ces protéines dans un groupe distinct limité aux lectines caractérisées par leur solubilité, la présence de

résidus libres de cystéine et leur dépendance aux sulfhydriles pour leur activité de liaison aux glucides (Cummings *et al.*, 2017, Drickamer, 1988).

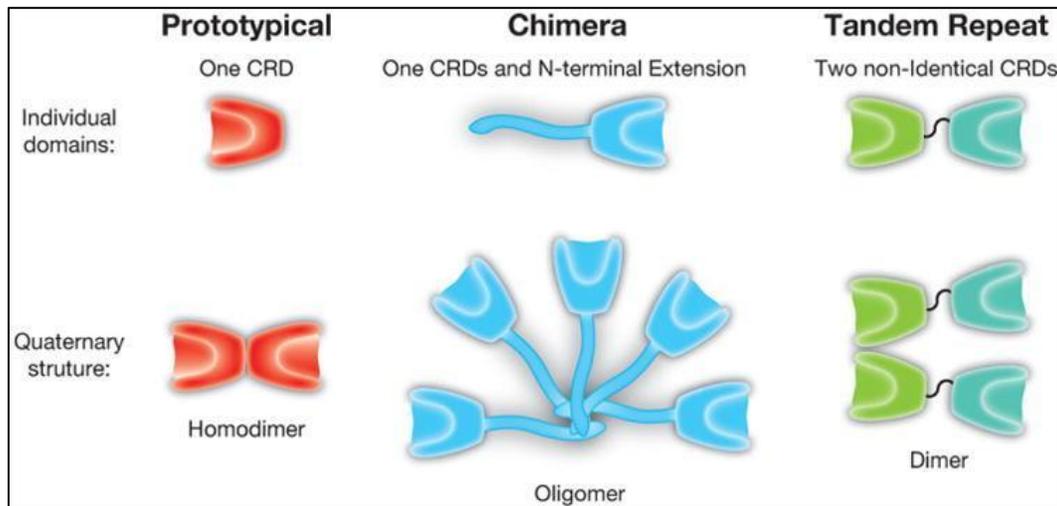
Au début des années 90, les progrès scientifiques et technologiques ont permis le clonage, le séquençage et la production des formes recombinantes de lectines de type "S", ce qui a conduit à d'autres découvertes, à une meilleure compréhension des caractéristiques de ce groupe de protéines et à la détermination de leur structure par cristallographie (Gitt *et al.*, 1986, Lobsanov *et al.*, 1993). Par conséquent, en 1994, lorsqu'un total de quatre membres de la famille des lectines de type "S" ont été séquencés et caractérisés, la désignation "type S" s'est avérée obsolète et le nom "galectine" a été formellement proposé et adopté (Barondes, 1997, Barondes *et al.*, 1994a). En plus de la nouvelle nomenclature, il a été établi que les deux critères d'appartenance à la famille des galectines seraient dorénavant basés sur l'affinité pour les  $\beta$ -galactosides et une certaine homologie de séquence dans le site de liaison des glucides (CRD) (Barondes *et al.*, 1994a, Hakon Leffler *et al.*, 2004, Lobsanov *et al.*, 1993). Ainsi, ces recherches ont marqué la systématisation de la nomenclature et du profil de la famille des galectines de mammifères, ce qui a permis d'organiser et d'identifier les membres de cette famille tels que nous les connaissons aujourd'hui.

## **1.1.2. Famille des galectines: Classification, structure et caractéristiques générales**

### **1.1.2.1. Classification des galectines**

La systématisation de la famille des galectines a permis d'organiser et de distinguer le nombre croissant et la variété des galectines découvertes. Par conséquent, chaque galectine individuelle de mammifère alors connue a été nommée par numérotation consécutive, et cette désignation de numérotation séquentielle se poursuit au fur et à mesure que de nouvelles galectines sont découvertes (Barondes *et al.*, 1994b). À ce jour, les galectines numérotées identifiées chez les mammifères ont atteint le nombre de vingt, dont treize chez l'homme (Nandor Gabor Than *et al.*, 2015). Toutes ces galectines partagent une séquence centrale d'environ 130 acides aminés conservés et responsables de leur activité de liaison aux glucides (Cooper *et al.*, 1999). Cette séquence conservée est connue sous le nom de *Carbohydrate Recognition Domain* (CRD) et chaque membre de la famille des galectines en possède au moins un (Hakon Leffler *et al.*, 2004). En fonction du contenu, de l'organisation et de la quantité

de CRDs, les galectines sont classées en trois sous-familles ou groupes : Prototype, Répétition en tandem (RT) et Chimère (voir figure 1.1) (Kamili *et al.*, 2016).

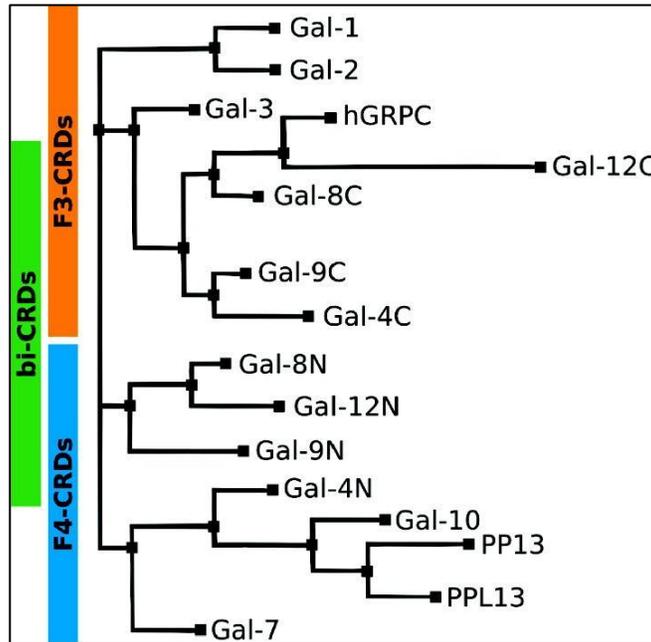


**Figure 1.1: Les trois sous-familles des galectines. Adaptation de (Kamili *et al.*, 2016)**

La sous-famille Prototype est représentée par des galectines de petite taille (galectine-1, -2, -5, -7, -10, -13, -14, -15, -16, -17, -19, -20) d'environ 15,000 Da, qui contiennent un seul CRD et existent comme monomères ou homodimères non covalents avec des domaines identiques (Kasai *et al.*, 1996, N. Rubinstein *et al.*, 2004b). Les membres du groupe de Répétition en tandem (galectine-4, -6, -8, -9, -9, -12) contiennent deux CRD distincts dans la même chaîne polypeptidique et reliés par une région de liaison composée d'environ 70 acides aminés. Les CRD peuvent présenter différentes affinités de liaison aux glucides, ce qui permet à la protéine de s'engager dans une activité de liaison multivalente (Fred Brewer, 2002). Enfin, le représentant exclusif du groupe Chimère (galectine-3) a été trouvé principalement chez les mammifères, a une masse moléculaire entre 30,000-35,000 Da, et présente une architecture biochimique inhabituelle: un CRD carboxy-terminal lié à un domaine N-terminal riche en résidus proline et glycine responsable de l'oligomérisation de cette protéine (Kasai *et al.*, 1996, Hakon Leffler *et al.*, 2004, Fu-Tong Liu *et al.*, 2002, G. A. Rabinovich, 1999).

Un autre système de classification a été proposé en 2004 et est basé sur une analyse phylogénétique de la famille des galectines, tenant ainsi compte de l'histoire évolutive et des relations entre les membres de la famille (Houzelstein *et al.*, 2004). À travers des comparaisons de séquences de gènes de galectines, la construction d'arbres phylogénétiques et l'analyse de l'organisation des exon-intron, Houzelstein et son équipe ont découvert que tous les CRD trouvés dans les galectines vertébrées sont codés par trois exons et que le deuxième exon,

responsable du codage des acides aminés du site de liaison des glucides, a deux sous-types distincts, distingués selon la position de l'intron 3', sur le  $\beta$ -strand F3 ou F4 (Houzelstein *et al.*, 2004).



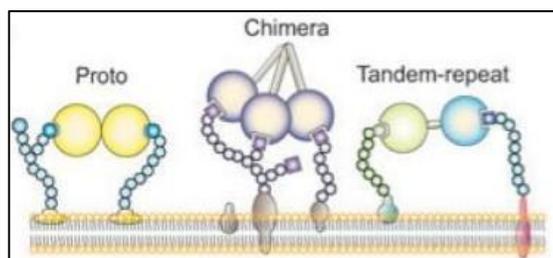
**Figure 1.2: Réseau de galectine humaine, classification et relations phylogénétiques selon les types de CRD. Adaptation de (Guardia *et al.*, 2011)**

Ces résultats suggèrent que tous les CRD des galectines chordés proviennent d'une galectine ancestrale ne contenant qu'un seul CRD dans sa structure, et la duplication de ce gène de galectine mono-CRD aurait mené à l'apparition d'un premier gène de galectine bi-CRD (Houzelstein *et al.*, 2004, Vasta, 2012). Ainsi, il a été proposé une classification des galectines en deux groupes : F3 et F4 (voir figure 1.2). Toutes les galectines mono-CRD chez les vertébrés appartiennent aux groupes F3 (galectine-1, -2, -3, -5) ou F4 (galectine-7, -10, -13, -14), tandis que les galectines bi-CRD, ou type RT, contiennent à la fois les sous-types de CRD F3 et F4 (Guardia *et al.*, 2011, Vasta *et al.*, 2012).

### 1.1.2.2. Architecture des galectines et leur comportement fonctionnel

L'architecture moléculaire des membres de chaque sous-famille des galectines a une influence sur leur comportement fonctionnel. Les galectines prototypes, comme mentionné précédemment, peuvent former des homodimères divalents et cette propriété leur permet de

réticuler deux glycoconjugués similaires (Kasai *et al.*, 1996). Des études sur la galectine-1 de la rate de veau ont démontré la liaison unique de cette galectine avec l'asialie fétuine (ASF), une glycoprotéine monomère qui possède des épitopes LacNAc, segments de protéines composés de disaccharides constitués de galactose et d'unités de *N*-acétyl-glucose (Mandal *et al.*, 1992). Les résultats obtenus indiquent que l'interaction entre la galectine-1 et l'ASF se traduit par la formation de complexes réticulés homogènes, même lorsqu'ils sont mélangés à d'autres molécules (Fred Brewer, 2002). Les galectines de type "répétition en tandem" ont deux CRD homologues partageant seulement 40 % d'identité de séquence. La spécificité et la force de liaison des deux sites de liaison des glucides sont très différentes, montrant même une préférence pour différents groupes de ligands (Cao *et al.*, 2016). Ce comportement a été observé et signalé lorsque les premières galectines de type répétition en tandem, connues sous le nom de lectines S-Lac, ont été isolées et identifiées (H. Leffler *et al.*, 1989, Oda *et al.*, 1993). Il a été observé que ces protéines, avec "deux domaines homologues mais distincts", présentent une spécificité différente pour chaque CRD et, par conséquent, elles peuvent former des ponts entre divers types de glycoconjugués (Bum-Erdene *et al.*, 2016, Kasai *et al.*, 1996, Oda *et al.*, 1993). Contrairement aux autres, les galectines de type Chimère ont une structure combinée qui leur permet d'oligomériser et d'interagir avec diverses biomolécules autres que les sucres (Ri-Yao Yang *et al.*, 2008). Ces protéines peuvent s'associer via leur domaine N-terminal, former des pentamères et agir comme des réticulations entre les glycanes et différents types de molécules, affichant ainsi une coopérativité de liaison (voir figure 1.3) (Vasta, 2012). Tout bien considéré, les galectines des trois groupes (prototype, tandem-répétition et chimère) ont une nature multivalente qui leur permet d'oligomériser et de cibler une vaste gamme de glycoconjugués, ce qui favorise la réticulation du glycan, une caractéristique importante pour les événements de signalisation cellulaire transmembranaire, les processus de reconnaissance à médiation par la galectine et la modulation des réponses immunitaires (Hernandez *et al.*, 2002, Vasta, 2012, Ri-Yao Yang *et al.*, 2008).



**Figure 1.3: Les trois types de galectines et leurs interactions avec les glycoconjugués. Adaptation de (Vasta *et al.*, 2012)**

### 1.1.2.3. Conception structurale et propriétés moléculaires

L'analyse cristallographique de plusieurs membres de la famille des galectines a révélé la topologie de ces protéines, ce qui permet de mieux comprendre non seulement la structure des galectines, mais aussi les aspects structurels des interactions galectine-glycane (Di Lella *et al.*, 2011). Les galectines sont définies par un domaine commun de reconnaissance des glucides, par conséquent, la compréhension de la conception globale du CRD est la première étape pour comprendre la structure et les propriétés des membres individuels de la famille des galectines humaines (Thiemann *et al.*, 2016). La structure globale des CRDs des galectines comprend environ 135-140 résidus d'acides aminés disposés en cinq ou six feuillets anti-parallèles  $\beta$  qui se replient pour former un domaine globulaire compact connu sous le nom de structure de type *jelly-roll* ou  *$\beta$ -sandwich*, qui est une topologie particulière que l'on trouve fréquemment dans les complexes protéiques (Barondes *et al.*, 1994b, Varki *et al.*, 1999). Cette topologie  $\beta$ -sandwich présente un côté concave et un côté convexe, chacun formé par six brins (S1-S6) et cinq brins (F1-F5), respectivement. Le côté concave crée une "poche", ou rainure, dans laquelle les ligands glucidiques se lient, et dont la longueur est suffisante pour permettre la liaison d'un tétrasaccharide linéaire (Guardia *et al.*, 2011, Hakon Leffler *et al.*, 2004).

La dimérisation des galectines mono-CRD, comme les galectines-1, -2 et -7, donnera des protéines dimériques où les sous-unités CRDs sont reliées par un double axe de rotation perpendiculaire au plan des feuillets antiparallèles  $\beta$  (Cummings *et al.*, 2017). L'interface dimérique varie toutefois d'une galectine à l'autre selon une signature bien distincte (Dube-Delarosbil *et al.*, 2018). Dans le cas de la galectine-1, la dynamique de dimérisation résulte à une structure où les centres des CRDs sont situés à 50 Å l'un de l'autre, ce qui a une influence sur la liaison de glycanes distincts et la formation de réseaux de glycoprotéines, affectant les réponses cellulaires et les interactions microbiennes-hôtes (Garner *et al.*, 2015).

En fait, on ne peut nier la pertinence de comprendre la structure quaternaire compacte et l'organisation du domaine singulier des membres de la famille des galectines. Cependant, malgré leur structure globale unique, les CRDs des galectines partagent fondamentalement une affinité pour les résidus  $\beta$ -galactosides et le LacNAc, ce qui suggère la présence d'un assortiment d'acides aminés clés conservés au sein de la structure du CRD, une région connue sous le nom de site de liaison aux glucides (*carbohydrate binding site*, CBS) (Kamili *et al.*, 2016). Le CBS est responsable des spécificités de liaison des glucides dans la famille des galectines et il a été schématiquement décrit comme ayant cinq sous-sites (A-E), les sous-sites C et D étant les sites centraux où la liaison des résidus de galactose se produit (Jun Hirabayashi

*et al.*, 2002, Hakon Leffler *et al.*, 2004). Les sous-sites A et B sont capables de lier les saccharides, tels que le LacNAc, ainsi que d'autres groupes, tels que les sulfates, et sont donc considérés comme l'une des principales sources de variation de la spécificité de liaison des galectines (Hakon Leffler *et al.*, 2004). Ainsi, la compréhension de l'architecture de cette région contribue à l'étude et à la détermination des spécificités de liaison des galectines, ce qui conduit finalement à une compréhension de leurs fonctions et interactions biologiques (Brewer, 2002).

### 1.1.3. Expression et Distribution

Chez les vertébrés, les galectines sont présentes dans une variété de tissus et dans presque tous les types de cellules. L'expression des galectines va de la peau au placenta, y compris les lignées cellulaires établies et les cellules tumorales (Kasai *et al.*, 1996). La galectine la plus étudiée, la galectine-1, est connue pour être largement exprimée par divers types de cellules, comme les cellules endothéliales vasculaires, les cellules des organes lymphoïdes primaires et secondaires, les cellules T régulatrices (Treg) et de nombreux autres types de cellules, en particulier les cellules du système immunitaire (Arthur *et al.*, 2015, Di Lella *et al.*, 2011, Thiemann *et al.*, 2011). La galectine-3, une autre galectine largement documentée, est exprimée dans une variété de tissus et de cellules humaines, comme les monocytes sanguins périphériques, les macrophages activés, les mastocytes, les lymphocytes T, certaines cellules épithéliales et les neurones sensoriels (Dumic *et al.*, 2006, F. T. Liu *et al.*, 1995, Wang *et al.*, 2016). Nous savons peu de choses sur la galectine-4, -5 et -6, mais des études ont rapporté que la galectine-4 et la galectine-6 sont principalement exprimées dans les cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal de l'embryon et du rat adulte, tandis que la galectine-5 a été détectée dans les érythrocytes de rat (Gitt *et al.*, 1998, Gitt *et al.*, 1995). La galectine-7 est largement exprimée dans les cellules épithéliales normales, principalement dans l'épithélium pavimenteux stratifié, et elle est considérée comme un marqueur de différenciation épithéliale (Labrie *et al.*, 2014, Madsen *et al.*, 1995). Les deux galectines tandem-répétition, galectine-8 et -9, sont exprimées dans les cellules endothéliales vasculaires et lymphatiques, et dans le thymus, respectivement (John *et al.*, 2016, Troncoso *et al.*, 2014). La protéine Cristal Charcot-Leyden, ou galectine-10, est abondamment exprimée dans la moelle osseuse, lieu de naissance des cellules immunitaires, et se trouve dans les neutrophiles, les éosinophiles, les cellules T régulatrices CD25-positives (CD25 Treg), étant ainsi exprimée uniquement par les cellules du système immunitaire (Di Lella *et al.*, 2011, Kubach *et al.*, 2007, N. G. Than *et al.*, 2009). Des études démontrent que la galectine-12 est principalement exprimée, tant chez la souris que

chez l'homme, dans les adipocytes, mais on la trouve aussi dans les cellules myéloïdes (Ri-Yao Yang *et al.*, 2012, R. Y. Yang *et al.*, 2001b). Enfin, la galectine-13, -14 et -16 sont fortement exprimés dans le placenta (voir tableau 1.1) (Fritz *et al.*, 2015, N. G. Than *et al.*, 2009).

L'expression et la distribution des galectines varient en fonction du tissu, du type de cellule, de la période de développement et des conditions pathologiques. Cependant, il semble exister une constante lorsqu'il s'agit de l'expression des galectines: les cellules du système immunitaire inné sont généralement riches en galectines. Les basophiles, l'éosinophiles et d'autres cellules immunitaires n'expriment pas seulement une, mais plusieurs types de galectines en même temps (Thiemann *et al.*, 2016). Par exemple, les neutrophiles expriment la galectine-1, -3, -9 et -10 et ces protéines sont impliquées dans une variété de fonctions cellulaires, telles que l'activation, l'adhésion et la migration cellulaire (Elola *et al.*, 2007, Gabriel A. Rabinovich *et al.*, 2009, Sato *et al.*, 2009).

**Tableau 1.1: Distribution prédominante des galectines. Adaptation de (Chiariotti *et al.*, 2002).**

Galectines	Distribution
Gal-1	La plupart des tissus : squelettique, musculaire, cardiaque, placentaire, lymphatique, etc.
Gal-2, -4, -6	Tractus gastrointestinal
Gal-3	Macrophages, épithélium, tractus reproductif
Gal-5	Blastocyste à l'implantation, réticulocytes, érythrocytes
Gal-7	Épithélium
Gal-8	Foie, rein, muscle cardiaque, poumon, cerveau, cerveau, côlon
Gal-9	Éosinophiles, monocytes, macrophages, naevus mélanocytiques, tractus gastro-intestinal
Gal-10	Eosinophiles, basophiles
Gal-12	Adipocytes, cellules myéloïdes
Gal-13, -14, -16	Placenta

#### 1.1.4. Activités biologiques et fonctions des galectines

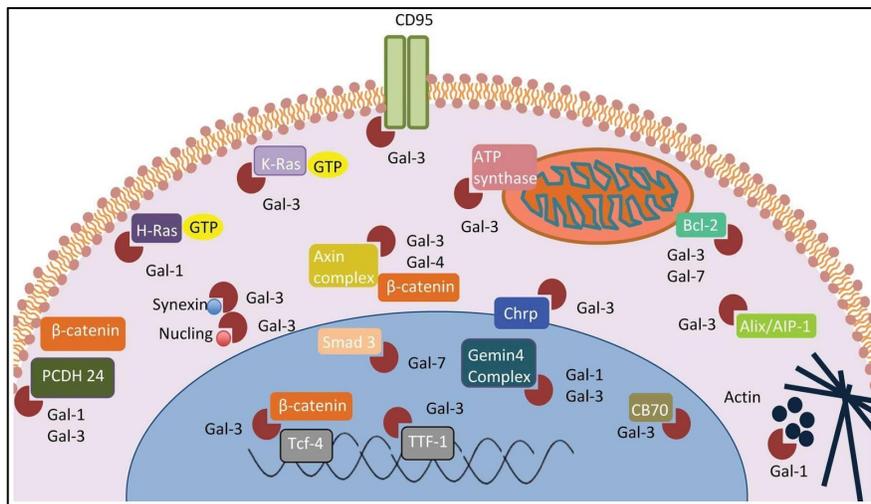
Contrairement au rôle moléculaire des galectines, qui consiste "simplement" à lier les chaînes glucidiques contenant des  $\beta$ -galactosides, leurs fonctions physiologiques sont plus complexes et impliquent de nombreux processus biologiques. Les fonctions biologiques de ces protéines peuvent varier en fonction de nombreux facteurs, tels que le site, le temps, le stade de développement, la présence d'agrégats divalents ou multivalents, la disponibilité de ligands appropriés, etc (Barondes *et al.*, 1994b, Kasai *et al.*, 1996, Vasta, 2012). La littérature mentionne que les galectines présentent une combinaison d'activités intra- et extra-cellulaires. La plupart d'entre elles peuvent réaliser les deux types d'activités comme la galectine-3, dont les activités biologiques peuvent aller de la régulation de l'épissage de l'ARN à l'intérieur du noyau à la régulation de l'adhésion cellulaire et à la signalisation cellulaire dans l'environnement extracellulaire (Hsu *et al.*, 2002, Ochieng *et al.*, 2002, Patterson *et al.*, 2002). Des études réalisées *in vitro*, et appuyées par des expériences *in vivo*, ont permis d'observer le comportement et les activités des galectines et, sur la base des résultats obtenus, de nombreuses fonctions biologiques intra- et extracellulaires des galectines ont été proposées (Almkvist *et al.*, 2002, Gabriel A. Rabinovich *et al.*, 2002b).

##### 1.1.4.1. Fonctions intracellulaires

Les galectines sont synthétisées par des ribosomes cytoplasmiques libres et, une fois libérées dans le milieu intracellulaire, elles peuvent demeurer dans le cytosol ou être sécrétées dans l'environnement extracellulaire par une voie de sécrétion non classique (Elola *et al.*, 2007, Wilson *et al.*, 1989). Bien qu'elles puissent se retrouver à l'extérieur des cellules, les galectines sont présentes principalement dans le cytoplasme, mais aussi dans le noyau, où elles peuvent être trouvées sous certaines conditions (Ri-Yao Yang *et al.*, 2008). Dans le cytosol, elles agissent souvent indépendamment de leur activité de liaison aux glucides, en s'engageant dans des interactions protéine-protéine, en se liant à une grande diversité de ligands cytoplasmiques, en participant aux voies de signalisation intracellulaire et en régulant les événements cytosoliques et nucléaires (voir figure 1.4) (Fu-Tong Liu *et al.*, 2002, Thiemann *et al.*, 2016, Vladoiu *et al.*, 2014).

La plupart des informations sur le rôle intracellulaire des galectines a été obtenue grâce à des travaux de recherche sur la galectine-3. Par exemple, la galectine-3 cytosolique peut se lier à la  $\beta$ -caténine, une protéine impliquée dans la régulation de l'adhésion cellulaire et de la

transcription des gènes, pour faciliter la régulation de la voie de signalisation Wnt, qui régule des aspects essentiels du sort cellulaire, de la polarité cellulaire, de la migration cellulaire et de l'organogenèse au cours du développement embryonnaire (Shimura *et al.*, 2004). La galectine-3 semble également moduler les voies de signalisation impliquant K-Ras-GTP, TRAIL, Fas, Bcl-2, entre autres facteurs (Lee *et al.*, 2003, R. Y. Yang *et al.*, 1996). De plus, la galectine-3 endogène joue un rôle dans la régulation de la croissance et de la prolifération cellulaire. Des études ont démontré qu'un certain type de cellules cancéreuses du sein humain présentait une réduction de la prolifération cellulaire après transfection avec une séquence antisense de la galectine-3; dans d'autres études, l'inhibition de l'expression de la galectine-3 dans les lymphocytes T a rendu les cellules moins sensibles aux stimuli mitogènes, ce qui suggère une implication de la galectine-3 dans la prolifération des cellules T activées (Joo *et al.*, 2001, Fu-Tong Liu *et al.*, 2002). La prolifération cellulaire est également affectée par la présence de galectine-12, ce qui a été observé lors d'expériences de transfection de gènes. Une étude réalisée avec des cellules HeLa a révélé qu'après transfection avec le gène codant pour la galectine-12, la prolifération cellulaire a considérablement diminuée et, à la fin de l'expérience, le nombre total de transfectants était 1/6 celui du contrôle (R. Y. Yang *et al.*, 2001b). La galectine-12 est également associée à la régulation de la lipolyse et de la sensibilité à l'insuline, ce qui résulte de leur présence dans les gouttelettes lipidiques des adipocytes (Ri-Yao Yang *et al.*, 2012).



**Figure 1.4: Les divers partenaires de liaison intracellulaire de certaines galectines. Adaptation de (Vladoiu *et al.*, 2014)**

De nombreuses galectines endogènes jouent également un rôle dans le contrôle et la régulation du cycle cellulaire. En fait, il est suggéré une corrélation possible entre l'effet de certaines galectines dans la régulation du cycle cellulaire. Cette corrélation a été documentée par des expériences avec la galectine-3, où des cellules épithéliales humaines transfectées surexprimant la galectine-3 ont subi un arrêt en G1 sans mort cellulaire détectable en réponse à la perte d'adhérence cellulaire (H. R. Kim *et al.*, 1999). Selon certaines études, la galectine-1 prototype est un régulateur endogène du contrôle de la prolifération des lymphocytes T par l'activation des caspases (Kaltner *et al.*, 2017).

Dans le milieu intracellulaire, les galectines se trouvent également dans le noyau, où elles participent à des processus fondamentaux tels que l'épissage pré-ARNm. L'épissage pré-ARNm est un mécanisme biologique responsable de l'édition de la transcription de l'ARN messager précurseur (pré-ARNm) en un ARN messager mature (ARNm), de sorte que la molécule d'ARNm peut être correctement traduite en protéine (Faustino *et al.*, 2003). Comme le confirment les expériences menées pour vérifier le rôle des galectines dans ce mécanisme, certaines galectines sont impliquées dans le traitement du pré-ARNm. Les études portant sur l'épuisement des galectines, la reconstitution de l'activité d'épissage biologique et les essais de co-localisation ont fourni une bonne quantité de preuves pour confirmer que la galectine-1 et -3 nucléaire participent à l'activité d'épissage (Dagher *et al.*, 1995, Haudek *et al.*, 2010, Vyakarnam *et al.*, 1997).

#### 1.1.4.2. Fonctions extracellulaires

Comme mentionné ci-dessus, les galectines peuvent soit demeurer là où elles sont synthétisées, dans le cytoplasme, soit sortir de la cellule par une voie de sécrétion non classique. Contrairement à la plupart des protéines, les galectines n'entrent pas dans la voie de sécrétion endoplasmique du réticulum-Golgi (Seelenmeyer *et al.*, 2005). Certains auteurs ont proposé des explications à ce comportement, mais aucun n'a été correctement validé. Une hypothèse suggère que les galectines ne participent pas à la voie sécrétoire classique parce qu'elles perturberaient le trafic de la voie sécrétoire en se liant à de nombreuses glycoprotéines par l'intermédiaire de leurs CRDs (Elola *et al.*, 2007). La manière exacte dont les galectines migrent vers le milieu extracellulaire est encore mal comprise, mais certaines études ont appelé leur voie sécrétoire "sécrétion non classique" ou "sécrétion sans leader", et cela pourrait impliquer deux processus: l'exportation de galectine dans les vésicules ou les exosomes après

leur accumulation dans le cytosol, ou la translocation directe à travers la membrane cellulaire (M. Cho *et al.*, 1995, Elola *et al.*, 2007, Nickel, 2003).

Indépendamment de leur voie sécrétoire, les galectines finissent par trouver leur chemin hors des cellules et atteignent l'espace extracellulaire. Une fois à l'extérieur, les galectines sont principalement situées dans l'environnement de la cellule où elles peuvent se lier aux glycanes présents principalement dans les protéines transmembranaires ou les glycolipides, ou aux glycoprotéines présentes sur la matrice extracellulaire (ECM) autour de la cellule, ce qui dans ce cas peut provoquer l'altération des effets de l'ECM sur les cellules (He *et al.*, 2006b, Hughes, 2001, Ri-Yao Yang *et al.*, 2008). Par exemple, la galectine-1 reconnaît les résidus sur les glycoprotéines de l'ECM, comme la laminine et la fibronectine, et affecte les interactions des cellules avec l'ECM sous-endothélial, causant un effet négatif ou positif selon le type de cellule. Les preuves montrent que la galectine-1 inhibe les interactions myoblastes avec la laminine en bloquant un type d'intégrine, favorisant ainsi le détachement cellulaire; par contre, dans les types cellulaires tels que les mélanocytes, les neurones olfactifs, les cellules de rhabdomyosarcome et les fibroblastes, la galectine-1 favorise l'adhésion cellulaire (G. A. Rabinovich, 1999, Gabriel A. Rabinovich *et al.*, 2002a, Römer *et al.*, 2011). La galectine-3 est également associée aux interactions cellulaires et l'ECM. Il a été démontré que cette lectine se lie aux intégrines présentes dans l'ECM affectant l'adhésion cellulaire aux matrices extracellulaires (Hughes, 2001).

Les galectines bivalentes ou multivalentes permettent la liaison et la réticulation de nombreux glycoconjugués, déclenchant des événements de signalisation transmembranaire et définissant ainsi certaines des fonctions extracellulaires de ces protéines: la modulation de nombreux processus cellulaires tels que la mitose, l'apoptose et la progression du cycle cellulaire (Fu-Tong Liu *et al.*, 2005). La galectine-3 exogène semble induire l'apoptose des cellules T par des mécanismes mal connus impliquant la caspase-3 (Müller *et al.*, 2006). De même, la galectine-2 favoriserait également l'apoptose des cellules T par la liaison aux intégrines  $\beta$ , exprimées à la surface cellulaire, impliquant de nombreux événements et facteurs: caspase-3 et -9, libération du cytochrome C, augmentation du rapport Bax/Bcl-2, entre autres (Sturm *et al.*, 2004). En plus de la modulation des processus cellulaires, des preuves récentes ont démontré que les galectines extracellulaires sont également capables de réguler leur propre expression dans le milieu intracellulaire. Il a été démontré que la galectine-7 extracellulaire contrôle sa propre présence intracellulaire principalement par deux mécanismes différents: en favorisant la transcription du gène de la galectine-7 (*Igals7*) et par leur retour à l'intérieur des cellules par des voies endocytiques mécaniquement distinctes (Bibens-Laulan *et al.*, 2017).

Cette absorption ou capture de la galectine-7 extracellulaire se produit, selon les résultats préliminaires, principalement par l'endocytose à médiation clathrine, qui est une voie majeure responsable de l'internalisation des glycoprotéines présentes à la surface cellulaire des cellules de mammifères (Bibens-Laulan *et al.*, 2017, Grant *et al.*, 2009). De plus, la capacité de réintégrer les cellules n'est pas limitée à la galectine-7. Il existe des preuves expérimentales montrant que d'autres galectines, telles que les galectine-1 et -3 extracellulaires, se retrouvent dans les cellules par les voies endocytaires. La galectine-3, par exemple, pénètre à nouveau dans les cellules épithéliales et dans les macrophages par l'intermédiaire des endosomes précoces, qui sont les premiers compartiments endocytiques à accepter les éléments entrants qui ont été internalisés par la membrane plasmique (Jovic *et al.*, 2010, Lepur *et al.*, 2012, Straube *et al.*, 2013).

#### 1.1.4.3. Apoptose: Modulation des voies de mort cellulaire par les galectines

Parmi la variété des processus cellulaires auxquels les galectines peuvent participer, l'apoptose semble être celle sous le feu des projecteurs. En ce qui concerne les fonctions biologiques des galectines, l'induction de l'apoptose par ces lectines s'avère être le sujet le plus étudié et documenté dans la littérature (Hsu *et al.*, 2006). L'apoptose, ou processus programmé de mort cellulaire, est crucial pour le bon développement des organismes multicellulaires, et est donc considéré comme un élément clé de nombreux processus physiologiques tels que le développement et le fonctionnement du système immunitaire, le développement embryonnaire, le renouvellement des cellules et bien d'autres (Elmore, 2007). Une activité apoptotique inadéquate est une caractéristique typique de nombreux problèmes de santé, y compris les troubles auto-immuns, de nombreux types de cancer et des troubles neurodégénératifs, dans le cas de la mort cellulaire excessive (Thompson, 1995). Il n'est donc pas étonnant que l'implication des galectines dans l'apoptose ait attiré tant d'attention.

Parmi toutes les molécules qui participent à la régulation de la mort cellulaire, les galectines sont considérées comme exceptionnelles en raison de leur capacité à moduler la machinerie de la mort cellulaire à partir des compartiments extracellulaire et intracellulaire. De l'extérieur elles participent à l'initiation des signaux apoptotiques et de l'intérieur elles agissent dans la régulation de la susceptibilité à la mort (Hernandez *et al.*, 2002). De nombreuses galectines participent à la régulation de la mort cellulaire en agissant comme facteur pro-apoptotique, comme la galectine-1, -7, -8, -9 et -12, ou comme agent anti-apoptotique, comme la galectine-3 (Blaser *et al.*, 1998, Fouillit *et al.*, 2000, Hadari *et al.*, 2000, Kuwabara *et al.*, 2002,

R. Y. Yang *et al.*, 1996, R. Y. Yang *et al.*, 2001b). La participation des galectines aux décisions apoptotiques se produit dans une variété de tissus et de types de cellules. Par exemple, la galectine-1 semble reconnaître un ligand de sucre commun sur certains récepteurs présents dans une grande variété de surfaces cellulaires, ce qui explique leur activité pro-apoptotique dans différents types de cellules, y compris les lymphocytes T, les lymphocytes B, et les lignées cellulaires du cancer de la prostate et du sein (Perillo *et al.*, 1997, R. Y. Yang *et al.*, 2003).

L'activité pro-apoptotique des galectines sur les lymphocytes T humains a été largement étudiée. L'apoptose est un mécanisme crucial pour le développement de cellules T appropriées dans le thymus cortex, car elle empêche la production de cellules immunitaires incompetentes et autoréactives (Sprent *et al.*, 2001). La galectine-1 et -9 sont toutes deux produites par les cellules épithéliales thymiques dans le cortex, et toutes deux induisent également l'apoptose des thymocytes (Baum *et al.*, 1995, Perillo *et al.*, 1997, Wada *et al.*, 1997b). De plus, ces galectines sont fortement exprimées par les cellules présentes dans les tissus qui sont envahis par les cellules T au cours d'une réponse immunitaire: tissu endothélial, cellules épithéliales pulmonaires, myocytes et fibroblastes (Perillo *et al.*, 1998, Wada *et al.*, 1997a). Alors que la galectine-1 inhibe la croissance cellulaire et favorise la mort cellulaire au niveau du milieu extracellulaire, la galectine-3 propose le contraire: elle soutient la prolifération cellulaire et prévient l'apoptose des lymphocytes T de l'intérieur de la cellule (R. Y. Yang *et al.*, 1996). Il est intéressant de noter que la susceptibilité des lymphocytes T à l'apoptose induite par les galectines dépend de leur état de différenciation. Selon des études sur la galectine-1, les cellules T humaines dans leurs états activés et prolifératifs sont plus sensibles à l'apoptose induite par la galectine-1 que les cellules T au repos, ou cellules T naïves, qui sont des cellules T matures qui n'ont pas rencontré leur antigène afin de s'activer et d'amorcer une réponse immunitaire (Hernandez *et al.*, 2002, Perillo *et al.*, 1995). En fait, des études plus récentes ont révélé qu'au lieu d'induire la mort cellulaire, la galectine-1 prévient l'apoptose des cellules T naïves. Endharti *et al.* ont démontré que, contrairement à sa fonction sur les cellules T activées, la galectine-1 agit comme un suppresseur de l'apoptose des cellules T au repos, maintenant ainsi la survie de ces cellules par un mécanisme encore inconnu qui inhibe la mort cellulaire (Endharti *et al.*, 2005). De plus, leurs essais de prolifération cellulaire et les résultats de l'analyse du cycle cellulaire ont révélé que la galectine-1 favorise la survie des cellules T naïves sans provoquer la prolifération cellulaire (Endharti *et al.*, 2005). En accord avec ces résultats, une autre étude a démontré que la galectine-1, ainsi que la galectine-8, ont un effet stimulant sur les cellules T au repos sans déclencher la prolifération des cellules T, même lorsque ces protéines sont présentes à des concentrations élevées (Sampson *et al.*, 2016, Tribulatti *et al.*,

2012). Par conséquent, ces comportements moléculaires suggèrent un double rôle de ces galectines qui implique l'amélioration des réponses immunitaires physiologiques et la limitation des réponses exacerbées par un possible effet antiprolifératif (Tribulatti *et al.*, 2012).

### 1.1.5. Les galectines dans le cancer

Les premières preuves de l'implication des galectines dans le cancer ont été rapportées il y a une trentaine d'années et, depuis lors, de nombreuses données sur l'expression de la galectine dans le cancer ont été publiées, la plupart d'entre elles se concentrant sur les galectines les plus étudiées, galectine-1 et galectine-3. L'expression des galectines est modulée et modifiée en fonction de nombreux facteurs, y compris la différenciation des cellules individuelles, la croissance des tissus et des organismes, les conditions physiologiques et pathologiques (Chiariotti *et al.*, 2002). Le cancer est l'une des conditions pathologiques qui altèrent l'expression des galectines et ces altérations pourraient contribuer à des traits communs du cancer tels que la transformation néoplasique, la résistance à l'apoptose, l'angiogenèse et les métastases tumorales (Hanahan *et al.*, 2011). En général, les recherches actuelles ont démontré que ces lectines sont capables de moduler les réponses immunitaires et inflammatoires des cellules tumorales et qu'elles pourraient aussi aider les cellules cancéreuses à échapper à la surveillance du système immunitaire (Fu-Tong Liu *et al.*, 2005).

L'étude des rôles des galectines dans les néoplasmes est entourée de défis en raison de leur rôle complexe. Certains de ces défis sont liés au fait que la même galectine peut avoir des fonctions différentes dans différentes tumeurs, ce qui peut présenter des fonctions opposées dans la progression tumorale (Ebrahim *et al.*, 2014). Selon le type de cancer, les galectines peuvent avoir des propriétés pro- ou anti-tumorales (voir figure 1.5) (Fu-Tong Liu *et al.*, 2005, St-Pierre *et al.*, 2012). L'explication de ce double comportement fait encore l'objet de recherches, mais certains auteurs ont proposé que la diversité des partenaires de liaison des galectines ou la compartimentation intracellulaire des galectines peut avoir un impact sur leur activité biologique en ce qui concerne la progression des cellules tumorales (Califice *et al.*, 2004, Vladioiu *et al.*, 2014). Quelle que soit la raison pour laquelle elles agissent de cette façon, les galectines peuvent agir comme régulateurs négatifs ou positifs en fonction de la phase des processus tumorigènes et métastatiques. Les galectines contribuent à chacune des étapes de ces processus de différentes manières: médiation de la transformation néoplasique par interaction avec les oncogènes (galectine-1 et -3), contrôle de la progression tumorale par médiation du cycle cellulaire (galectine-1, -3 et -12), régulation des événements de mort

cellulaire par induction (galectine-1, -7, -9 et -12) ou inhibition (galectine-3) de l'apoptose des cellules tumorales, médiation de l'adhésion des cellules tumorales pour favoriser le détachement cellulaire et favoriser les métastases, affectant la migration et l'invasion des cellules tumorales (galectine-1, -3 et -8) en engageant les protéines de surface cellulaire (Camby *et al.*, 2002, Elad-Sfadia *et al.*, 2004, Madsen *et al.*, 1995, Nagy *et al.*, 2002, Paz *et al.*, 2001, Ueda *et al.*, 2004, Wada *et al.*, 1997b, R. Y. Yang *et al.*, 1996).

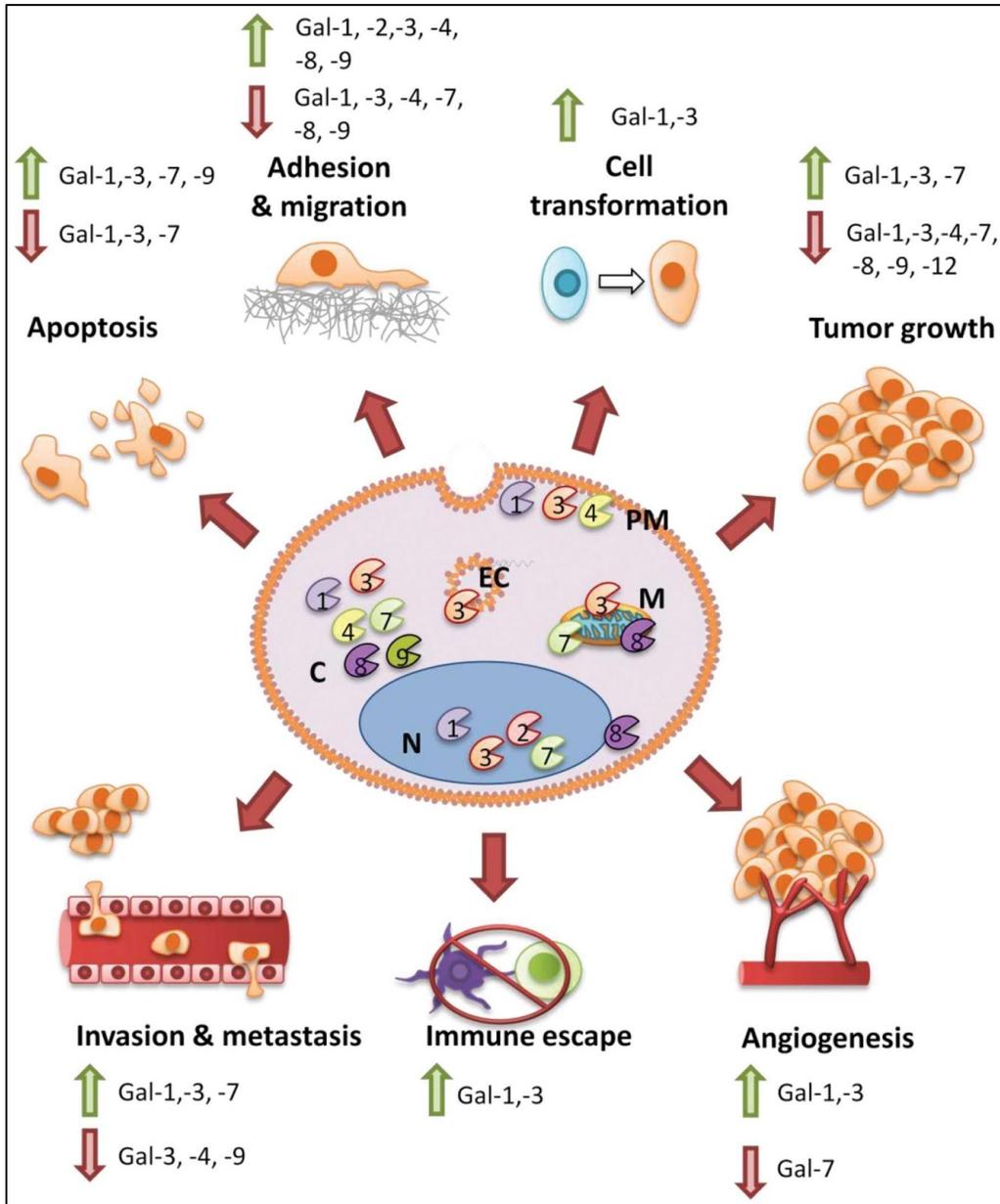
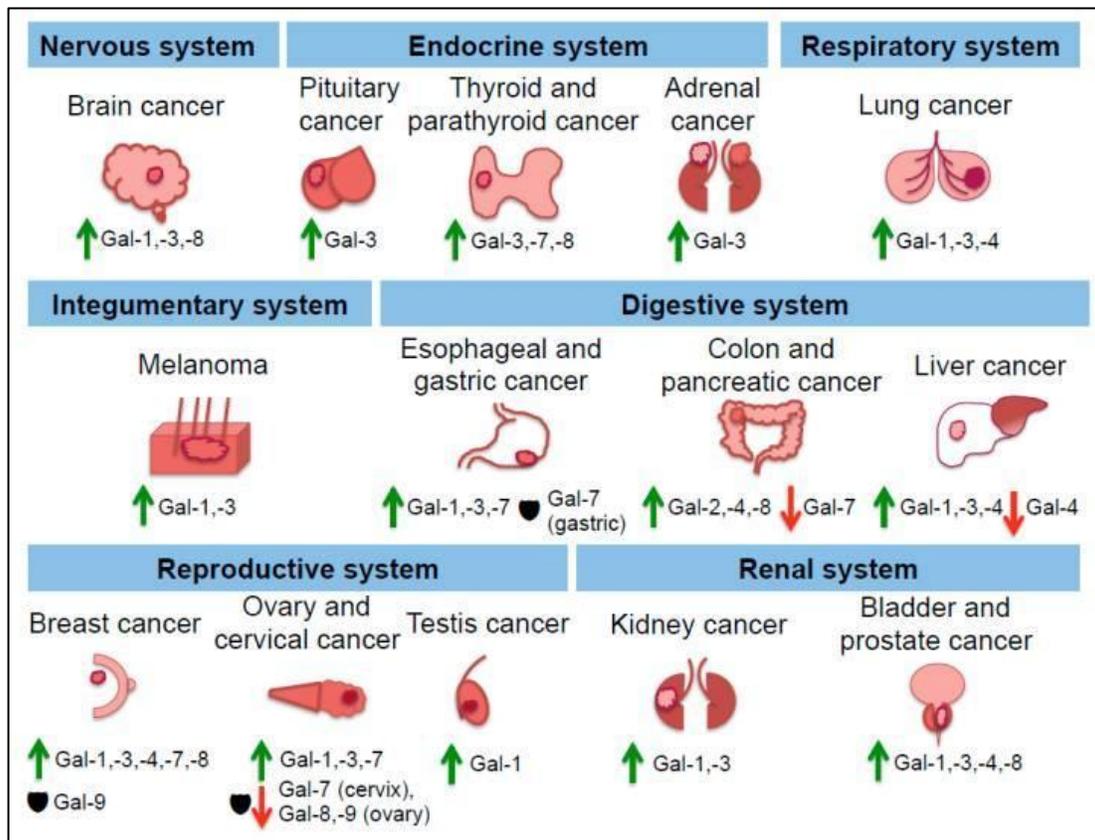


Figure 1.5: Fonctions pro et anti-tumorales des galectines dans les cellules cancéreuses. Adaptation de (Vladoiu *et al.*, 2014)

Beaucoup d'études se sont concentrées sur les galectines extracellulaires, leur capacité à se lier aux récepteurs de surface cellulaire et leur rôle dans le cancer. Comme discuté auparavant, les galectines sous leur forme divalente ou multivalente peuvent se lier aux glycanes dans les récepteurs de surface cellulaire et les réticuler, déclenchant ainsi une cascade d'événements de signalisation transmembranaire. Tel comportement peut se produire dans les cellules normales et aussi dans les cellules associées à des pathologies telles que le cancer, conduisant à la modulation des mécanismes cellulaires (Lahm *et al.*, 2004). Par exemple, la galectine-3 augmente la sensibilité des cellules cancéreuses mammaires aux facteurs de croissance en se liant et en transformant les récepteurs à la surface cellulaire d'une manière qui les empêche d'être éliminés par endocytose constitutive (Partridge *et al.*, 2004). En revanche, la galectine-1 pro-apoptotique joue un rôle indirect dans le cancer, en se liant aux récepteurs de surface des cellules T et en favorisant la création d'un microenvironnement tumoral immunosuppresseur (Perillo *et al.*, 1997). Une étude réalisée avec des cellules de mélanome a montré que la galectine-1 est sécrétée par les cellules tumorales et, une fois dans l'espace extracellulaire, elle induit l'apoptose dans les lymphocytes T cytotoxiques tumoraux, contribuant à l'activité immunosuppressive des cellules de mélanome (voir figure 1.6) (Natalia Rubinstein *et al.*, 2004a). Un autre rôle intéressant des galectines extracellulaires a été découvert récemment et il s'agit de la modulation de la disponibilité des facteurs solubles glycosylés dans la matrice extracellulaire associée au cancer, une structure connue comme facteur clé de la progression tumorale (Gordon-Alonso *et al.*, 2017, Pickup *et al.*, 2014). Les travaux de Gordon-Alonso *et al.* ont examiné le rôle spécifique des treillis extracellulaires de galectine-3 dans l'ECM tumorale et leurs résultats ont révélé que la galectine-3 humaine sécrétée par la tumeur est capable de lier les cytokines glycosylées, en particulier l'IFN $\gamma$  et l'IL-12, et de les détourner, réduisant ainsi la diffusion de ces cytokines dans l'ECM tumorale (Gordon-Alonso *et al.*, 2017). Selon eux, l'activité pro-tumorale nouvellement découverte de la galectine-3 implique la liaison et la capture de l'IFN $\gamma$  dans l'ECM, suivie d'une diminution de l'induction d'un gradient important de chimiokine inductible d'IFN $\gamma$  et, finalement, d'une diminution du recrutement des lymphocytes T dans le microenvironnement tumoral (Gordon-Alonso *et al.*, 2017). En plus de ces résultats, ils ont également démontré que le traitement avec des antagonistes de la galectine-3 inverse ses effets dans l'ECM tumorale, permettant la libération des cytokines d'IFN $\gamma$ , augmentant l'infiltration locale des cellules T et réduisant la croissance de la tumeur (Chou *et al.*, 2018, Gordon-Alonso *et al.*, 2017).



**Figure 1.6: Expression de la galectine (élevée/faible) dans divers types de cancer au sein de différents systèmes physiologiques. Adaptation de (Dings *et al.*, 2018)**

L'interaction des galectines endogènes avec les ligands intracellulaires est également impliquée dans la progression tumorale de nombreux types de cancer. Une grande quantité de preuves confirme que l'expression intracellulaire de la galectine-1 dans le cancer de la prostate favorise l'adhésion cellulaire, réduit le taux de croissance et induit l'apoptose d'une lignée cellulaire d'adénocarcinome de la prostate, stimule l'évasion immunitaire de la tumeur et favorise la vascularisation de la tumeur (Clausse *et al.*, 1999, Ellerhorst *et al.*, 1999, He *et al.*, 2006a, Laderach *et al.*, 2013). L'expression de la galectine-3 dans le cancer du sein augmente l'adhésion, la croissance tumorale et offre une protection contre l'apoptose (Honjo *et al.*, 2001, Moon *et al.*, 2001, Shekhar *et al.*, 2004). La galectine-7 intracellulaire dans les cellules du carcinome du sein augmente l'invasion et réduit la chimiosensibilité, tandis qu'elle augmente la prolifération cellulaire dans le cancer de l'ovaire (Demers *et al.*, 2010, H. J. Kim *et al.*, 2013). La galectine-8 et -9 dans le cancer du côlon réduit la croissance tumorale et la migration cellulaire/métastase (Nagy *et al.*, 2002, Nobumoto *et al.*, 2008).

## 1.2. LES GALECTINES MOINS CONNUES

### 1.2.1. Galectine-10

Le dixième membre de la famille des galectines a été découvert il y a plus d'un siècle, mais ce n'est que récemment qu'il a été reconnu et renommé galectine-10. Comme mentionné précédemment, cette galectine est aussi connue sous le nom de Charcot-Leyden Crystal (CLC) et c'est une protéine de liaison au glycan qui présente une caractéristique particulière: elles forment des cristaux hexagonaux bipyramidaux *in vivo* (Chua *et al.*, 2012, Su *et al.*, 2018a). Leur structure cristalline a un pli protéique similaire à celui des membres de la famille des galectines, en particulier la galectine-7, et leur gène présente également des similitudes telles que l'architecture intron-exon et le CRD codé par un seul exon (S. J. Ackerman *et al.*, 1993, Dyer *et al.*, 1997, Leonidas *et al.*, 1998). En plus de toutes ces similitudes, cette galectine de type prototype ne partage que six des huit résidus d'acides aminés directement impliqués dans la caractéristique (la plus connue) des galectines, la liaison du lactose, et par conséquent ils ont plus d'affinité pour le manose que pour les  $\beta$ -galactosides (Leonidas *et al.*, 1995, Swaminathan *et al.*, 1999).

Plus abondamment exprimée dans la moelle osseuse, berceau des cellules immunitaires telles que les éosinophiles et les basophiles, où elles sont fortement exprimées, cette galectine représente environ 7 % à 10 % de la protéine cellulaire totale dans les éosinophiles sanguins matures (Steven J. Ackerman *et al.*, 2002). Selon les travaux de Dunphy et ses collègues, cette galectine est localisée dans le cytoplasme des cellules, plus spécifiquement dans les granules, d'où elle peut être sécrétée ou transportée vers d'autres compartiments de la cellule et aussi dans le noyau, où son rôle reste inconnu (Dunphy *et al.*, 2002). Cette protéine a été associée à des maladies inflammatoires éosinophiliques comme l'asthme et, pour certains auteurs, elle pourrait être considérée comme une "*hallmark*" de l'implication de l'éosinophile, non seulement dans l'asthme, mais aussi dans de nombreuses autres maladies, y compris la rhinite allergique, la cystite éosinophile, la maladie cœliaque, le cancer colorectal et la dermatite atopique (Ågesen *et al.*, 2011, Bryborn *et al.*, 2010, De Re *et al.*, 2009, Noh *et al.*, 2015, Staribratova *et al.*, 2010). Avec son expression dans les éosinophiles et les basophiles, la galectine-10 s'est avérée être principalement exprimée dans les cellules Treg CD25 humaines et essentielle pour les propriétés fonctionnelles de ces cellules. L'inhibition de la galectine-10 intracellulaire dans les cellules T a restauré leur capacité à proliférer et a révoqué leur activité suppressive sur les

cellules T effectrices CD4+, confirmant ainsi le rôle important de cette galectine dans la fonction régulatrice des lymphocytes T (Kubach *et al.*, 2007).

### 1.2.2. Galectine-12

La galectine-12 est un membre de la famille des galectines qui a été cloné il y a une quinzaine d'années. Cette protéine contient une structure de type basique à deux CRDs, caractéristique des galectines à répétition en tandem (R. Y. Yang *et al.*, 2001b). En dehors de leur domaine C-terminal divergent, leur structure est similaire à celle des autres galectines présentant un domaine N-terminal avec tous les éléments de séquence responsables du pli typique du "jelly roll" ainsi que les résidus conservés d'interactions glucides qui leur permettent d'avoir une activité de liaison au lactose (Ri-Yao Yang *et al.*, 2008). La protéine complète se lie au lactose et réside dans le milieu intracellulaire, bien qu'elle puisse être sécrétée et agir à la fois dans le milieu intra et l'extracellulaire (Hotta *et al.*, 2001).

Retrouvée à la fois chez la souris et chez l'homme, cette galectine est principalement exprimée dans les tissus adipeux et présente des activités induisant l'apoptose cellulaire dans les adipocytes (Hotta *et al.*, 2001). L'expression génique de la galectine-12 a également été identifiée dans les leucocytes humains, les cellules mononucléaires et polynucléaires du sang périphérique ainsi que dans les lignées cellulaires myéloïdes, les lignées cellulaires B et la lignée cellulaire du cancer du sein HBL-100 (R. Y. Yang *et al.*, 2001b). En outre, les travaux de Yang et de ses collègues ont montré que le mRNA de la galectine-12 était également exprimé dans le cœur, le pancréas, la rate, le thymus et à des niveaux d'expression inférieurs dans les poumons, les muscles squelettiques, les reins, la prostate, les testicules, les ovaires et le côlon. Ils ont également observé que l'expression de la galectine-12 est régulée positivement dans les cellules synchronisées à la phase G1 ou G1-S du cycle cellulaire, ce qui suggère un rôle possible de cette galectine dans la tumorigenèse par l'arrêt du cycle cellulaire et l'inhibition de la prolifération cellulaire dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses (R. Y. Yang *et al.*, 2001b). De plus, la galectine-12 semble être un régulateur majeur dans le développement du tissu adipeux. Des expériences avec des pré-adipocytes de souris démontrent que l'expression du gène de la galectine-12 est remarquablement régulée à la hausse lorsque ces cellules subissent une différenciation en adipocytes matures, et que la régulation à la baisse de cette expression de galectine par l'ARN d'interférence a notamment supprimé la différenciation adipocytaire suite à une signalisation adipogène déficiente (Ri-Yao Yang *et al.*, 2004).

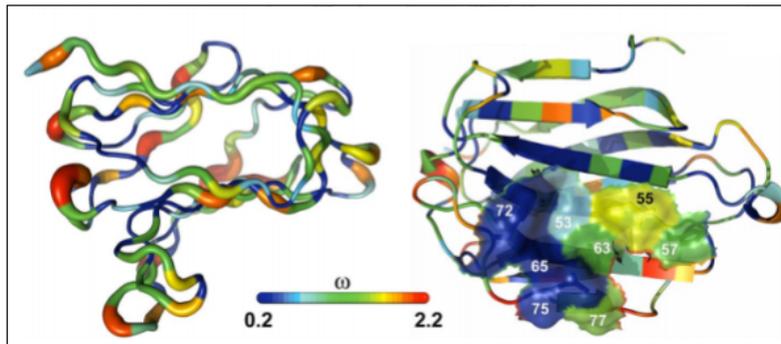
### 1.2.3. Galectine-13

Cette protéine a d'abord été isolée du placenta humain et, pour cette raison, elle est également connue sous le nom de protéine placentaire 13 (PP13) (Bohn *et al.*, 1983). Cette lectine est un homodimère avec la structure typique des galectines: le repliement de type “jelly roll” est composé de cinq et six brins des feuilletts  $\beta$  du CRD (Visegrády *et al.*, 2001). Un modèle *in silico* de la galectine-13 a été construit et a permis une caractérisation structurale et fonctionnelle détaillée de cette galectine. La structure 3D obtenue à partir de la modélisation a révélé une structure prototype dont le CRD contient quatre résidus conservés sur les huit résidus typiques des CRDs des galectines (Visegrády *et al.*, 2001). Selon une recherche récente qui a étudié la structure cristalline de la galectine-13, cette lectine, contrairement aux autres galectines, forme un nouveau type de structure dimérique qui pourrait ne pas se lier aux sucres  $\beta$ -galactosides, ce qui est en accord avec l'un des premiers travaux sur la galectine-13, démontrant que la galectine-13 purifiée du placenta humain ne contient pas de glucides (Bohn *et al.*, 1983, Su *et al.*, 2018b). Par conséquent, il a été suggéré que la galectine-13 soit un nouveau type de galectine prototype.

En plus de leur expression prédominante dans le placenta, l'expression de la galectine-13 peut également être observée à des niveaux inférieurs dans la rate, les reins et la vessie, ainsi que dans les adénocarcinomes hépatiques, les tumeurs neurogènes et les mélanomes malins (N. G. Than *et al.*, 1999). Dans les grossesses normales, la galectine-13 a été identifiée dans le trophoblaste syncytiotrophoblaste et les trophoblastes luminaux multinucléés (Kliman *et al.*, 2012). Than *et al.* ont confirmé l'expression prédominante de cette lectine par le syncytiotrophoblaste et ont rapporté qu'elle est également libérée du placenta dans la circulation maternelle (Nándor Gábor Than *et al.*, 2014a). La diminution de l'expression placentaire de la galectine-13 et sa faible concentration dans les sérums maternels du premier trimestre sont associées à un risque élevé de pré-éclampsie (Nándor Gábor Than *et al.*, 2014a, N. G. Than *et al.*, 2014b). En général, l'expression de la galectine-13 semble être liée à des altérations inflammatoires liées à la grossesse et il a été démontré qu'elle joue un rôle important dans la régulation de la tension artérielle et le remodelage vasculaire à l'interface mère-foetus (Nándor Gábor Than *et al.*, 2014a).

## 1.2.4. Galectine-16

Comme les autres galectines placentaires, la galectine-16 est une galectine prototypique strictement exprimée dans le placenta (N. G. Than *et al.*, 2009). La modélisation informatique de l'homologie a permis la visualisation 3D de cette galectine et a révélé une structure qui suit le schéma architectural typique des galectines : un sandwich  $\beta$  conservé composé de deux feuilles antiparallèles incluant le CRD, avec des régions en boucle montrant quelques variations (voir figure 1.7) (Guardia *et al.*, 2011, N. G. Than *et al.*, 2009). Sur les huit résidus conservés dans le CRD, impliqués dans l'activité de liaison au sucre, trois sont conservés dans la structure de la galectine-16, mais certains des résidus importants pour la liaison au sucre ont été remplacés, ce qui pourrait affecter leur affinité pour les galactosides (N. G. Than *et al.*, 2009).



**Figure 1.7: (Gauche) La largeur du ruban, représentant le squelette moléculaire de la galectine-16, varie en proportion des valeurs spécifiques à chaque site pour toutes les galectines du cluster. Selon le spectre de couleur représenté sur la barre, les valeurs sont plus petites le long des brins et plus élevées dans les régions de boucle. (Droite) Le même code couleur montre que quatre résidus dans la CRD des galectines du cluster (résidus 53, 65, 72 et 75) sont sous sélection conservée, tandis que d'autres sur le côté opposé (résidus 55, 57, 63 et 77) montrent une plus grande variabilité. Adaptation de (N. G. Than *et al.*, 2009)**

Le gène de la galectine-16 (*LGALS16*) a une structure conservée à quatre exons et est situé dans le chromosome 19 (Chr19) où il appartient aux galectines du cluster Chr19, un groupe qui implique d'autres gènes de la famille des galectines tels que *LGALS13* et *LGALS14* (N. G. Than *et al.*, 2014b). L'étude de Than *et al.* montre que dans l'interface mère-foetus, ces galectines sont principalement exprimées dans le syncytiotrophoblaste et dans l'endothélium des vaisseaux fœtaux, mais elles peuvent aussi être détectées à des niveaux inférieurs dans l'amnion et les trophoblastes chorioniques dans les membranes fœtales (N. G. Than *et al.*, 2009).

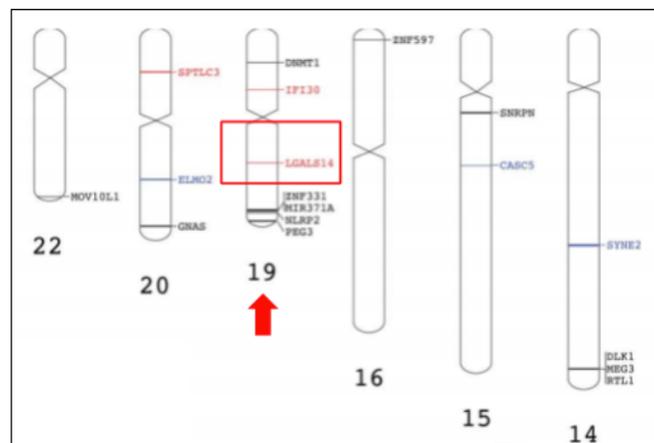
### 1.3. LA GALECTINE-14

Le quatorzième membre de la famille des galectines, également connu sous le nom de Placental Protein 13-like, ou PPL13, a été isolé pour la première fois en 2001 par une équipe de chercheurs de l'Institut de génétique de Shanghai. Dans leur étude, ils ont rapporté avoir trouvé un nouvel ADNc présentant de grandes similitudes de séquence avec les membres de la famille de la galectine humaine, avec la plupart des ressemblances avec PP13, ou galectine-13. L'analyse biologique moléculaire initiale du PPL13, comme il a été nommé à l'époque, impliquait de nombreuses méthodes: la construction et le criblage d'une banque d'ADNc du cerveau fœtal, la recherche BLAST d'homologie de séquence pour déterminer la structure génomique de la nouvelle protéine, l'analyse de la séquence d'acides aminés présumée via la recherche dans la base de données PROSITE, l'analyse de l'expression de l'ADNc nouvellement isolé par des tests Northern Blot de tissus multiples, et la génération de vecteurs d'expression codant le PPL13 humaine suivi de la transfection dans COS-7 afin d'examiner la localisation des protéines (Q. S. Yang *et al.*, 2001a). Depuis la découverte et la première investigation de la galectine-14, cette protéine n'a été mentionnée que dans un nombre limité d'études, une quinzaine de publications (selon la base de données bibliographiques Pubmed), la plupart d'entre elles liées à l'analyse du cluster chromosomique 19, de l'interface mère-foetus et de l'infection parasitaire chez les animaux.

Dans l'ensemble, le PPL13 présente une structure conservée, un seul CRD et une activité de liaison au sucre ressemblant à d'autres galectines, étant ainsi reconnue comme une galectine prototypique et nommée galectine-14 sur la base de son homologie avec la galectine-13 et suivant le système de nomenclature de la famille des galectines humaines (Q. S. Yang *et al.*, 2001a). Comme la galectine-13, cette lectine est principalement exprimée à l'interface mère-foetus humain, où elle peut conférer des fonctions immunorégulatrices supplémentaires au placenta (N. G. Than *et al.*, 1999). Des études avec des modèles animaux ont montré que la galectine-14 a une expression limitée aux éosinophiles des moutons, étant libérée de ces cellules en réponse à la stimulation allergénique, ce qui suggère un rôle de la galectine-14 dans la régulation de l'activité des éosinophiles pendant les réponses allergiques (Dunphy *et al.*, 2002).

### 1.3.1. Caractéristiques des gènes et des protéines

Le gène de la galectine-14 est identifié comme *LGALS14* et il est situé dans le bras "q" et la bande 13.2 du chromosome 19, généralement appelé Chr19q13.2 (N. G. Than *et al.*, 2009, Q. S. Yang *et al.*, 2001a). La littérature montre que ce chromosome possède un groupe de cinq gènes de galectine humaine, dont trois d'entre eux (*LGALS13*, *14* et *16*) sont spécifiquement exprimés dans le placenta (N. G. Than *et al.*, 2009). Les recherches combinées BLAT et BLAST ont permis d'étudier l'origine évolutive du cluster Chr19, déterminant que ce groupe de gènes de galectine est apparu au cours de l'évolution des primates en conséquence de la duplication et de la réorganisation des gènes. L'analyse phylogénétique a identifié le groupe du Chr19 comme un groupe anthropoïde de gènes, parce que ces gènes ne peuvent être trouvés que dans un groupe d'espèces de primates dont la taille du cerveau a augmenté et dont les gestations sont longues (N. G. Than *et al.*, 2009, Williams *et al.*, 2010).



**Figure 1.8: Visualisation du génome de certains des gènes imprimés et exprimés de façon monoallélique dans le placenta humain. Les gènes imprimés détectés et confirmés, tels que *LGALS14* et d'autres, sont marqués en rouge. Adaptation de (Metsalu *et al.*, 2014)**

Dans une étude récente, un groupe de chercheurs estoniens a travaillé sur l'identification de gènes imprimés et l'expression monoallélique aléatoire dans le placenta humain en utilisant le séquençage de l'ARN et le génotypage de variantes d'ADN codantes comme méthodes (Metsalu *et al.*, 2014). Ils ont rapporté *LGALS14* comme faisant partie de leur liste de candidats à gènes imprimés. Plus tard, ils ont validé sa détection et son identification en tant que gène imprimé et exprimé monoallélique avec une préférence paternelle, ce qui signifie que l'expression de *LGALS14* dans le placenta est déterminée par le parent qui les a apportés (Metsalu *et al.*, 2014). En plus de ces informations, l'emplacement génomique des gènes

imprimés et exprimés de façon monoallélique a été identifié, confirmant l'emplacement de *LGALS14* dans le chromosome 19, tel que précédemment rapporté par Yang et Than, en 2001 et 2009 respectivement (voir figure 1.8) (Metsalu *et al.*, 2014, N. G. Than *et al.*, 2009, Q. S. Yang *et al.*, 2001a).

Comme mentionné ci-dessus, l'ADNc de pleine longueur codant pour la PPL13 a d'abord été isolé à partir d'une banque d'expression d'ADNc du cerveau fœtal humain. L'analyse séquentielle a révélé un clone de 791 bp avec un long cadre de lecture ouvert de la position 224 à 643 bp avec un cadre de lecture contenant un codon stop à 155 bp et codant une protéine de 139 acides aminés avec une masse moléculaire théorique de 16,1 kDa. Une recherche BLAST de séquences de nucléotides et de protéines a montré que la PPL13 est codée par quatre exons et que sa séquence est homologe à des membres prototypiques de la famille des galectines, comme la galectine-10, la galectine-11 (ovgal11) et la galectine-13, confirmant cette protéine en tant que nouveau membre du clan des galectines (Q. S. Yang *et al.*, 2001a). L'alignement de séquence avec d'autres galectines affichait l'état de conservation de la séquence codant le CRD et les limites exon-intron.

La capacité des galectines à lier les  $\beta$ -galactosides est liée à sept résidus d'acides aminés (His44, Asn46, Arg48, His52, His61, Asp61, Trp68, Glu71, et Arg73) qui interagissent directement avec les glucides dans le CRD et dont les mutations pourraient compromettre cette affinité (Ahmed *et al.*, 1996, J. Hirabayashi *et al.*, 1994). Dans le cas de la galectine-14, l'alignement de sa séquence a montré que trois de ces sept acides aminés importants sont substitués, comme la galectine-10 humaine et la galectine-11, ce qui suggère que cette protéine pourrait avoir une faible affinité pour les sucres galactosides (voir figure 1.9) (Q. S. Yang *et al.*, 2001a).

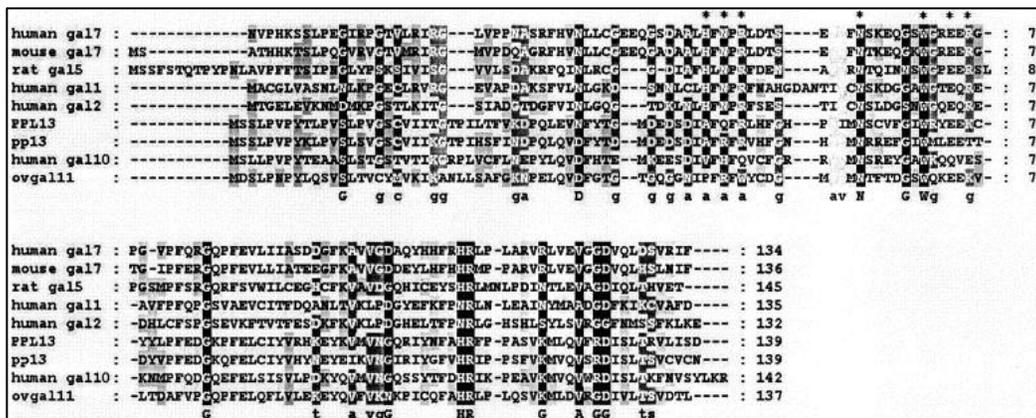
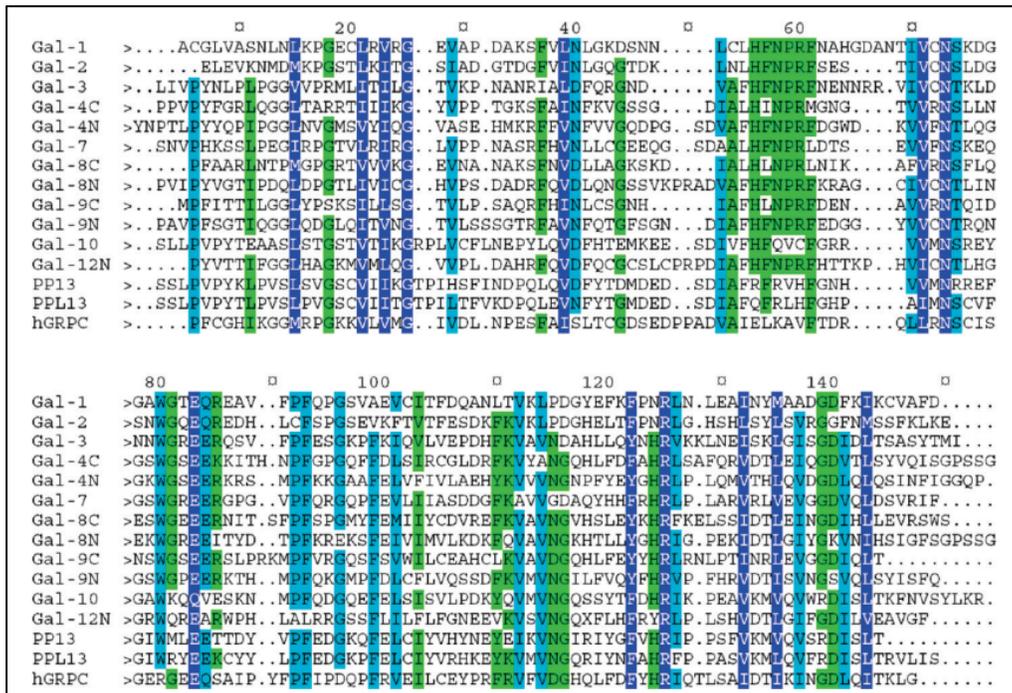


Figure 1.9: Premier alignement des séquences d'acides aminés putatifs du PPL 13 avec les galectines prototypiques connues. Adaptation de (Q. S. Yang *et al.*, 2001a)

L'alignement de la séquence d'acides aminés putative avec d'autres galectines a montré que la plus grande similarité de séquence de la galectine-14 a été trouvée avec PP13, présentant 78 % d'analogie de séquence d'acides aminés, suivie de 67 % et 54 % de similarité avec la galectine-10 humaine et galectin-11 (ovgal11), respectivement (Q. S. Yang *et al.*, 2001a). Fait intéressant, avec une identité d'acides aminés de 57 %, l'homologue mouton de la galectine-14 démontre la plupart des identités à l'écalectine/galectine-9 humaine et seulement 24 % des identités d'acides aminés à la galectine-10 humaine (Dunphy *et al.*, 2002). L'analyse de la séquence d'acides aminés n'a pas permis d'identifier les peptides de signalisation pour cibler l'emplacement de la galectine-14. De plus, une recherche dans la base de données PROSITE a été effectuée pour identifier les sites de phosphorylation de la protéine kinase et les résultats ont démontré que la galectine-14 contient un site de protéine kinase C à la position 120, un site de phosphorylation de caséine kinase II à la position 42 et deux sites de tyrosine kinase à la position 73 et 87, respectivement (Kübler *et al.*, 2014, Q. S. Yang *et al.*, 2001a).



**Figure 1.10: Alignement de séquences multiples de galectines humaines, y compris la galectine-14 (PPL13), montrant des résidus strictement conservés (fond bleu) et des résidus homologues (85 % de conservation en bleu et 70 % de conservation en vert). Adaptation de (Guardia *et al.*, 2011)**

Plus récemment, un alignement de séquences multiples de presque toutes les galectines humaines connues à ce jour a été rapporté, fournissant une première comparaison de tous les CRDs des membres de la famille des galectines humaines, y compris la galectine-14 (Guardia

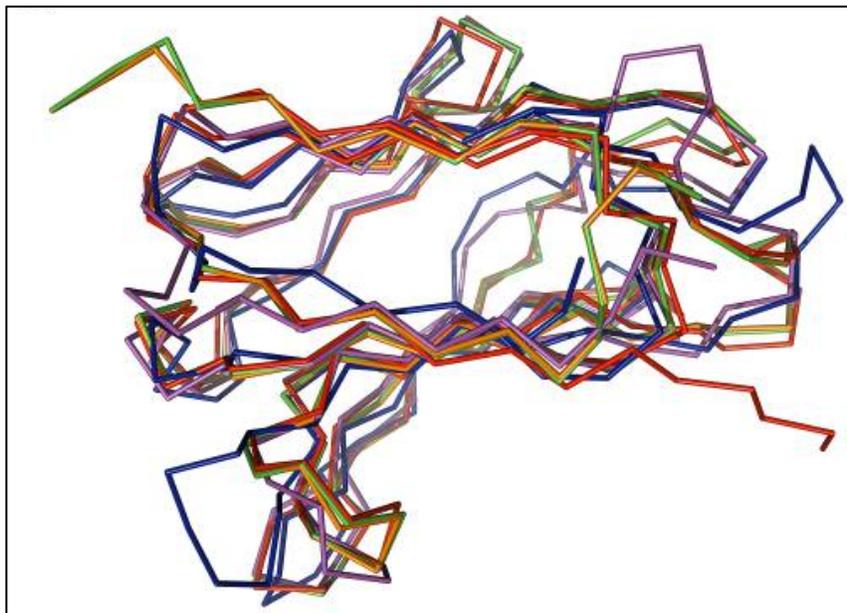
*et al.*, 2011). En utilisant un programme d'alignement multiple, les alignements ont été déterminés et raffinés, en gardant le focus sur le pli CRD des galectines. Ils ont démontré qu'en moyenne les galectines présentent une identité de séquence de 29 % et une similarité de 47 % par rapport aux substitutions conservatrices. Ceci suggère que les galectines humaines forment une famille de protéines avec un degré d'identité de séquence considérablement faible, mais présentant une structure très similaire (voir figure 1.10) (Guardia *et al.*, 2011). Avec d'autres analyses, leurs résultats ont démontré que le CRD de la galectine-14 (et aussi de la galectine-13 et -10) montre plus de deux changements dans les positions conservées, divergeant de la majorité des galectines humaines qui montrent zéro ou jusqu'à deux changements dans les positions canoniques et, en outre, ce sont les galectines qui détournent le plus des résidus conservés sur le site de liaison des ligands (Ahmed *et al.*, 1994, Guardia *et al.*, 2011). Ces résidus altérés dans le site de liaison des ligands du CRD sont situés à un endroit où toute altération peut entraîner des variations considérables dans la spécificité du saccharide des galectines (Vasta, 2012). Ces altérations peuvent expliquer pourquoi la galectine-10 présente une plus grande affinité pour le mannose et la galectine-13 manque d'affinité pour les  $\beta$ -galactosides (Swaminathan *et al.*, 1999, N. G. Than *et al.*, 1999). En fait, une étude récente montre que la spécificité de liaison du ligand galectine-13 est différente des autres galectines et qu'elle ne se lie pas aux  $\beta$ -galactosides en raison d'une altération des résidus d'acides aminés dans une position cruciale pour les interactions avec ces types de saccharides (Su *et al.*, 2018b). Même si ce type d'étude n'a pas été réalisé avec la galectine-14, la similitude de séquence entre la galectine-14 et la galectine-13 nous permet d'entrevoir un comportement similaire de cette nouvelle galectine et de considérer les deux comme un nouveau type de galectine prototype aux propriétés distinctes.

### 1.3.2. Structure protéique

Aucune information structurale expérimentale n'est disponible pour la galectine-14, ainsi que pour d'autres galectines récemment découvertes, comme la galectine-13. Cependant, les connaissances actuelles sur les galectines combinées à la technologie disponible ont permis, dans une certaine mesure, l'étude structurale des nouveaux membres de la famille. Comme nous l'avons déjà mentionné, on sait que la structure primaire de la galectine-14 est homologue à plusieurs membres de la famille des galectines, présentant la plus forte identité de séquence (78 %) avec la galectine-13, étant identifiée comme une mono CRD galectine prototypique (N. G. Than *et al.*, 2009, Q. S. Yang *et al.*, 2001a). Ces connaissances nous permettent d'inférer

que la structure de la galectine-14, similaire à celle de la galectine-13, présente le pli protéique "jelly roll", typique de cette famille, qui se compose de cinq et six feuillets  $\beta$  reliés par deux hélices  $\alpha$  caractéristiques du sous-groupe prototype.

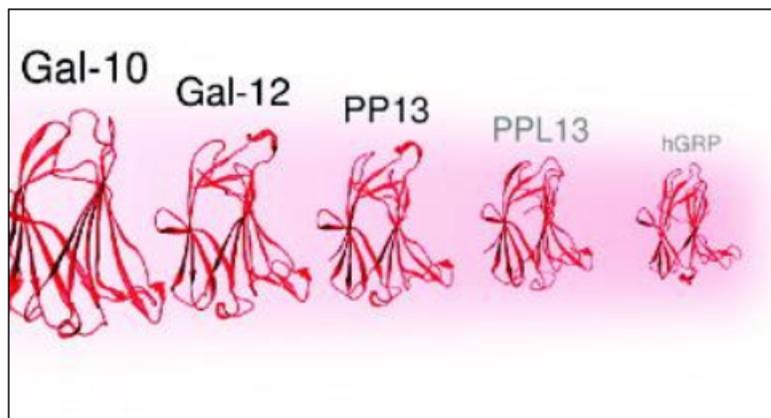
Malgré le fait que la structure officielle de la galectine-14 n'a pas encore été définie ou décrite, il existe quelques études qui ont évalué sommairement la structure de la galectine-14 et tenté de combler cette lacune structurale avec des modèles basés sur l'homologie. La première étude à tenter d'examiner les galectines placentaires présentes dans le cluster du Chr19 et, pour comprendre les fonctions des protéines codées par les gènes de ce cluster, ils ont scruté la séquence d'acides aminés et modélisé les structures protéiques (N. G. Than *et al.*, 2009). Les auteurs ont pu ainsi développer un modèle structurel des protéines humaines codées non seulement par *LGALS14*, mais aussi *LGALS16* et *-17* (voir figure 1.11) (N. G. Than *et al.*, 2009). Grâce à cette modélisation homologique, ils ont révélé la structure prototypique de ces galectines: un sandwich  $\beta$  conservé, composé de deux feuilles antiparallèles incluant le CRD (N. G. Than *et al.*, 2009, Vasta, 2012).



**Figure 1.11: Superposition de structures de galectines humaines conservées (galectine 10, vert; -13, rouge; -14, violet; -16, orange; -17, bleu). Adaptation de (N. G. Than *et al.*, 2009)**

La deuxième étude visant à construire un modèle homologique pour la galectine-14 a été réalisée pour analyser la structure, la dynamique et les caractéristiques de liaison des ligands du réseau de galectine humaine (Guardia *et al.*, 2011). Ils ont pu construire les structures des

galectines les plus récentes, dont les structures ne sont pas disponibles, à l'aide d'outils de simulation informatique tels que les logiciels de modélisation d'homologie (voir figure 1.12) (Guardia *et al.*, 2011). En plus de contribuer à la compréhension des caractéristiques structurales et moléculaires dynamiques du réseau de la galectine humaine, leurs résultats ont également identifié la galectine-14 comme faisant partie du groupe F4 mono-CRD et ont confirmé la structure prototype de la galectine-14 et sa similarité avec la galectine-13 (Guardia *et al.*, 2011, Houzelstein *et al.*, 2004). Par conséquent, même si l'homologie de la galectine-14 avec les membres de la famille des galectines est claire, d'autres études structurales et fonctionnelles spécifiques sont encore nécessaires.



**Figure 1.12: Modèles basés sur l'homologie des galectines les plus récentes. Adaptation de (Guardia *et al.*, 2011)**

### 1.3.3. Localisation et profils d'expression de la galectine-14

La première équipe de chercheurs à isoler la galectine-14 a effectué un Northern Blot à tissus multiples pour analyser l'expression du PPL13. Ils ont rapporté une forte expression d'ARNm dans le placenta, sans qu'aucun signal ne soit détecté dans les autres tissus (Q. S. Yang *et al.*, 2001a). Selon la littérature et les données limitées disponibles sur la galectine-14, le *LGALS14* est considéré comme l'un des trois gènes du cluster Chr19 qui ont une forte expression placentaire. En général, de nombreuses galectines comme la galectine-1 et la galectine-13 sont abondamment exprimées dans l'interface mère-foetus, qui comprend le placenta et les membranes foetales (Jeschke *et al.*, 2007, Vićovac *et al.*, 1998). Cependant, certaines d'entre elles sont exprimées uniquement dans le placenta et on pense que la galectine-14 est l'une d'entre elles. Les recherches de GenBank combinées à l'analyse de

l'expression des gènes par qRt-PCR sur divers tissus humains ont exposé l'expression placentaire prédominante pour *LGALS14*, ainsi que *LGALS13* et *-16* (voir figure 1.13) (N. G. Than *et al.*, 2009).

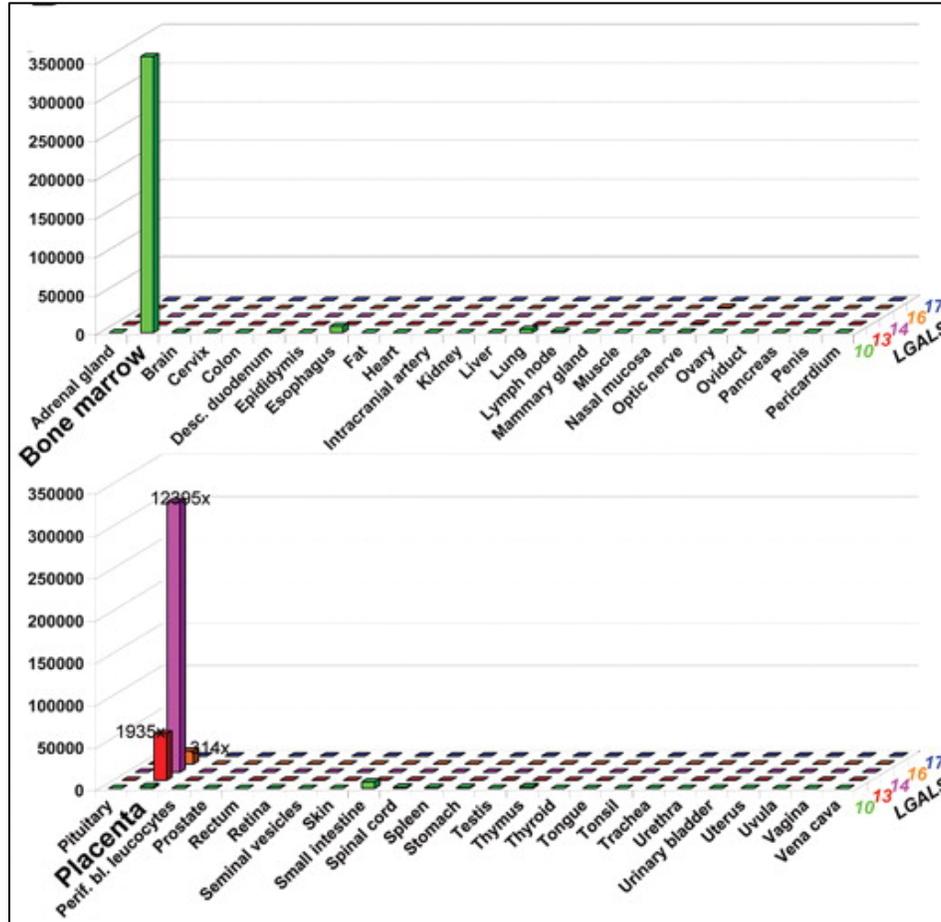
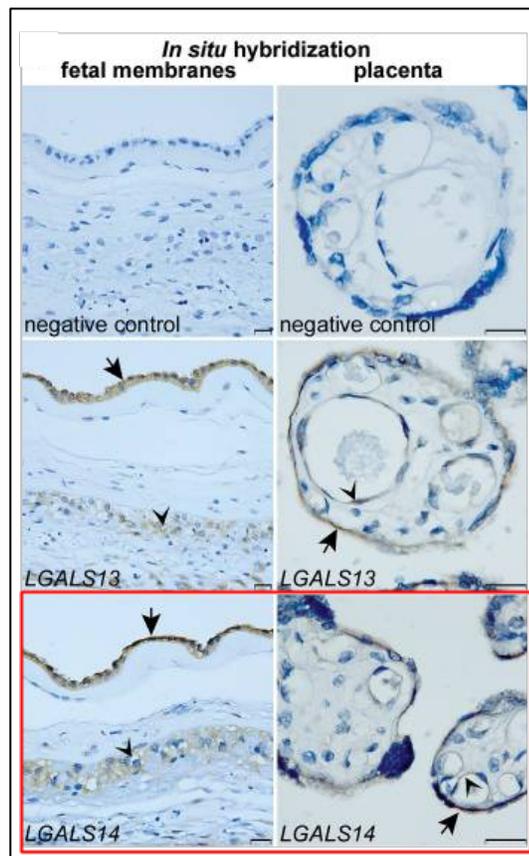


Figure 1.13: Le profil d'expression génétique d'un panel d'ADNc de 48 tissus humains révèle que les *LGALS13*, *-14* et *-16* sont fortement et uniquement exprimées dans le placenta (panneau inférieur). L'axe des y montre le niveau d'expression, et les nombres représentent la différence de pli entre les niveaux d'expression placentaire et d'expression génique moyenne de tous les autres tissus. Adaptation de (N. G. Than *et al.*, 2009)

À ce jour, la connaissance de l'emplacement de la galectine-14 dans le corps humain est également très limitée aux études de l'interface mère-foetus. La même étude qui a identifié l'expression prédominante de *LGALS14* dans le placenta a également étudié l'emplacement de cette galectine dans le placenta et les membranes fœtales par hybridation *in situ* de l'ARNm (N. G. Than *et al.*, 2009). Leurs résultats démontrent que *LGALS14*, en conjonction avec le

*LGALS13*, *-16* et *-17*, se trouve dans les trophoblastes du type amnio et extravilleux des membranes fœtales et dans le syncytiotrophoblaste du placenta (voir figure 1.14). Ils s'expriment également dans les cellules des vaisseaux fœtaux, les types épithéliaux et endothéliaux (N. G. Than *et al.*, 2009). Les travaux de Metsalu *et al.* ont également signalé la présence de *LGALS14* dans le placenta humain à la suite de leur étude de l'expression des gènes monoalléliques imprimés et aléatoires dans ce tissu (Metsalu *et al.*, 2014). Comme indiqué dans leur publication, ils ont identifié quatre nouveaux gènes imprimés possibles dans le placenta humain, *LGALS14* étant l'un d'entre eux.



**Figure 1.14:** Les galectines du cluster Chr19 ont un modèle d'expression similaire à l'interface mère-foetus. (Gauche) L'hybridation *in situ* révèle l'expression de *LGALS14* (carré rouge) dans l'amnion (flèches) et les trophoblastes chorioniques (pointes de flèches) dans les membranes fœtales. (Droite) Dans le placenta, ces gènes sont principalement exprimés par le syncytiotrophoblaste (flèches) et l'endothélium fœtal (pointes de flèches). Adaptation de (N. G. Than *et al.*, 2009)

En ce qui concerne l'expression de la galectine-14 chez d'autres vertébrés, certaines études ont décrit leur expression unique chez les éosinophiles de moutons et leur libération après des stimuli parasitaires ou allergiques (Dunphy *et al.*, 2002, A. R. Young *et al.*, 2009). Les travaux de Dunphy et collaborateurs, avec la galectine-14 ovine ont décrit, après analyse de l'expression de l'ARNm et des protéines, que cette galectine est présente spécifiquement dans les éosinophiles (Dunphy *et al.*, 2002). Il est intéressant de noter qu'une autre galectine, le cristal Charcot-Leyden ou galectine-10, présente également des niveaux d'expression élevés chez les éosinophiles. Cependant, contrairement à la galectine-14 humaine, la galectine-14 ovine présente peu de similitudes avec la galectine-10, seulement 25 % d'identité d'acides aminés (S. J. Ackerman *et al.*, 1993, Q. S. Yang *et al.*, 2001a). De plus, des expériences d'immunohistochimie et de cytométrie de flux ont identifié la localisation de la galectine-14 ovine, qui a été trouvée dans le cytoplasme des éosinophiles et éventuellement dans le noyau (Dunphy *et al.*, 2002). De plus, les travaux de Young et ses collègues ont fait un pas de plus dans l'étude de la galectine-14 ovine et ont démontré que cette galectine est spontanément libérée par les éosinophiles tissulaires, se lie au sang et aux granulocytes et lymphocytes luminaux, et semble agir comme la galectine-10 en étant rapidement libérée pendant la dégranulation des éosinophiles induite par l'ionophore calcique (Fukuda *et al.*, 1985, A. R. Young *et al.*, 2009).

#### 1.3.4. Fonctions et associations physiopathologiques

Selon le premier article décrivant la galectine-14 humaine, les résultats d'une recherche GenBank dbEST ont identifié des séquences exprimées (EST) correspondant à la galectine-14 dans des tissus dérivés du placenta (principalement), de l'aorte, de l'ovaire, de la rate fœtale, du foie et du cerveau d'une banque d'ADNc, ce qui les a amenés à affirmer que la galectine-14 peut jouer un rôle dans les premiers stades du développement du fœtus (Q. S. Yang *et al.*, 2001a). Cette conclusion n'a toutefois pas encore été confirmée en raison de l'absence d'études expérimentales de cette galectine. Cependant, les quelques données disponibles et les études rapportées sur la galectine-14 ont permis d'avoir un premier aperçu de ses propriétés physiologiques et pathophysiologiques.

Les résultats des travaux de Than *et al.* suggèrent que les galectines placentaires, comme la galectine-14, induisent l'apoptose des cellules T, comme le démontrent les expériences de cytométrie de flux, et cette induction semble être accordée par le CRD. Ceci s'explique par leur expérience avec la galectine-13 tronquée dépourvue du CRD, qui n'a montré

aucune induction d'activité apoptotique par ces galectines (N. G. Than *et al.*, 2009). Il semble donc que la galectine-14 provoque la mort des cellules immunitaires par des voies apoptotiques dont les détails sont encore inconnus, et confère une tolérance immunitaire au fœtus (N. G. Than *et al.*, 2009). Ensuite, dans une étude plus récente également liée aux gènes du groupe Chr19 dans l'interface mère-foetus, Than et ses collègues ont utilisé diverses méthodologies pour étudier la dysrégulation complexe des gènes du groupe Chr19 dans la pré-éclampsie et leurs résultats ont permis de mieux comprendre les gènes de ce groupe, y compris la galectine-14 (N. G. Than *et al.*, 2014b). Parmi leurs nombreuses découvertes, ils ont rapporté que *LGALS14* et *LGALS13* présentaient la plus forte diminution de la pré-éclampsie, ce qui a été confirmé par immunoloration des matrices tissulaires construites à partir de placentas. Ils ont conclu que l'expression placentaire des *LGALS14* et *LGALS13* est déficiente dans la pré-éclampsie prématurée en raison de la dysrégulation de facteurs de transcription importants qui contrôlent les fonctions des trophoblastes et de la méthylation différentielle de ces gènes (N. G. Than *et al.*, 2014b).

Une autre étude mentionnée précédemment nous donne également plus d'information sur les fonctions de la galectine-14. Dans leurs travaux, Metsalu et ses collègues ont identifié *LGALS14* comme un nouveau gène imprimé dans le placenta humain et, étant donné que ses homologues liés à la membrane sont des protéines connues pour réguler les fonctions immunitaires, ils ont supposé que *LGALS14* exprimé paternellement a un rôle dans la régulation du système immunitaire maternel pour empêcher le rejet du fœtus par l'organisme (Metsalu *et al.*, 2014). Ils suggèrent que les gènes exprimés et monoalléliquement exprimés peuvent jouer un rôle dans la médiation de l'apoptose et du développement tissulaire, dans la régulation des processus inflammatoires et des activités du système immunitaire, et enfin dans la modulation des processus métaboliques et du cycle cellulaire (Metsalu *et al.*, 2014).

La galectine-14 a également été étudiée en ce qui concerne ses effets sur la survie, l'invasion et la prolifération des cellules du trophoblaste extravasculaire (EVT) (Fritz *et al.*, 2015). Ce travail a été publié en tant que résumé d'une session orale/affiche présentée dans une conférence et publié dans le supplément du périodique *Fertility and Sterility*, donc l'information sur ce travail est très limitée. Cependant, ils ont décrit des résultats intéressants en ce qui concerne les effets de la galectine-14 dans les cellules trophoblastes. D'après leurs observations, la galectine-14 joue un rôle dans la survie des trophoblastes dans des conditions hypoxiques et les sauve de la mort cellulaire à la suite d'une hypoxie/blessure de réoxygénation. De plus, cette galectine stimule l'invasion des trophoblastes et leur différenciation en EVT (Fritz *et al.*, 2015). Ces résultats appuient les conclusions de Bolnick et collaborateurs qui ont étudié

les biomarqueurs altérés dans les cellules trophoblastiques et ont observé des différences significatives dans l'expression de *LGALS14* et d'autres gènes entre les cellules EVT issues de grossesses normales et les cellules EVT issues de pré-éclampsie et d'autres maladies périnatales (Bolnick *et al.*, 2016). Par conséquent, il a été suggéré que la galectine-14 pourrait être un agent thérapeutique possible pour les troubles placentaires liés à la grossesse, en particulier la perte précoce de grossesse (Fritz *et al.*, 2015).

Les propriétés et les fonctions de la galectine-14 chez d'autres mammifères ont également été étudiées. Chez d'autres mammifères, la galectine-14 semble être impliquée dans leur réponse immunitaire aux infections parasitaires multicellulaires et aux maladies allergiques, comme l'asthme, via des mécanismes biologiques associés aux éosinophiles, comme le recrutement des éosinophiles (A. R. Young *et al.*, 2009, Anna R. Young *et al.*, 2002). La fonction exacte de la galectine-14 ovine est encore inconnue, mais des indications montrent que cette lectine pourrait jouer un rôle important dans l'attrition des parasites à médiation éosinophile en raison de sa présence dans les sites d'infection parasitaire, où elles peuvent interagir avec les motifs glucidiques des parasites multicellulaires et ensuite réguler la réponse inflammatoire produite par ce type d'infection (Dunphy *et al.*, 2002, Anna R. Young *et al.*, 2002). D'autres résultats suggèrent que cette protéine a un rôle extracellulaire clé dans les processus inflammatoires liés aux réactions allergiques et aux maladies. Les résultats des expériences de liaison ont montré que la liaison de la galectine-14 ovine n'est pas limitée aux éosinophiles, mais aussi aux neutrophiles, lymphocytes et autres cellules impliquées dans la réponse inflammatoire (A. R. Young *et al.*, 2009). Comme pour les autres galectines, la galectine-14 présente probablement des fonctions extra et intracellulaires, comme la régulation de la migration cellulaire et l'apoptose, cette dernière étant liée à la présence d'un motif de type Bcl-2 dans sa séquence, présent également dans la galectine-1 et -3, galectines dont le rôle dans la régulation apoptotique a été prouvé (Akahani *et al.*, 1997, Dunphy *et al.*, 2002, Perillo *et al.*, 1997).

## CHAPITRE 2

### GALECTINE-14: LES CARACTÉRISTIQUES D'UNE NOUVELLE GALECTINE DANS LE CANCER

Article publié:

**De Araujo L.O.F** and St-Pierre Y. (2018). Galectin-14 expression in ovarian cancer. *BioRxiv*

## RÉSUMÉ

Les galectines (gal) sont des protéines multifonctionnelles dont l'expression change dans différentes conditions physiologiques ou pathologiques, comme le cancer. Cependant, jusqu'à présent, la plupart des études ont porté sur les gal-1 et gal-3 et, dans une moindre mesure, sur les gal-7 et gal-9. Nous en savons encore très peu sur les autres galectines, en particulier celles récemment découvertes, comme la galectine-14, une galectine prototypique hautement exprimée à l'interface mère-foetus. Ici, en utilisant des approches *in silico* et *in vitro*, nous rapportons une corrélation entre l'expression de *Igals14* et le cancer de l'ovaire. Nous avons découvert qu'une expression élevée d'ARNm de gal-14 dans les cellules cancéreuses ovariennes est associée à une survie plus basse. En accord avec cette observation, nous avons également constaté que *Igals14* est préférentiellement exprimé dans le cancer de l'ovaire, particulièrement dans l'adénocarcinome séreux de haut grade (HGSA). Nos données *in vitro* sur les lignées cellulaires cancéreuses ovariennes ont confirmé que *Igals14* est exprimé dans l'HGSA. Fait intéressant, l'expression *de novo* de gal-14 dans les cellules HEK-293 a augmenté l'apoptose, tant au niveau basal qu'après exposition à de faibles doses d'étoposide. Ainsi, bien que l'étude de cette galectine n'en soit qu'à ses débuts, nous avons été en mesure de fournir de nouvelles connaissances sur les modes d'expression de cette galectine et son implication dans le cancer.

## **Galectin-14 expression in ovarian cancer**

Lorena Oliveira Fernandes de Araujo  
and Yves St-Pierre<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INRS-Institut Armand-Frappier, 531 Boul. des Prairies, Laval, Québec,  
H7V 1B7, Canada

**Running title:** Galectin-14 in ovarian cancer

**Keywords:** Galectin-14, ovarian cancer, expression

**Abbreviations:** galectin-14 (GAL-14), ovarian cancer (OC)

**Corresponding author:** Yves St-Pierre, INRS-Institut Armand-Frappier, University of  
Quebec, 531 Boul. Des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7. Phone: 450-686-5354;  
Fax: 450-686-5501; E-mail: [yves.st-pierre@iaf.inrs.ca](mailto:yves.st-pierre@iaf.inrs.ca)

Notes: The authors declare no competing financial interest.

**Number of figures:** 8

**Number of tables:** 1

## Abstract

Galectins (gal) are multifunctional proteins whose expression changes under different physiological or pathological conditions, including cancer. However, so far, most studies have focused on gal-1 and gal-3, and to a lesser extent to gal-7 and gal-9. We still know very little about other galectins, especially the recently discovered ones, such as gal-14, a prototype galectin highly expressed at the maternal-fetal interface. Here, using *in silico* and *in vitro* approaches, we report a correlation between *lgals14* expression and ovarian cancer. We found that high expression of gal-14 mRNA in ovarian cancer cells is associated with a shorter survival. Consistent with this observation, we also found that *lgals14* is preferentially expressed in high grade serous adenocarcinoma (HGSA) ovarian cancer. Our *in vitro* data with ovarian cancer cell lines confirmed that *lgals14* is readily expressed in HGSA. Interestingly, *de novo* expression of gal-14 in HEK-293 cells increased apoptosis, both at the basal level and following exposure to low doses of etoposide. Thus, although the study of this galectin is still in its infancy, we were able to provide novel insights into the expression patterns of this galectin and its involvement in cancer.

## Introduction

Galectins are small molecular weight soluble proteins with have high affinity for  $\beta$ -galactosides (Barondes *et al.*, 1994b). They were first recognized as lactose-specific lectins, or more specifically  $\beta$ -galactoside-binding lectins, a group of soluble proteins widely found in extracts of vertebrate tissues and whose activity could be inhibited by lactose, galactose or related carbohydrates, such as *N*-acetylgalactosamine (Cooper *et al.*, 1999, Kilpatrick, 2002, Varki *et al.*, 1999). To date, in mammals, a total of 19 different galectins have been identified. They are involved in a large number of cellular functions, most notably in the regulation of cell survival. In vertebrates, galectins are found in a variety of tissues and in almost every cell type. Gal-1, for example, is widely expressed by various cell types, such as vascular endothelial cells, epithelial cells and cells from both primary and secondary lymphoid organs (Arthur *et al.*, 2015, Di Lella *et al.*, 2011, Thiemann *et al.*, 2011). Gal-3, another extensively documented galectin, is expressed in a variety of human tissues and cells, such as in normal human peripheral blood monocytes, activated macrophages, mast cells, T cells, certain epithelial cells and sensory neurons (Dumic *et al.*, 2006, F. T. Liu *et al.*, 1995, Wang *et al.*, 2016). Gal-7 is largely expressed in normal epithelial cells and is often considered a marker of epithelial differentiation (Labrie *et al.*, 2014, Madsen *et al.*, 1995). The two tandem-repeat galectins, gal-8 and -9, are expressed in vascular and lymphatic endothelial cells, and in the thymus, respectively (John *et al.*, 2016, Troncoso *et al.*, 2014). The Charcot-Leyden Crystal protein, or gal-10, is abundantly expressed in the bone marrow, the birthplace of immune cells, and in several subpopulations of immune cells (Di Lella *et al.*, 2011, Kubach *et al.*, 2007, N. G. Than *et al.*, 2009). The expression pattern and role of other galectins is, however, less well known. We do know, however, that gal-12 is predominantly expressed in adipocytes while gal-13, -14 and -16 are preferentially expressed in the placenta (Fritz *et al.*, 2015, Q. S. Yang *et al.*, 2001a, Ri-Yao Yang *et al.*, 2012).

Gal-14, also known as Placental Protein 13-like or PPL 13, is one the less well known galectins. Gal-14 is a prototype galectin with significant homology to gal-13 (Q. S. Yang *et al.*, 2001a). Galectin-14 gene is identified as *Igals14* and located within a cluster of galectin genes on the q13.2 region of chromosome 19 (N. G. Than *et al.*, 2009, Q. S. Yang *et al.*, 2001a). Although it has been mostly known for its expression in the placenta, studies with animal models have shown that gal-14 is also expressed in eosinophils from sheep, being released from these cells in response to allergen stimulation, suggesting a role of gal-14 in the regulation of eosinophils activity during allergic responses (Dunphy *et al.*, 2002). Its expression and role in cancer, however, remains largely unknown. In the present work, we provide novel insights into the

expression patterns of this galectin and explore its potential role in regulating cell survival in cancer.

## Results

### *In silico analysis of galectin-14 expression in normal and cancer tissues*

To obtain a global view of gal-14 expression in normal and cancer tissues, we first interrogated TCGA datasets. As expected, the tissue expressing the highest number of *Igals14* transcripts was the placenta as compared with other normal tissues (**Figure 2.1**). In cancer tissues, *Igals14* was expressed at a higher level in several types of cancer, including liver, breast, liver, uterine and ovarian cancer (**Figure 2.2a**). In contrast, levels of *Igals14* were relatively low in prostate, uveal, and pancreas cancer, indicating that *Igals14* expression in cancer is cancer-type specific. Analysis of *Igals14* expression in the NCI-60 panel of human cancer cell lines that is commonly used to assess the expression of specific genes in cancer confirmed that *Igals14* expression is significantly higher in human ovarian cancer cell lines when compared to other cancer cell lines (**Figure 2.2b**).

### *High expression of galectin-14 is associated with decreased survival of OC patients*

Because epithelial ovarian cancer (EOC) is an aggressive type of cancer with limited treatment options, we focused our investigations on EOC, specially high grade serous ovarian adenocarcinoma (HGSA), the most aggressive subtype of EOC. Data mining using the Expression Atlas database, an open source that allows to study expression of specific genes across tissues or cell lines showed that *Igals14* was expressed in many EOC cells lines (**Figure 2.3**). Interestingly, EOC cell lines expressing the highest level of *Igals14* were derived from patients with HGSA. This finding included OVCAR-3, a common cell model to study EOC. An overall survival curve calculated by Kaplan-Meier method showed that high levels of *Igals14* were associated with a poorer survival ( $p = 0.016$ ) (**Figure 2.4**). The expression of *Igals14* was also significantly higher in EOC tissues as compared to control (normal) tissues ( $p = 0.03$ ) (**Figure 2.5a**). Furthermore, comparison between *Igals14* expression in EOC cases that are sensitive and resistant to platinum-based treatment was very close to the threshold of significance ( $p = 0.1$ ) (**Figure 2.5b**). Whether *Igals14* expression is driven by genetic alterations in EOC cell lines is a real possibility as *Igals14* had the highest percentage of genetic amplification in EOC when compared to other members of the galectin family, most notably *Igals1* and *Igals3* (**Figure 2.6**). Genetic alterations (mostly amplifications) of *Igals14* is indeed frequently observed in serous ovarian carcinoma and correlates with a poorer survival of patients with ovarian cancer (**Supplementary figure S2.1 and S2.2**)

### *Validation of in silico data*

We next carried out PCR and Western Blot analysis to validate the expression of gal-14 at the mRNA and protein levels. We also took the opportunity to look at other less well known galectin genes, including *Igals10*, *Igals12*, *Igals13*, and *Igals16*. We first confirmed that OVCAR-3 cells readily express high levels of *Igals14* (**Figure 2.7a**). No expression was found in HL-60 cell line, a common human leukemia cell model. *Igals10* and *Igals16* were also expressed in OVCAR-3 cells, albeit at lower levels than *Igals14*. Expression of *Igals14* in EOC cell lines was also observed in TOV-1369 (TR), another HGSA cell line (Letourneau *et al.*, 2012). The TOV-1369(TR) cell line is a pre-chemotherapy cell line derived from a solid tumor (TOV) located in the fallopian tube (**Supplementary Table 2.1**). After ovarian cancer diagnosis, this patient received a treatment of paclitaxel and carboplatin for 5 months, two cycles of paclitaxel alone, 11 cycles of doxorubicin and a final treatment with Topotecan (Letourneau *et al.*, 2012). The OV-1369(R2) cell line is a metastatic cell line that was derived from the same patient at the end of the treatments (Letourneau *et al.*, 2012). Low but detectable expression of *Igals14* was also found in OV4453, another pre-chemotherapy HGSA cell line derived from ascites (OV) collected from a 70-year-old patient (Fleury *et al.*, 2015). Both patients had a prior history of breast cancer. No detectable expression was observed in A2780, an ovarian endometrioid adenocarcinoma cell line derived from an untreated patient, and SK-OV-3, a cell line derived from the ascites of a 64 year-old patient with an ovarian serous cystadenocarcinoma (Fogh *et al.*, 1977). As expected, constitutive expression of *Igals14* was observed in placenta tissues. It was also found in the AML-14-3D10, an eosinophilic cell line derived from a patient with an acute myelogenous leukemia (AML) expressed *Igals14*, consistent with previous reports showing that *Igals14* is expressed in eosinophils, but not in other lymphoid or myeloid cells, including lymphocytes and macrophages (Dunphy *et al.*, 2002).

### *Galectin-14 protein levels*

We next examined the expression of gal-14 at the protein level in EOC cell lines. First, we compared two commercially available anti-gal-14 antibodies using placenta and recombinant human gal-14. Our results showed that while both antibodies were capable of detecting gal-14 proteins, one of the antibodies showed low but detectable cross-reactivity with human gal-7 and gal-1 (**Figure 2.7c, d**). This antibody is a mouse monoclonal antibody (MAB5744, from R&D Systems) that was developed following immunization with human recombinant gal-14. The other antibody (ab150427, from Abcam) is a rabbit polyclonal antibody generated from an unknown (proprietary) peptide sequence. We thus used the Abcam antibody for the remaining of our experiments. We could not, however, detect gal-14 in protein extracts from ovarian cancer cell

lines, nor with the AML-14.3D10 cells (**Figure 2.7e**). Our results obtained following transfection of a vector encoding human gal-14 in HEK-293 embryonic kidney cells, which do not normally express *Igals14* (**Figure 2.8a**), showed that we can detect gal-14 protein form in cellular extracts (**Figure 2.8b**). This suggests that while EOC and AML-14.3D10 cells express detectable levels of *Igals14*, they do not express detectable levels of gal-14 proteins.

#### *Expression of gal-14 in HEK-293 cells*

Our experiments with HEK-293 cells provided us the opportunity to explore, for the first time, the functional role of gal-14. Given the propensity of galectins to modulate apoptosis, we first compared PARP-1 cleavage in a (empty vector) control and cells transfected with a vector encoding human gal-14. Our results showed that *de novo* expression of gal-14 significantly ( $p < 0.05$ ) increased the level of apoptosis in HEK-293 cells (**Fig. 2.8c**). It also increased apoptosis induced by low doses of etoposide, a common cancer chemotherapeutic agent (**Fig. 2.8d**). Not surprisingly, *de novo* expression of gal-14 in HEK-293 cells significantly reduced their *in vitro* growth (**Supplementary figure S2.4**).

#### **Discussion**

In this study, using *in silico* and *in vitro* approaches, we have shed some light on the expression profile of gal-14 and started to explore its potential role in cancer. During our investigation, one type of cancer caught our attention: ovarian cancer. Our findings showed that *Igals14* expression is elevated in ovarian cancer cell lines derived from patients with HGSA, the most aggressive subtype of ovarian cancer. In addition, we observed that *Igals14* harbors more genomic alterations in patients with ovarian cancer than some of its famous family relatives, such as *Igals1* and *Igals3*. We also found that high expression of *Igals14* is associated with a shorter survival of patients with EOC, consistent with its preferential expression in HGSA. Additionally, we found that gal-14 expression in ovarian cancer cell lines is detectable at the mRNA level but not at the protein level. Our findings associated with HEK-293 transfectants suggest that this inability to detect gal-14 at the protein level is most likely due to the fact that these cells express very low levels of gal-14 proteins despite the fact that *Igals14* is readily detectable. This would be consistent with our data showing that high expression of gal-14 increases basal levels of apoptosis. These results thus provide the first indications that gal-14 has a role in cell death processes. Taken together, although the study of this protein is still in its infancy, we were able to provide novel insights into the expression patterns of this galectin and its involvement in cancer.

Our *in silico* study of *Igals14* expression in normal tissues agrees with previous studies showing

that gal-14 is preferentially expressed in the placenta (N. G. Than *et al.*, 2009, N. G. Than *et al.*, 2014b, A. R. Young *et al.*, 2009). To this day, the only data available about the expression of galectin-14 in other human normal tissues was published more than 15 years ago by researchers who studied gal-14 mRNA levels in multiple tissues by Northern Blot (Q. S. Yang *et al.*, 2001a). Yang's team could not detect *Igals14* in other tissues. Our *in silico* study suggest, however, that gal-14 is possibly expressed at low levels in some tissues, most notably in adrenal and salivary glands, and possibly in the kidney and colon. Whether these low levels reflect expression in specific subpopulations within these tissues is a real possibility. Further studies using cell lines and tissue microarrays will be needed to address these issues.

Very few studies have examined the role of gal-14 in cancer. Using a gal-14-specific aptamer, Cho and colleagues have shown that gal-14 was expressed, albeit at low levels, in hepatocellular carcinoma cell lines, including SNU761, Huh-7, and SNU3058 (Y. Cho *et al.*, 2016). Interestingly, the result of our *in silico* analysis of 53,622 DNA microarray samples from 214 cancer studies shows an elevated mRNA expression of *Igals14* in several cancers, including liver cancer. Yet, one interesting finding was that increased *Igals14* expression and mutation frequency of *Igals14* were clearly evident in tumors of the female reproductive tract, including breast, uterine and ovarian cancer, including the most malignant subtypes of ovarian cancer (Koshiyama *et al.*, 2017). The involvement of galectins in female tract neoplasia has already been documented for some prototype galectins, such as gal-1 and -7. For example, increased expression of galectin-1 is found in uterine, breast, cervical, and ovarian cancers (Dalotto-Moreno *et al.*, 2013, Ege *et al.*, 2011, Kohrenhagen *et al.*, 2006, van den Brûle *et al.*, 2003, van den Brule *et al.*, 1996). Gal-7 is also expressed at abnormally high levels in breast, ovarian and cervical cancer (Carole G. Campion *et al.*, 2013, Grosset *et al.*, 2014, Labrie *et al.*, 2014, Tsai *et al.*, 2013). When it comes the proteins homologous to gal-14, -10 and -13, the data is, again, very limited. The majority of studies have focused on the role of gal-10 in eosinophil-specific processes, and the functions of gal-13 in the maternal-fetal interface and in pregnancy-related events (Chua *et al.*, 2012, De Re *et al.*, 2009, Kliman *et al.*, 2012, Sammar *et al.*, 2014). Therefore, our results are the first to give some insights into the expression of gal-14 in cancer, more specifically, in cancers of the female reproductive tract. In fact, our findings suggest that there might be an association between gal-14 and progression of EOC. The fact that *Igals14* is preferentially expressed in HGSA is particularly interesting given the limited treatment options for this subtype of cancer. Understanding the molecular mechanisms controlling expression of gal-14 will also be needed to determine which pathways controls its expression in specific tumor subtypes. It is interesting to note that the promoter of *Igals14* contains consensus sites for both Nf-kB, Sp-1, and c/EBP , all of which have

previously been shown to control expression of gal-7 in cancer cells (C. G. Campion *et al.*, 2014, Carole G. Campion *et al.*, 2013).

Our results warrant further investigations on the role of gal-14 in EOC, most notably in its potential role in controlling cell death and the apparent discrepancy between the observations that higher *Igals14* expression is associated with lower survival of patients with EOC and the pro-apoptotic role of gal-14 observed in HEK-293 cells. One possibility is that gal-14's pro-apoptotic function is cell type-specific. Another possibility is that the pro-apoptotic function of gal-14 in HEK-293 cells was due to the abnormally high levels of gal-14 following gene transfer, while EOC cells barely express the gal-14 protein, as we found in OEC cell lines, which keeps them protected from gal-14-induced apoptosis. This would explain why OV-1369(R2) cells, which were established following chemotherapy does not express gal-14 while TOV-1369(TR) (established prior to pre-chemotherapy) does. This would also explain why we were not able to detect gal-14 proteins in OVCAR-3 cells despite the presence of *Igals14*. This result was somewhat unexpected, given that transcription levels of a given gene often dictates the presence/absence of the corresponding protein. Yet, there are examples of galectins showing this type of molecular behavior. For instance, Satelli and colleagues showed that gal-1 and gal-3 proteins could not be detected in HEK-293 cells even though these cells expressed gal-1 and gal-3 mRNA (Satelli *et al.*, 2008). Similar observations were also reported with gal-8 (Satelli *et al.*, 2008). These findings support the existence of some type of translational repression mechanisms in ovarian cancer cells that keep gal-14 from being translated or specific proteolytic activity that effectively eliminates gal-14 as soon as it is synthesized.

It is becoming clear that members of the galectin family play an important role in cancer. Research over the past years has identified key roles for these lectins and their ligands in cancer immunoeediting and metastasis. We still need, however, to better understand the contribution of less well known galectins in cancer. This is particularly important for the development of anti-galectin drugs and for limiting their potential off-target effects. Overall, this preliminary study allowed us not only to provide novel insights into the expression patterns of this galectin in normal and cancer cells, but also to explore its potential role in cancer. It certainly sets the ground for future investigations of gal-14 in cancer, most notably in ovarian cancer. Although the study of gal-14 is still in its infancy, on a long-term basis, our results may contribute to the development of new and valuable anti-cancer strategies.

## Material and Methods

### *In silico analysis*

*In silico* analysis of galectin-14 expression was first conducted using datasets from the Gene Expression Omnibus (GEO) repository of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Edgar *et al.*, 2002). We examined microarray datasets obtained from profiling human normal tissues (GDS1096) (Ge *et al.*, 2005), cancer cell lines (GDS4296) (Kohn *et al.*, 2014) and ovarian cancer cells (GDS3592 and GDS4950) (Bowen *et al.*, 2009, Koti *et al.*, 2013). Additionally, other analysis were conducted using the public RNAseq datasets of large-scale cancer genomics projects obtained from the cBio Cancer Genomics Portal and the gene expression data across biological conditions from Expression Atlas database (Cerami *et al.*, 2012, Gao *et al.*, 2013, Petryszak *et al.*, 2016). The putative transcription factor binding sites (TFBS) of galectin-14 gene sequence were identified using ALGGEN PROMO, a virtual laboratory for the study of TFBS in DNA sequences (Farré *et al.*, 2003). Analysis of public RNAseq datasets from the Cancer Genome Atlas (TCGA) were also conducted to correlate the expression of galectin-14 mRNA and the overall survival of patients with ovarian cancer.

### *Cell lines, tissues, and reagents*

The A2780 and OVCAR-3 ovarian cancer cell lines were kindly provided by Dr. Eric Asselin (Université du Québec à Trois-Rivières, QC, Canada), and the AML-14.3D10 eosinophil cell line was provided by Dr. Denis Girard (INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, QC, Canada). These cells were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10 % [v/v] fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 10 mmol/L HEPES buffer, and 1 mmol/L sodium pyruvate. The SK-OV-3 ovarian cancer cell line was grown in McCoy's 5A medium supplemented with 10 % [v/v] FBS, 2mM L-glutamine and 10 mM HEPES buffer at 37°C in a humidified atmosphere containing 5 % CO<sub>2</sub>. The HEK-293 cell line was provided by Dr. Stéphane Lefrançois (INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, QC, Canada) and it was maintained in Dulbecco's modified Eagle complete medium (DMEM) supplemented with 10 % [v/v] FBS. The high grade serous (HGS) ovarian carcinoma cell lines were a generous gift from Dr. Anne-Marie Mes-Masson (CRCHUM-Université de Montréal, Montreal, QC, Canada) and they were established from the ascites of a patient (OV-4453) and from a HGS ovarian tumor of a patient before (TOV-1369TR) and after (OV-1369 (R2)) chemotherapy treatment (Fleury *et al.*, 2015, Letourneau *et al.*, 2012). These cell lines were maintained in ovarian surface epithelium (OSE) medium (Wisent, QC, Canada) supplemented with 10 % [v/v] fetal bovine serum. All cell culture products were purchased from Life Technologies (Burlington, ON, Canada). The

placenta tissue was provided by Dr. Cathy Vaillancourt (INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, QC, Canada).

#### *RNA isolation and RT-PCR analysis*

Total cellular and tissue RNA were 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, the cDNAs were amplified by PCR with genes specific primers (see Table 1) and using the following conditions: 94°C for 3 minutes, followed by 30 to 35 cycles of the following: 94°C for 60 sec, 62°C (*GAPDH*) and 65°C (*Igals14*) for 60 sec, and 72°C for 60 sec, followed by a final extension step at 72°C for 10 minutes. PCR was performed in a thermal cycler (MJ Research, Watertown, MA). The amplified products were analyzed by electrophoresis using 1.5 % [w/v] agarose gels, SYBR Safe (Life Technologies) DNA gel staining and UV illumination.

#### *Western blot analysis*

For whole cell extracts, cells were homogenized and resuspended in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) lysis buffer (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) containing a cocktail of protease inhibitors (Roche, Laval, QC, Canada). For placenta extracts, the tissue was dissected, cut and homogenized in RIPA buffer with protease inhibitor, followed by centrifugation at 13,000 x g for 15 minutes at 4°C to pellet cell debris and collect lysate. Equal amounts of whole-cells and tissue extract (20-60 µg) were separated on 15 % SDS-polyacrylamide gel and transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada). The membranes were first blocked with 5 % milk [w/v] in TBS/0.05 % Tween 20 [v/v] for 60 min at room temperature and subsequently blotted overnight at 4° C with primary antibodies (see Table 2). Secondary antibodies consisted of horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit (GE Healthcare, Buckinghamshire, England), donkey anti-goat (R&D Systems) or sheep anti-mouse (GE Healthcare) IgG. Detection of immunoblots was performed by the enhanced chemiluminescence method using ECL detection reagent (GE Healthcare).

#### *Transfection and apoptosis assays*

The vector encoding human Gal-14 gene (HG11371-CH) was obtained from Sino Biological (North Wales, PA, USA). The plasmid encoding human Gal-7 gene was obtained through the cloning of galectin-7 cDNA into srα eukaryotic expression vector using *SpeI* and *BamHI* restriction enzymes

as previously described (Campion et al. 2014). The controls were generated using the empty PCMV3 and Sr $\alpha$  vectors. For transient transfection, the HEK-293 cells were plated at equal densities 24h prior to transfection and then transfected with the indicated vectors using the Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. After 24h, transfected cells were treated with increasing concentrations of etoposide (0–200  $\mu$ M) for 24h. Cells were lysed with 50  $\mu$ L of RIPA buffer containing protease inhibitor at 4°C for 30 min and centrifuged at 13,000 x *g* for 15 min at 4°C. Equal amounts of protein were then separated and processed by Western Blotting following to the protocol previously described. Nitrocellulose blotting membranes were then probed with a rabbit anti-Poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP)-1 polyclonal antibody (1:1000; Epitomics, Burlingame, CA, USA) and a mouse anti- $\beta$ -actin antibody (1:10000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), followed by incubation with secondary antibodies and chemiluminescence detection.

### *Statistics*

Statistical significance of the experiments was evaluated using the unpaired Student's t-test. Results were considered statistically significant at  $P \leq 0.05$ .

**Financial support:** This study was supported by the National Science and Engineering Research Council of Canada (Grant No. 298215-2012). The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Acknowledgments :** The authors wish to thank Drs. E. Asselin and Anne-Marie Mes-Masson for providing cell lines. They also thank Ms. Marlène Fortier for her technical help.

## Figure legends

**Figure 2.1: Expression of *Igals14* in normal human tissues.** Data were generated using the publicly available GeoProfile database.

**Figure 2.2: *Igals14* expression in cancer tissues and cell lines.** (A) mRNA expression of *Igals14* from 53,622 samples in 214 studies. (B) Human *Igals14* expression in the NCI-60 cancer cell lines.

**Figure 2.3: Expression of *Igals14* in human ovarian cancer cell lines.** Data were obtained from the Expression Atlas database. HGSA; high-grade serous adenocarcinoma; OC; ovarian carcinoma; CA; ovarian cystadenocarcinoma; SA; ovarian serous adenocarcinoma; CCA; ovarian clear cell adenocarcinoma; SCA; ovarian serous cystadenocarcinoma.

**Figure 2.4: Kaplan-Meier survival analysis.** Five-year OS of ovarian cancer patients with low or high expression of galectin-14 mRNA. Five-year overall survival (OS) of ovarian cancer patients according to *Igals14* expression levels. Data were obtained from the TCGA database.

**Figure 2.5: Expression of *Igals14* in ovarian cancer significantly higher than expression in normal ovarian epithelial cells.** (A) Expression in normal and cancer ovarian epithelia. (B) Expression in high grade serous ovarian cancer according to resistance to platinum-based chemotherapy. Error bars represent SEM. All data were obtained from Geoprofile microarray datasets.

**Figure 2.6: Genomic alterations in galectin genes in ovarian cancer.** Galectin mutations across a set of ovarian serous cystadenocarcinoma cases.

**Figure 2.7: Galectin-14 expression in ovarian cancer cell lines.** (A) mRNA expression of less well known galectins in OVCAR-3 and HL-60 cells. (B) The expression profile of *Igals14* in various EOC cell lines as measured by standard RT-PCR. DNA sequencing confirmed the identity of the amplicons (**Supplementary figure S3**) (C) Validation of gal-14-specific commercial antibodies by Western Blot. (D) Western Blot analysis of gal-14-specific antibodies against recombinant human

gal-1, gal-7, and gal-14. (E) Galectin-14 protein expression profile in various EOC cell lines as measured by Western Blot.

**Figure 2.8: Parp-1 expression in HEK-293 transfectants.** (A) RT-PCR analysis of *Igals14* in HEK-293 cells. (B) Validation by Western Blot of successful transfection of plasmid encoding *Igals14* in HEK-193 cells. Placenta was used as positive control. (C) Western Blot analysis of cleaved Parp-1 in transfected HEK-293 cells. (D) Parp-1 cleavage in transfected HEK-293 cells treated with increasing doses of Etoposide for 24h.

FIGURE 2.1

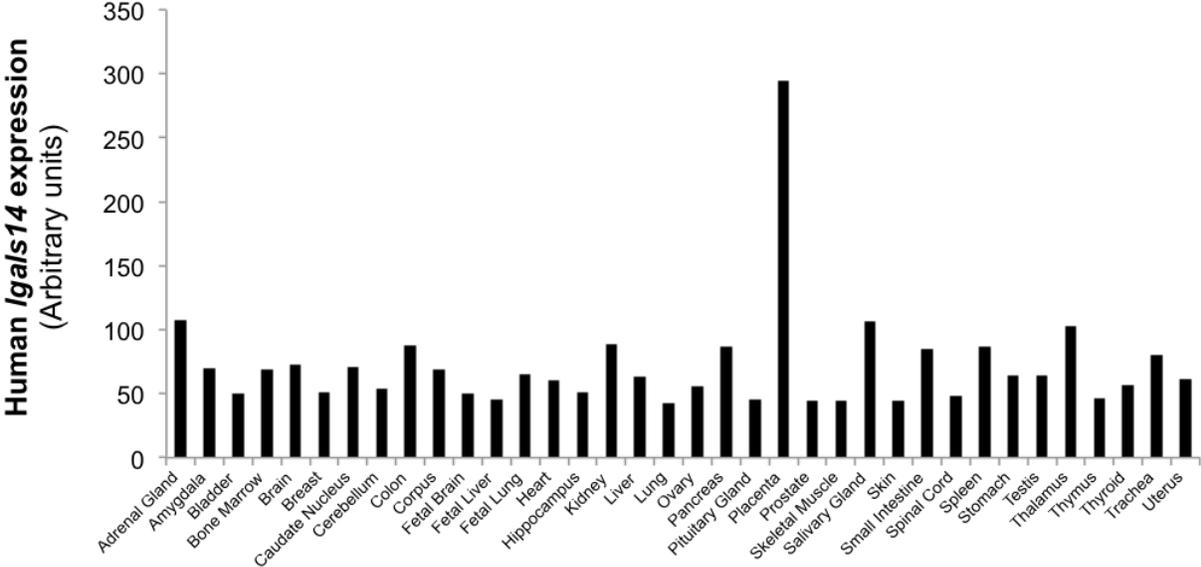
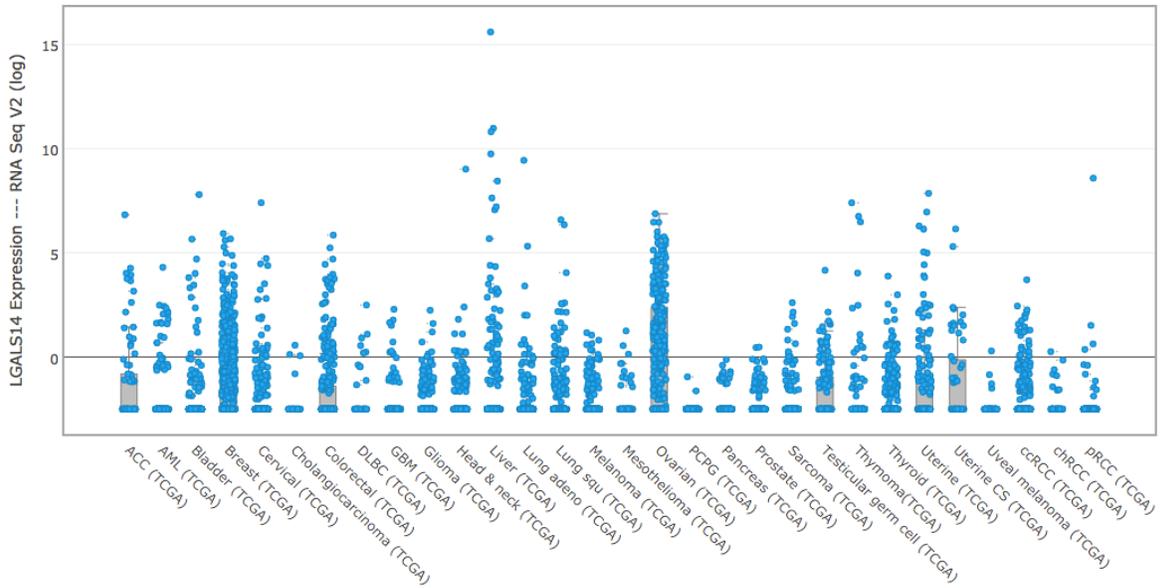


FIGURE 2.2

**A**



**B**

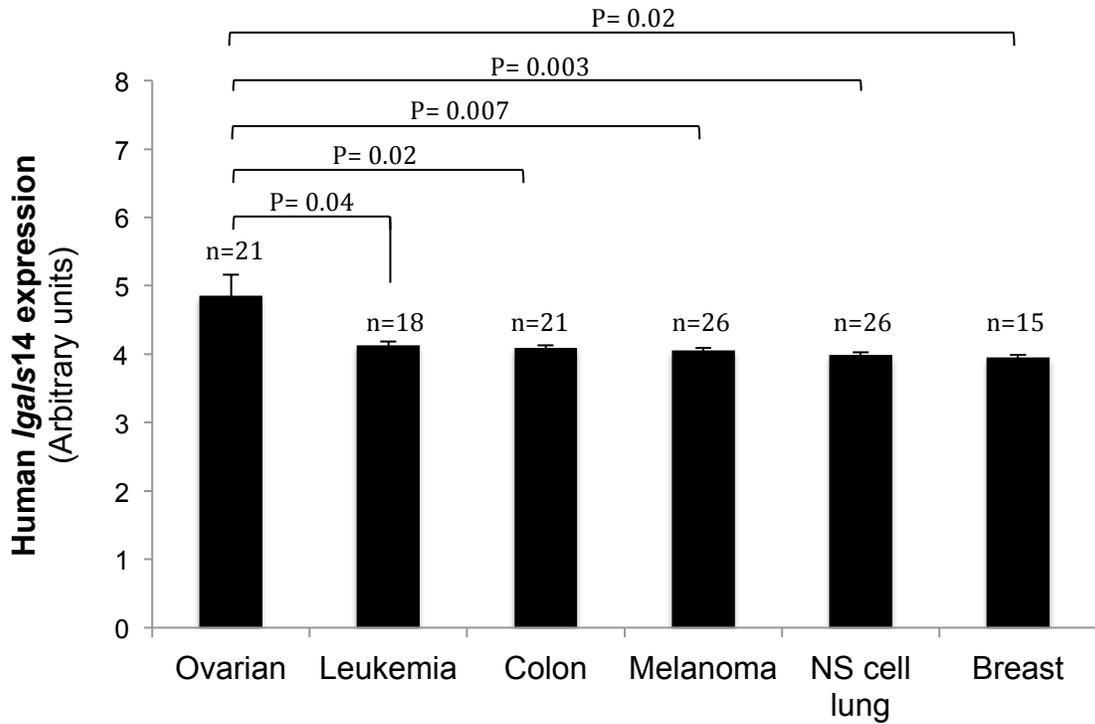


FIGURE 2.3

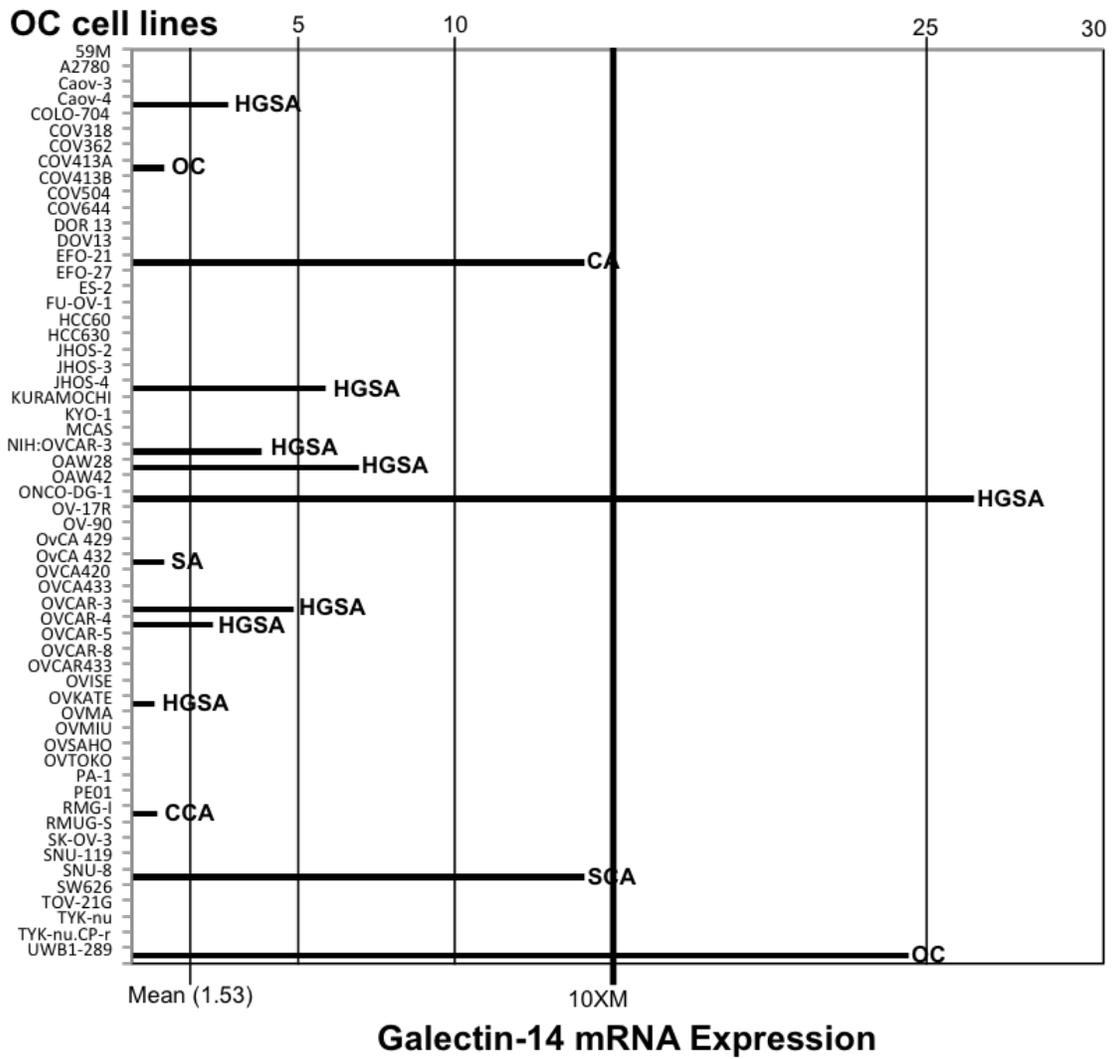


FIGURE 2.4

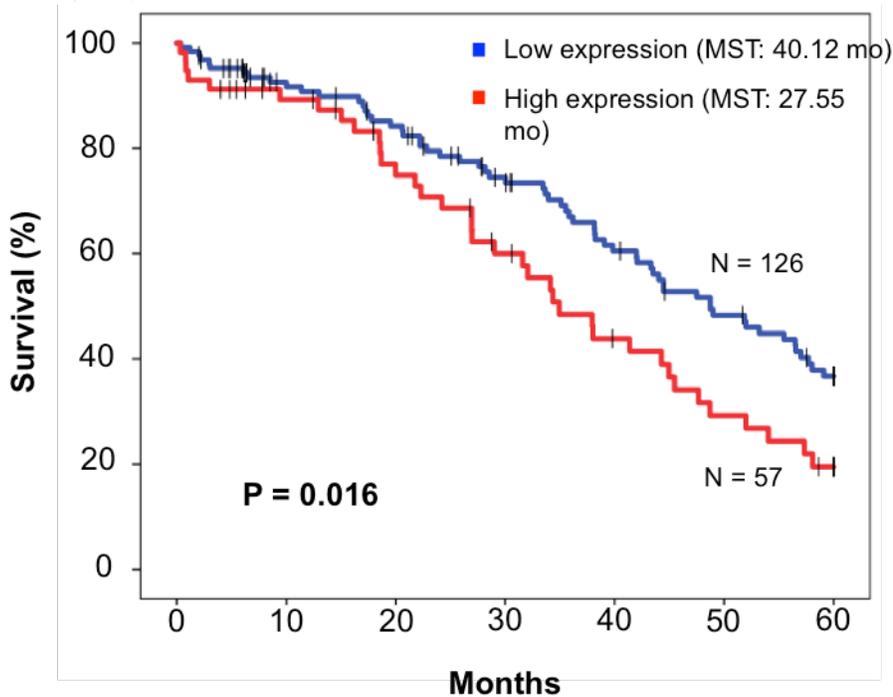
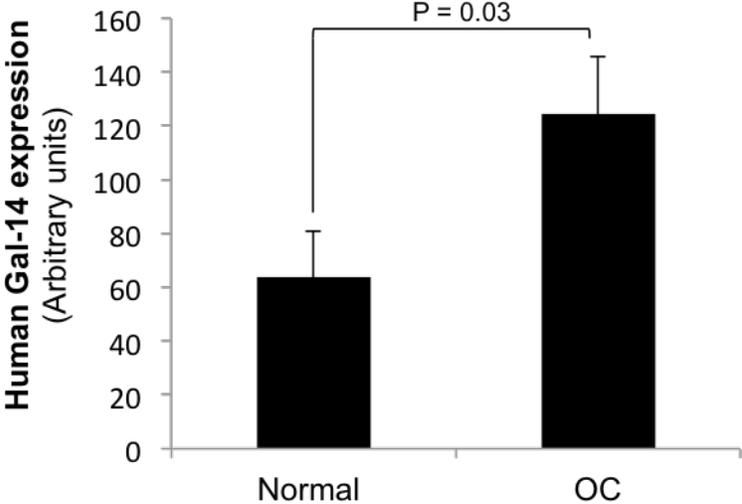


FIGURE 2.5

**A**



**B**

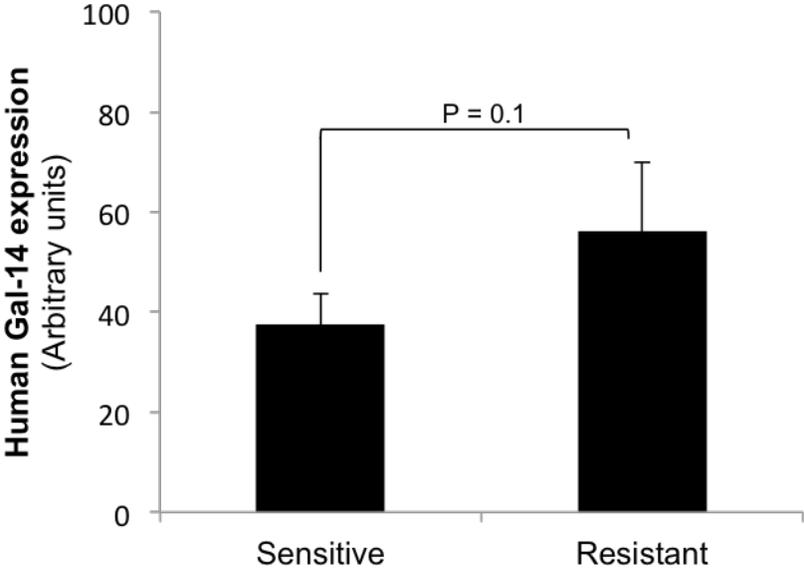


FIGURE 2.6

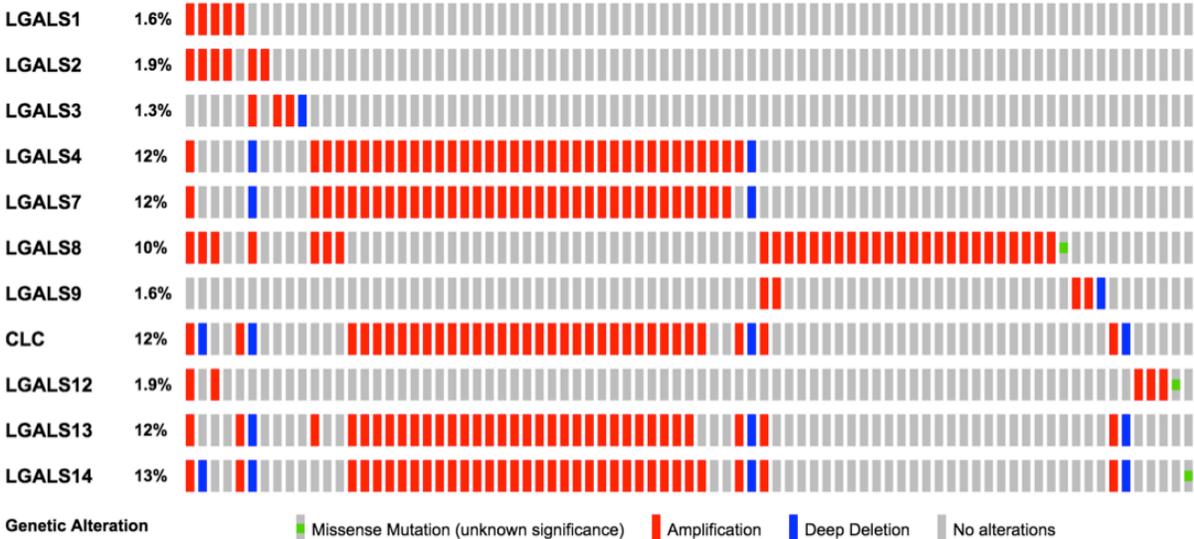
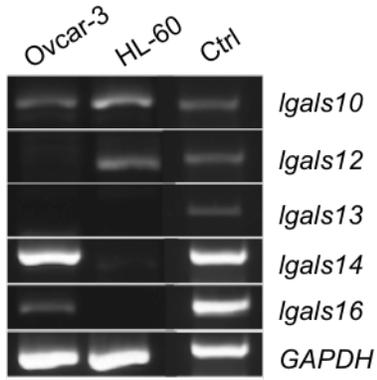
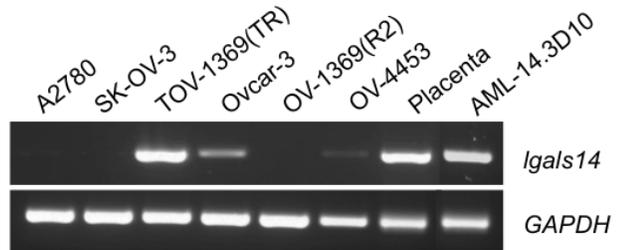


FIGURE 2.7

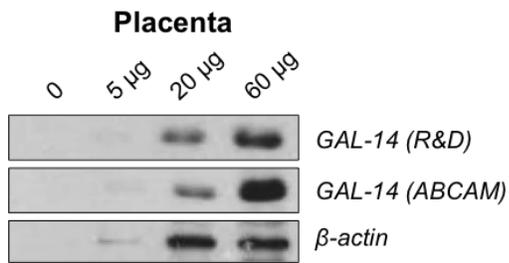
**A**



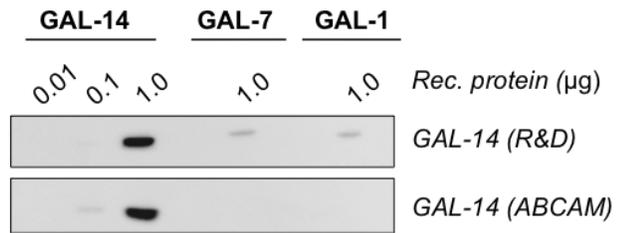
**B**



**C**



**D**



**E**

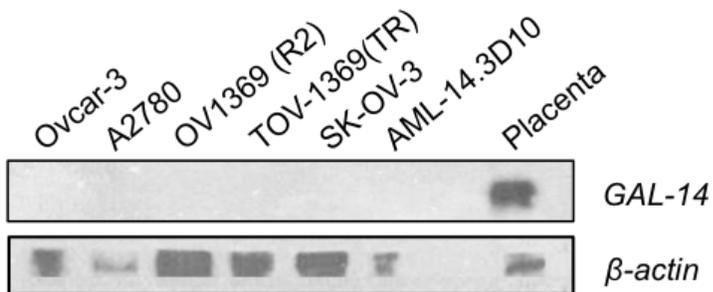
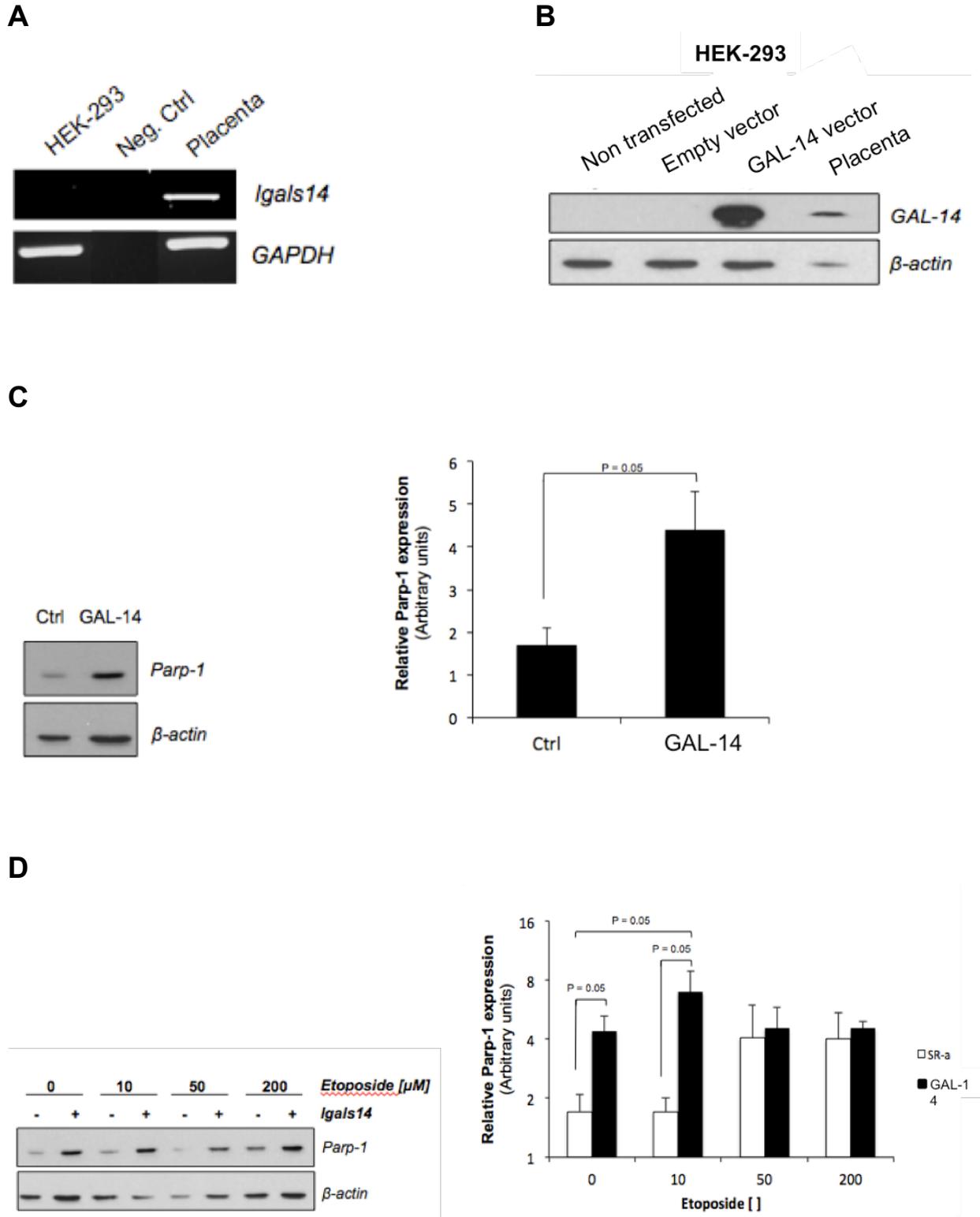


FIGURE 2.8



## Supplementary figure legends

**Figure S2.1: *Igals14* alterations in cancer.** Data were obtained from the cBioportal database (cumulative data from 214 studies).

**Figure S2.2: Overall survival of ovarian cancer patients according to the presence of genetic alterations in *Igals14*.** Data were obtained through TCGA database.

**Figure S2.3: Validation of amplicons using gal-14-specific primers.**

**Figure S2.4: Cell proliferation following *de novo* expression of *Igals14*.** HEK-293 cells were seeded into a 12-well-plate and counted at the indicated time using trypan-blue staining. The results are representative of four independent experiments.

FIGURE S2.1

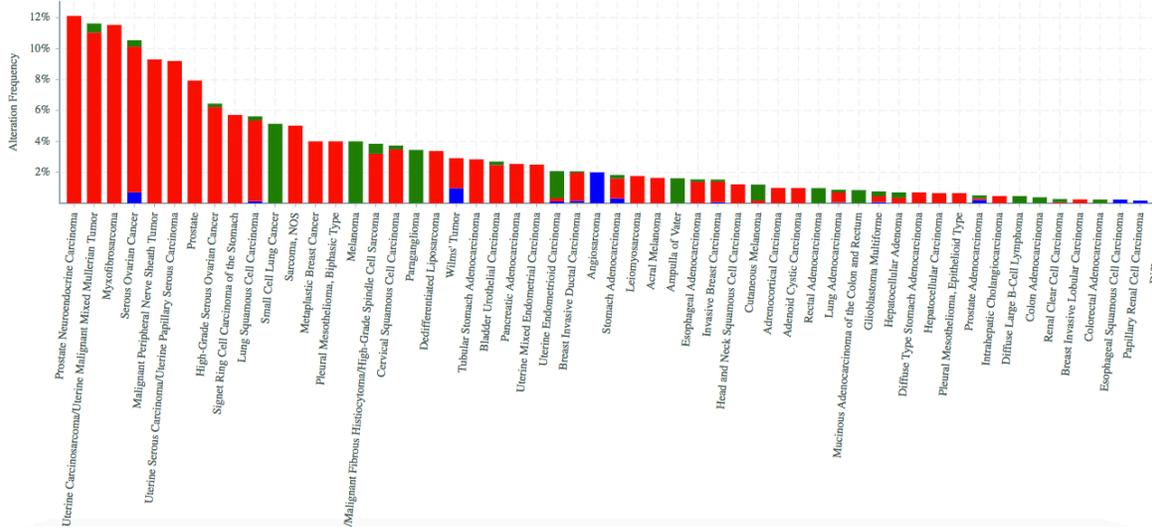


FIGURE S2.2

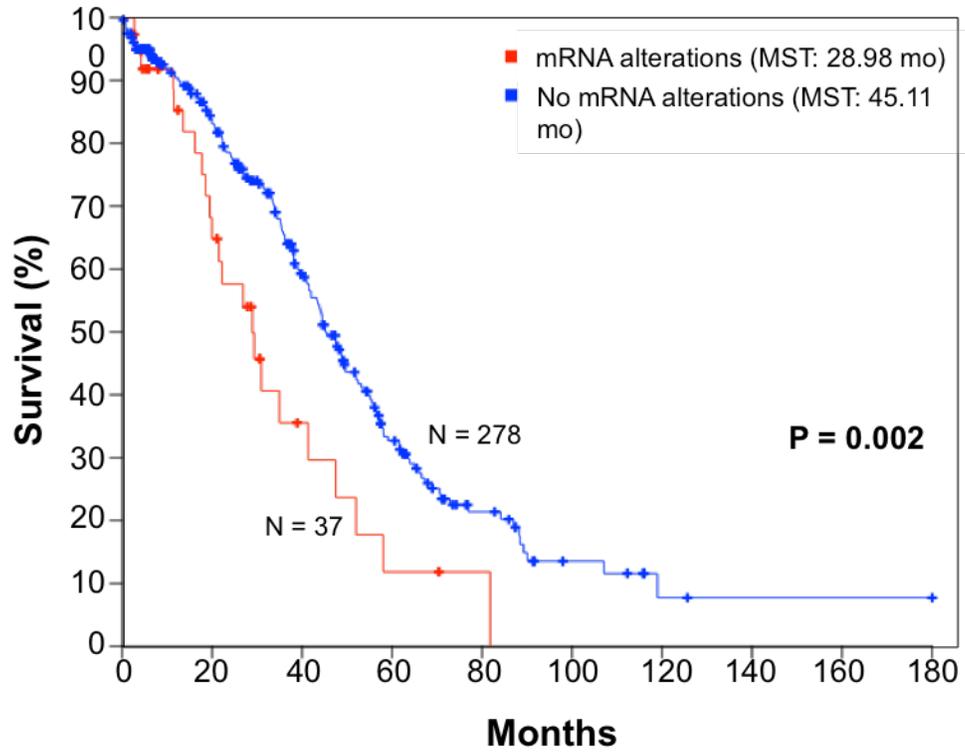
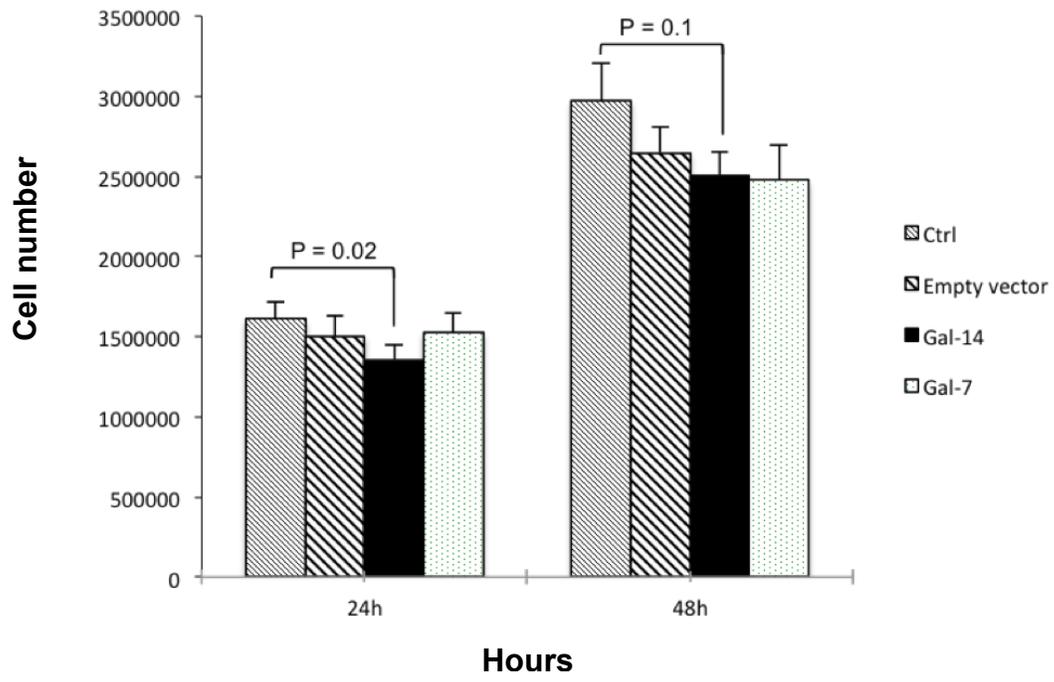


FIGURE S2.3

```
>ID|10573419 Lgals14bp439tov_P1613091_012.ab1  
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNgagggattcctcacNatgaggagttotgatcat  
ctccctcaatcgctgataagcactctgggtcagggagatatctctgaagacttgcagcatc  
ttcacagatgctggcggggaatcgatgggcaaagtgtgaaatgcggttgccatttaccatt  
accttgtattccttgtgacgcacatagatgcacagctcaaattggtttgccatottcaaag  
ggtaaatagttagcatttctctcatatctccatattgccaacacacaactgttcatgatt  
gcaggatgaccaaagtgcagtcggaattggaaagcaatatctgagtcctcatoccatocca  
gtgtagaaattcacctccagctgtgggtccttgacaaaagtgaNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
```

Accession	Title	Identity	Alignment length	Seq. start	Seq. stop
<a href="#">NM_020129.2</a>	Homo sapiens galectin 14 (LGALS14), transcript variant 1, mRNA	99.47%	376	306	681
<a href="#">NM_203471.1</a>	Homo sapiens galectin 14 (LGALS14), transcript variant 2, mRNA	99.47%	376	611	986

FIGURE S2.4



SUPPLEMENTARY TABLE S2.1

<b>Cell line</b>	<b>Origin</b>	<b>Subtype</b>	<b>Info</b>
<b>A2780</b>	Ovarian carcinoma	Serous	Established from tumour tissue from an untreated patient
<b>Ovcar-3</b>	Adenocarcinoma	Serous	Established from the malignant ascites of a patient (Caucasian/ female/ 60 years) with progressive adenocarcinoma of the ovary.
<b>SK-OV-3</b>	Adenocarcinoma	Serous	Derived from ascites from a 64-year-old patient.
<b>TOV1369( TR)</b>	Cystadenocarcinoma	High-grade serous papillary Advanced stage (G3, IIIC)	Derived from fallopian tube from a 58-year-old patient. Pre-chemotherapy cell line. (TOV = solid/invasive tumor / TR = fallopian tubes). Patient with breast cancer + chemotherapy 14 months before
<b>OV1369(2)</b>	Cystadenocarcinoma	High-grade serous papillary Advanced stage (G3, IIIC)	Post-chemotherapy cell line. OV = ascites Patient had breast cancer + chemotherapy 14 months before
<b>OV4453</b>	Adenocarcinoma	High grade serous	Derived from ascites from a 70-year-old patient. Previous history of breast cancer (5 years before).

## **CHAPITRE 3**

### **DISCUSSION GÉNÉRALE**

### **3.1. Sommaire des résultats**

Ce projet de recherche a permis de mettre en évidence une protéine peu connue, la galectine-14. Plus spécifiquement, nous avons pu étudier, par des approches *in silico* et *in vitro*, l'expression génique et protéique de cette galectine dans les cellules cancéreuses, et commencer à explorer son rôle dans le cancer. Lors de l'étude de cette galectine dans les tumeurs, un type de cancer a retenu notre attention: le cancer de l'ovaire. Nos résultats démontrent que l'expression de l'ARNm de la galectine-14 est élevée dans certaines lignées de cellules cancéreuses ovariennes, en particulier celles qui représentent le sous-type séreux de haut grade, le sous-type le plus agressif du cancer ovarien. De plus, nous avons observé que la galectine-14 présente plus d'altérations génomiques dans le cancer de l'ovaire que plusieurs autres membres de la famille des galectines, notamment les plus connues, comme galectines-1 et -3. Globalement, nos résultats démontrent qu'il existe une corrélation entre l'expression de l'ARNm de galectine-14 et le taux de survie chez les patients atteints du cancer de l'ovaire. On retrouve d'ailleurs une expression au niveau de l'ARNm de la galectine-14 dans plusieurs lignées de cellules cancéreuses ovariennes humaines. De plus, nous avons pu observer une augmentation de l'activité apoptotique des cellules HEK-293 exprimant des niveaux élevés de galectine-14, ce qui suggère un rôle possible de cette galectine dans les processus de mort cellulaire. Ainsi, bien que l'étude de cette protéine n'en soit qu'à ses débuts, nous avons été en mesure de fournir de nouvelles connaissances sur les modes d'expression de cette galectine et son implication dans le cancer.

### **3.2. Nouveaux aperçus sur la galectine-14**

#### **3.2.1. Expression de la galectine-14 dans les tissus normaux**

Certaines des rares études antérieures sur la galectine-14 avaient démontré que l'ARNm de cette galectine est principalement exprimé dans l'interface materno-fœtale humaine (N. G. Than *et al.*, 2009, N. G. Than *et al.*, 2014b). Nos résultats, tant *in silico* qu'*in vitro*, appuient les conclusions de ces études concernant l'expression placentaire de la galectine-14. En fait, tout au long de ce projet de recherche, des extraits de tissus placentaires et des lysats ont été utilisés comme témoins positifs pour toutes les expériences impliquant la galectine-14. De plus, le résultat de notre analyse *in silico* de 36 microarrays d'ADN de tissus normaux a non seulement confirmé l'évidence d'une expression placentaire élevée de cette galectine, mais a également fourni plus d'informations sur son expression en ARNm dans les autres tissus.

Jusqu'à récemment, les seules données disponibles sur l'expression de la galectine-14 dans d'autres tissus humains normaux avaient été publiées il y a plus de 15 ans par les chercheurs qui ont isolé cette galectine pour la première fois (Q. S. Yang *et al.*, 2001a). Yang et ses collègues ont analysé l'expression de l'ARNm de la galectine-14 dans plusieurs tissus par Northern Blot et ont rapporté une expression marquée de l'ARNm dans le placenta, tandis que les autres tissus (cœur, cerveau, poumon, foie, muscle squelettique, rein et pancréas) ne présentaient aucun signal détectable d'hybridation. Nos résultats *in silico* complètent ces résultats en montrant que l'ARNm de la galectine-14 est en fait présent dans tous ces tissus humains et 29 autres. Cependant, le niveau d'expression de cette galectine dans d'autres tissus est très réduit par rapport au placenta, ce qui pourrait être la raison pour laquelle l'équipe de Yang n'a pu la détecter par Northern Blot.

### **3.2.2. Anticorps contre la galectine-14**

L'expression protéique de la galectine-14 a également été étudiée dans ce projet. Il n'existe pratiquement aucune donnée dans la littérature sur l'expression de cette galectine au niveau des protéines. À ce jour, la seule étude ayant analysé la galectine-14 au niveau protéique a été publiée en 2016 par une équipe de chercheurs du collège de médecine de l'Université Nationale de Séoul en République de Corée (Y. Cho *et al.*, 2016). Dans leur étude, ils ont étudié le potentiel thérapeutique de l'aptamère AS1411, un petit oligonucléotide synthétique qui se lie aux protéines cibles surexprimées à la surface des cellules cancéreuses, plus particulièrement dans les cellules de carcinome hépatocellulaire. Ils ont examiné des molécules modulées dans les cellules d'hépatocarcinome (HCC) par l'AS1411, et l'une d'entre elles était la galectine-14. Grâce à l'analyse d'immunoblot, ils ont vérifié une augmentation de l'expression protéique de cette galectine par les aptamères AS1411 et confirmé que la galectine-14 a un rôle fonctionnel dans la prolifération du HCC (Y. Cho *et al.*, 2016). Il est intéressant de noter que cet article mentionne tous les anticorps primaires utilisés dans les dosages d'immunoblot, à l'exception de l'anticorps primaire anti-galectine-14. Par conséquent, dans le cadre de notre projet, afin d'étudier l'expression protéique de la galectine-14 dans le placenta et d'autres cellules, nous avons obtenu deux anticorps anti-galectine-14 disponibles sur le marché auprès de sociétés bien établies (R&D et ABCAM) et les avons validés.

La validation des anticorps consiste à démontrer, au moyen d'analyses de laboratoire, que les anticorps sont spécifiques, sensibles et sélectifs dans le contexte pour lequel ils seront utilisés (Bordeaux *et al.*, 2010). Ce type de validation est important surtout en ce qui concerne les anticorps dirigés contre les membres de la famille des galectines, qui sont connus pour leurs

propriétés structurales similaires et leur acides aminés conservés en commun (Barjon *et al.*, 2012). Pour cette raison, afin de s'assurer que les anticorps ne réagissent pas avec d'autres membres de la famille des galectines, nous avons vérifié leur spécificité et, aussi, leur sensibilité. Nos résultats démontrent que les deux anticorps sont capables de détecter la galectine-14 recombinante, mais l'anticorps de la compagnie R&D (MAB5744-SP) réagit avec la galectine-1 et -7 humaine recombinante. Par contre, l'anticorps de la compagnie ABCAM (ab150427) a non seulement démontré une réactivité spécifique à la galectine-14, mais il a également démontré une plus grande sensibilité en détectant des concentrations plus faibles de cette galectine. Ces résultats nous ont permis de déterminer le meilleur anticorps pour détecter la galectine-14 dans les tissus placentaires et les lysats cellulaires, comme nous le verrons dans les sujets suivants.

### **3.2.3. Galectine-14 recombinante**

La production et la purification de la galectine-14 recombinante ont constitué un défi dans le cadre de ce projet. Les protéines recombinantes sont des protéines codées par un ADN recombinant qui a été introduit artificiellement dans un système qui soutient l'expression du gène et la synthèse des protéines (Wingfield, 2015). La production et la purification de protéines recombinantes impliquent de nombreuses étapes qui vont du clonage du gène approprié dans un vecteur d'expression à l'isolement des protéines synthétisées par des méthodes de purification par affinité (Schumann *et al.*, 2004, Wingfield, 2015). Le protocole que nous avons suivi pour l'expression et l'isolement de la galectine-14 recombinante comportait toutes les étapes nécessaires et standard pour l'expression des galectines recombinantes et il avait été utilisé avec succès par de nombreuses équipes, y compris la nôtre. Cependant, nos tentatives de production et de purification d'une grande quantité de galectine-14 recombinante à l'aide de colonnes de lactose standard n'ont pas eu de succès. Nous avons également essayé différentes stratégies pour optimiser l'expression et la purification des protéines, y compris la solubilisation des corps d'inclusion, la modification du temps d'incubation et les étapes d'élution, toutes sans succès. Une explication possible de ce problème pourrait être le fait que la galectine-14, un peu comme la galectine-13 et la galectine-10, se distingue de la majorité des galectines humaines en présentant plus de deux changements dans les résidus d'acides aminés conservés situés dans le site de liaison du ligand de leurs CRDs (Guardia *et al.*, 2011). Des études antérieures ont démontré que les altérations des positions canoniques entraînent des variations dans la spécificité de liaison au sucre des galectines, entraînant ainsi une réduction ou l'élimination complète de la préférence de liaison au lactose si courante dans cette

famille de protéines (Römer *et al.*, 2011, Vasta *et al.*, 2012). Ces variations pourraient expliquer pourquoi la galectine-13 ne se lie pas à les  $\beta$ -galactosides et la galectine-10 a une préférence pour le mannose au lieu du lactose (Su *et al.*, 2018a, Swaminathan *et al.*, 1999, N. G. Than *et al.*, 1999).

Les données récemment publiées sur la galectine-13 jettent un peu de lumière non seulement sur ce membre de la famille des galectines, mais aussi sur la galectine-14, étant donné la similarité de 78 % des acides aminés entre les deux galectines (Guardia *et al.*, 2011, Su *et al.*, 2018b, Q. S. Yang *et al.*, 2001a). Ces nouvelles découvertes présentent la galectine-13 comme un nouveau type de galectine prototypique ayant des caractéristiques distinctes qui impliquent une structure homodimère unique, des résidus distincts au site de liaison des glucides avec une substitution d'acides aminés cruciale pour la liaison du lactose, et une affinité inexistante pour les glucides (lactose, arabinose, maltose et saccharose) définie par leurs résultats de chromatographie d'affinité (Su *et al.*, 2018b). Cette nouvelle information sur la galectine-13 combinée à son homologie avec la galectine-14 nous permet de soulever que la galectine-14 pourrait avoir un comportement similaire et présenter une affinité faible ou inexistante pour les  $\beta$ -galactosides. Cela pourrait expliquer pourquoi nos tentatives de purification de la galectine-14, par chromatographie d'affinité standard utilisant des colonnes de lactose, ont échoué. Par conséquent, la solution à notre problème pourrait impliquer la construction d'un plasmide avec un His-tag dans l'extrémité N-terminale de la galectine-14 et, après expression, la purification de la protéine recombinante en utilisant une colonne d'agarose Ni-NTA, qui est couramment utilisée pour la purification par affinité des protéines portant un His-tag. Une autre façon de tenter de résoudre notre problème pourrait être d'utiliser une colonne d'affinité mannose au lieu d'une colonne de lactose. Cette solution est basée sur le fait que la galectine-14 partage également l'identité des acides aminés avec la galectine-10, plus spécifiquement 67 % de similarité de séquence (Guardia *et al.*, 2011, Q. S. Yang *et al.*, 2001a). Semblable à la galectine-13, la galectine-10 est un autre galectine prototypique ayant des caractéristiques distinctes qui la distinguent des autres membres de la famille des galectines et des propriétés uniques, telles que leur façon inhabituelle de former des dimères et leur préférence pour le mannose plutôt que pour les  $\beta$ -galactosides (Steven J. Ackerman *et al.*, 2002, Su *et al.*, 2018a, Swaminathan *et al.*, 1999). Ainsi, compte tenu du caractère unique de la galectine-10 et de la galectine-13, de leur similarité avec la galectine-14 et de notre incapacité à isoler la galectine-14 recombinante avec un protocole standard qui fonctionne bien avec les autres galectines, il est raisonnable de percevoir la galectine-14 comme un nouveau type de galectine prototype ayant également une expression et des propriétés distinctes.

### 3.2.4. Galectine-14 dans le cancer

Un grand nombre d'études suggèrent que les galectines jouent un rôle important dans la progression du cancer et c'est pourquoi l'un de nos objectifs dans ce projet était d'étudier l'implication de la galectine-14 dans le cancer. La présence des galectines les plus connues, galectine-1 et galectine-3, dans différentes tumeurs malignes a été largement documentée. En général, leur expression est régulée à la hausse ou à la baisse en fonction de facteurs tels que le type de tumeur, et leurs fonctions impliquent la modification de divers aspects de la progression du cancer, comme l'immunomodulation, l'angiogenèse, les métastases et le microenvironnement tumoral (Camby *et al.*, 2002, Camby *et al.*, 2006, Chou *et al.*, 2018, Danguy *et al.*, 2002, Gordon-Alonso *et al.*, 2017, Fu-Tong Liu *et al.*, 2005). En ce qui concerne les galectines moins connues, en particulier la galectine-14, leur participation au cancer est peu connue. À ce jour, les travaux de Cho *et al.* sont la seule étude qui a évalué l'expression de la galectine-14 dans les cellules cancéreuses, plus spécifiquement dans les cellules de carcinome hépatocellulaire (Y. Cho *et al.*, 2016). Certaines de leurs découvertes ont révélé que l'ARNm et la protéine de galectine-14 sont exprimés dans les cellules SNU-761, une lignée cellulaire HCC, et que leur expression varie dans des conditions normoxiques ou hypoxiques (Y. Cho *et al.*, 2016). Fait intéressant, le résultat de notre analyse *in silico* de matrices provenant de 214 études sur le cancer montre une expression élevée d'ARNm de la galectine-14 dans certains cancers, dont le cancer du foie, ce qui confirme les conclusions de Cho et ses collègues. De plus, nos résultats *in silico* ont également révélé une augmentation de l'expression et de la fréquence de mutation de *Igals14* dans les tumeurs de l'appareil reproducteur féminin, en particulier le cancer du sein, de l'utérus et de l'ovaire, y compris les sous-types les plus malins du cancer ovarien (Koshiyama *et al.*, 2017).

L'implication des galectines dans la néoplasie du tractus génital féminin a déjà été documentée et certaines galectines prototypiques, comme la galectine-1 et la galectine-7, semblent présenter des effets fonctionnels dans les cancers de l'appareil génital féminin. Par exemple, l'expression accrue de la galectine-1 se retrouve dans les cancers de l'utérus, du col de l'utérus et de l'ovaire, en plus de se retrouver dans le cancer du sein (Dalotto-Moreno *et al.*, 2013, Ege *et al.*, 2011, Kohrenhagen *et al.*, 2006, van den Brûle *et al.*, 2003, van den Brule *et al.*, 1996). La galectine-7 est également détectée et régulée à la hausse dans le cancer du sein, de l'ovaire et du col de l'utérus (Carole G. Campion *et al.*, 2013, Grosset *et al.*, 2014, Labrie *et al.*, 2014, Tsai *et al.*, 2013). Lorsqu'il s'agit des protéines homologues de la galectine-14, les galectine-10 et galectine-13, les données sont, à nouveau, très limitées. La majorité des études

ont porté sur le rôle de la galectine-10 dans les processus spécifiques aux éosinophiles, et sur les fonctions de la galectine-13 dans l'interface mère-foetus et dans les événements liés à la grossesse (Chua *et al.*, 2012, De Re *et al.*, 2009, Kliman *et al.*, 2012, Sammar *et al.*, 2014). Nos résultats permettent ainsi d'avoir un premier aperçu de l'expression de la galectine-14 dans le cancer, plus particulièrement dans les cancers de l'appareil reproducteur féminin.

### **3.3. Expression dans le cancer de l'ovaire**

Dans notre étude sur l'implication de la galectine-14 dans les néoplasies, un type de cancer a retenu notre attention : le carcinome ovarien. Nos résultats suggèrent qu'il pourrait y avoir une association entre la galectine-14 et cette malignité gynécologique mortelle. Tout d'abord, nous avons observé que la surexpression de *Igals14* est corrélée à une faible taux de survie globale des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire. Cette constatation concorde avec les données d'études antérieures qui ont démontré et documenté l'expression d'autres galectines du type prototype dans le cancer de l'ovaire. Par exemple, l'analyse *in silico* a révélé une corrélation significative entre la surexpression de l'ARNm de la galectine-7 et une survie globale à quinze ans plus faible chez les patientes atteintes d'un cystadénocarcinome séreux ovarien (Labrie *et al.*, 2014). De même, d'autres études ont démontré que la surexpression de la galectine-1 est associée à un mauvais pronostic de cancer épithélial de l'ovaire (CEO) et à une taux de survie sans progression plus bas, ce qui suggère que cette galectine participe à la progression du CEO (H. J. Kim *et al.*, 2012, Schulz *et al.*, 2017, Zhang *et al.*, 2014).

Les études *in silico* de matrice d'expression de *Igals14* comparant l'épithélium ovarien normal et dans les cellules tumorales, à partir d'adénocarcinomes papillaires ovariens séreux, nous ont permis de mieux comprendre le niveau d'expression de la galectine-14 dans ces deux conditions. Les résultats que nous avons obtenus montrent que l'expression de l'ARNm de la galectine-14 est significativement plus élevée dans les cellules cancéreuses que dans les cellules ovariennes saines. De plus, l'analyse *in silico* de l'expression de *Igals14*, cette fois avec 57 lignées différentes de cellules cancéreuses ovariennes humaines, a démontré un profil d'expression hétérogène pour ce gène. Cela signifie que bien que l'ARNm de la galectine-14 ne soit pas détectable dans certaines lignées cellulaires, il est exprimé à des niveaux plus élevés dans d'autres lignées cellulaires, en particulier dans les lignées cellulaires représentant le sous-type le plus agressif du cancer ovarien: le carcinome ovarien séreux de haut grade (SHG) (Mitra *et al.*, 2015, Vang *et al.*, 2009). Nos données *in vitro*, issues d'expériences sur des lignées de cellules cancéreuses ovariennes humaines, confirment ces résultats en montrant que si *Igals14*

n'est pas détectable dans certaines lignées cellulaires, il est aussi facilement exprimé dans d'autres, en particulier les lignées cellulaires SHG comme TOV-1369 (TR). Il est donc possible que la galectine-14 présente un comportement d'expression dans le cancer de l'ovaire similaire à celui d'une autre galectine prototypique, la galectine-7. Cette possibilité est appuyée par des études antérieures sur l'expression de la galectine-7 dans le cancer de l'ovaire démontrant que celle-ci n'est pas détectée dans les tissus ovariens normaux, mais qu'elle présente une expression accrue dans les tumeurs malignes, particulièrement dans les tumeurs de haut grade (Labrie *et al.*, 2014, Schulz *et al.*, 2017).

Il est intéressant de noter que nous n'avons pas été en mesure de détecter la galectine-14 au niveau de la protéine dans les cellules de cancers ovariens en utilisant des techniques d'immunobuvardage, malgré la présence de l'ARNm correspondant dans certaines lignées cellulaires. Par exemple, OVCAR-3, un modèle classique de lignée de cellules cancéreuses ovariennes, et TOV-1369 (TR), une lignée cellulaire SHG, présentaient tous deux des niveaux facilement détectables du gène *Igals14*, mais la protéine était indétectable. Ce résultat était tout à fait inattendu, étant donné qu'il est plus courant d'avoir les niveaux de transcription dictant la présence ou l'absence de la protéine correspondante. Cependant, dans la littérature, il existe quelques exemples de galectines montrant ce type de comportement moléculaire. Par exemple, les travaux de Satelli *et al.* qui ont analysé l'expression des galectines majeures dans de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses différentes, rapportent que les protéines de la galectine-1 et galectine-3 n'ont pas pu être détectées dans les cellules HEK-293, lignée cellulaire rénale embryonnaire humaine, bien que ces cellules présentent des niveaux significatifs de transcrits (Satelli *et al.*, 2008). De plus, la galectine-8 n'a pu être détectée dans aucune des sept lignées cellulaires utilisées dans leur étude, même après une exposition prolongée à la chimiluminescence, et malgré la présence d'ARNm correspondant dans la plupart des cellules (Satelli *et al.*, 2008). En fait, tout comme la galectine-8 dans les travaux de Satelli *et al.*, la galectine-14 recombinante ou présente dans des lysats placentaires ou cellules HEK-293, a été facilement immunoréactive dans nos expériences d'immunobuvardage, ce qui suggère que la galectine-14 est vraiment absente ou à peine exprimée au niveau protéique dans aucune des lignées cellulaires cancéreuses ovariennes utilisées dans ce projet. Ces résultats suggèrent l'existence de mécanismes de répression translationnelle dans les cellules cancéreuses de l'ovaire.

### 3.4. Potentiel apoptotique de la galectine-14

À ce jour, il n'existe aucune preuve réelle du rôle de la galectine-14 dans les cellules normales ou tumorales. Les quelques données actuellement disponibles suggèrent que la galectine-14 pourrait jouer un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire maternelle, étant donné son expression placentaire élevée et sa présence dans les organes fœtaux (Metsalu *et al.*, 2014, Q. S. Yang *et al.*, 2001a). De plus, il a été suggéré que la galectine-14, ainsi que la galectine-13, pourraient jouer un rôle dans l'activité apoptotique des cellules immunitaires, en causant la mort des lymphocytes T par des voies apoptotiques inconnues (N. G. Than *et al.*, 2009). D'autres galectines sont également connues pour participer à la régulation de la fonction immunitaire, plus spécifiquement dans les processus apoptotiques, comme la galectine-12 qui est censée participer à l'apoptose des adipocytes (Hotta *et al.*, 2001). Par conséquent, étant donné les indications selon lesquelles la galectine-14 pourrait jouer un rôle important dans la modulation des processus de mort cellulaire, nous avons voulu développer un modèle cellulaire *in vitro* pour étudier cette fonction.

L'apoptose est considérée comme une composante essentielle de divers processus physiologiques, dont le développement embryonnaire et la réponse immunitaire. Pour cette raison, nous avons concentré nos études sur la détermination de l'implication possible de la galectine-14 dans ce processus (Elmore, 2007, Thompson, 1995). Les résultats de nos études *in vitro* démontrent que la surexpression de la galectine-14 est associée à une augmentation de l'apoptose des cellules rénales embryonnaires humaines (HEK-293), une lignée cellulaire non cancéreuse immortalisée d'origine épithéliale couramment utilisée en laboratoire. Les transfectants de cellules HEK-293 surexprimant la galectine-14 présentaient un taux d'apoptose plus élevé que les transfectants témoins, comme l'ont démontré nos analyses de clivage de la polymérase PARP-1, une méthode couramment utilisée pour mesurer l'apoptose (Ko *et al.*, 2012). Il est intéressant de noter que dans ce cas-ci, contrairement aux cellules de cancers ovariens, nous avons pu détecter la galectine-14 au niveau protéique. Ce modèle pourra être utilisé pour étudier comment la galectine-14 régule l'apoptose. Basé sur les études d'autres galectines, on peut supposer que la galectine-14 exprimée par ces cellules est libérée dans l'environnement extracellulaire et interagit ensuite avec les récepteurs d'apoptose de la surface cellulaire, en augmentant ainsi les processus de mort cellulaire. Ce type de mécanisme a notamment été rapporté dans le cas de la galectine-1 et de la galectine-3 (Perillo *et al.*, 1995, Stillman *et al.*, 2006). Alternativement, la fonction pro-apoptotique de la galectine-14 pourrait impliquer des mécanismes intracellulaires. Une telle possibilité a été documentée pour la

galectine-7, dont les fonctions pro-apoptotiques ont été associées à l'activation des kinases c-Jun N-terminales (JNK) et la libération du cytochrome C (Hsu *et al.*, 2006, Fu-Tong Liu *et al.*, 2002).

Nous avons également évalué le potentiel apoptotique de la galectine-14 dans les transfectants cellulaires exposés à des stimuli apoptotiques, comme l'étoposide, un composé bien connu pour induire l'apoptose via des dommages à l'ADN et qui est utilisé pour le traitement de plusieurs types de cancer (Jamil *et al.*, 2015). Nos résultats démontrent que les transfectants HEK-293 surexprimant la galectine-14 et traités avec de faibles doses d'étoposide présentent un taux accru d'apoptose comparativement aux transfectants témoins. Ces résultats suggèrent que la galectine-14 pourrait agir à un point commun des voies de signalisation de l'apoptose. Un autre galectine du type prototype qui agit de la même façon est la galectine-7. Il a été démontré que la surexpression de la galectine-7 favorise l'apoptose des kératinocytes épidermiques exposés aux rayons UVB, un autre type de stimuli apoptotique (Bernerd *et al.*, 1999). Dans le cas de la galectine-7, ce comportement pro apoptotique à la suite d'une exposition à des stimuli apoptotiques a été principalement lié à des mécanismes intracellulaires, tels que la régulation à la hausse de l'activité JNK et l'expression modifiée de certains gènes impliqués dans l'apoptose (Hsu *et al.*, 2006, Fu-Tong Liu *et al.*, 2002, R. Y. Yang *et al.*, 2003). Ainsi, bien qu'il soit clair que les transfectants de la galectine-14 présentent une activité accrue de mort cellulaire, exposés ou non à des stimuli apoptotiques, il reste à étudier si cette protéine a un comportement similaire dans les cellules immunitaires et cancéreuses, et aussi quels mécanismes médient la fonction apoptotique de la galectine-14, plus particulièrement au niveau de l'activité JNK.

### **3.5. Prochaines étapes et perspectives**

À notre connaissance, ces travaux représentent une première étude sur le rôle de la galectine-14 en dehors du contexte mère-fœtus. Nos travaux nous ont permis non seulement de mieux comprendre les modes d'expression de cette galectine dans les cellules normales et cancéreuses, mais aussi de commencer à mettre en lumière son rôle et sa pertinence fonctionnelle. Néanmoins, malgré les efforts déployés pour mieux comprendre la galectine-14, plusieurs questions restent sans réponse. Nos résultats ont démontré que l'ARNm de la galectine-14 est surexprimé dans certaines cellules cancéreuses ovariennes, en particulier dans les lignées cellulaires représentant le sous-type le plus agressif. Cependant, quelle est la signification clinique de ces résultats? Quel est le potentiel de la galectine-14 comme cible

thérapeutique ou comme biomarqueur pour le traitement du cancer de l'ovaire? Les prochaines étapes consistent à répondre à ces questions au moyen d'études de spécimens cliniques faits à partir d'échantillons prélevés sur des patientes présentant divers sous-types histologiques du CEO et contenant des échantillons de tissus provenant de tissus adjacents et de tissus ovariens normaux. Ce type d'étude permettrait de vérifier plus précisément l'expression et la localisation de la galectine-14 dans les tissus ovariens normaux et cancéreux.

Une autre considération pour l'avenir concerne nos résultats paradoxaux concernant la surexpression de la galectine-14. Nous avons démontré qu'une expression élevée de galectine-14 dans le cancer de l'ovaire est associée à une faible survie, mais que la surexpression de la même galectine augmente l'apoptose dans les cellules 293 épithéliales. Un comportement similaire a été rapporté pour la galectine-7, considérée comme une protéine pro-apoptotique sous le contrôle de p53 dans le cancer du colon mais connue pour favoriser la progression du cancer dans les carcinomes du sein et des ovaires, dont les cellules présentent des formes mutantes de la protéine p53 (Carole G. Campion *et al.*, 2013, Labrie *et al.*, 2014, Polyak *et al.*, 1997). Il est possible que, tout comme la galectine-7, l'expression de la galectine-14 dans les cellules cancéreuses ovariennes soit induite par des formes mutantes de p53. En fait, les cellules OVCAR-3 et TOV-1369 (TR), qui portent des mutations p53, expriment de façon constitutive l'ARNm de la galectine-14. Par contre, l'ARNm de la galectine-14 n'a pas été détecté dans les lignées cellulaires cancéreuses ovariennes présentant un génotype "sauvage" de p53 ou sans p53 (p53<sup>null</sup>). Par conséquent, il sera intéressant de vérifier si les formes mutantes de p53 qui sont couramment exprimées dans le cancer de l'ovaire régulent l'expression de galectine-14. Alternativement, étant donné que nous n'avons utilisé que des cellules normales pour vérifier le potentiel apoptotique de la galectine-14, il sera également nécessaire de créer des modèles *in vitro* avec des cellules cancéreuses ovariennes exprimant la galectine-14 pour obtenir des résultats plus précis. De plus, une lignée stable de cellules cancéreuses exprimant la galectine-14 serait un outil utile pour étudier comment la présence de cette protéine affecte le comportement des cellules, comme la motilité, la migration, etc.

Enfin, résoudre le problème de la production de galectine-14 recombinante demeure essentiel pour les études structure-fonction et pour mieux étudier le rôle et les propriétés extracellulaires de la galectine-14 sur les cellules normales et cancéreuses. Par exemple, nous serons en mesure de traiter les cellules cancéreuses de l'ovaire avec des concentrations croissantes de la galectine-14 recombinante et de tester leurs propriétés invasives. Ce type d'essai fournirait des informations précieuses, d'autant plus que d'autres galectines, comme la galectine-7, sont déjà associées à une augmentation du comportement invasif des cellules

cancéreuses. De plus, la galectine-14 recombinante nous permettrait d'étudier la capacité de cette galectine à induire une immunosuppression locale via une action sur les cellules du système immunitaire. D'autres galectines sont déjà bien connues pour leur capacité à tuer les cellules immunitaires. Par exemple, il a été démontré que les galectines-1, -3, -8 et -9 recombinantes induisent l'apoptose des cellules T (Fouillit *et al.*, 1998, Fukumori *et al.*, 2003, Kashio *et al.*, 2003, Norambuena *et al.*, 2009, Yamaguchi *et al.*, 2013). Ces études pourront également nous aider à mieux comprendre comment les différents membres de la famille des galectines et de déterminer si elles possèdent des propriétés communes et/ou divergentes dans la régulation de la réponse immunitaire, notamment lors la réponse anti-tumorale.

## **CHAPITRE 4**

### **CONCLUSION GÉNÉRALE**

Cette étude apporte de nouvelles informations quant aux caractéristiques moléculaires de la galectine-14 et met en évidence l'expression et les propriétés de cette protéine dans des cellules normales et cancéreuses. Notre étude est la première à donner un aperçu de l'expression de la galectine-14 dans les néoplasies, plus spécifiquement dans le carcinome ovarien, et à exposer le potentiel apoptotique de cette galectine. Dans l'avenir, plusieurs avenues pourraient être envisagées pour la poursuite de ce projet. En général, il sera important de mieux définir la signification clinique de notre résultats, de créer un modèle *in vitro* avec des cellules cancéreuses ovariennes exprimant la galectine-14, et de résoudre le problème de la production de la galectine-14 recombinante. Ces prochaines étapes nous permettront d'obtenir des résultats plus précis et d'éclairer les fonctions de cette protéine dans le cancer.

Il devient évident que les membres de la famille des galectines jouent un rôle important dans le cancer. Au cours des dernières années, la recherche a permis de mieux caractériser les rôles clés de ces lectines et de leurs ligands dans l'immunomodulation et la métastase. Par exemple, la galectine-7 joue un rôle central dans le cancer d'origine épithéliale, comme le confirment de nombreuses études qui démontrent que cette galectine peut moduler la progression de divers types de carcinomes (Labrie *et al.*, 2014, St-Pierre *et al.*, 2012, Tsai *et al.*, 2013). De même, la littérature montre que l'expression de la galectine-1 est abondante aux sites de croissance tumorale, ce qui favorise l'angiogenèse, l'évasion immunitaire et, par conséquent, influence la progression de la maladie (H. J. Kim *et al.*, 2012, Salatino *et al.*, 2013). Compte tenu de ces faits, l'étude d'une galectine peu connue apportera donc des connaissances nouvelles et importantes sur l'influence des galectines dans le cancer.

Nos résultats jettent donc des bases d'études futures sur la galectine-14 dans le cancer, notamment au niveau de son utilisation comme biomarqueur potentiel ou cible thérapeutique pour les cancers agressifs et mortels, comme le cancer de l'ovaire. Par conséquent, bien que l'étude de la galectine-14 n'en soit qu'à ses débuts, nos résultats à long terme contribueront à l'élaboration de stratégies nouvelles et seront utiles pour cibler ces molécules dans le cancer. En conséquence, nous pourrions être en mesure de surmonter l'immunosuppression associée au cancer, de freiner la croissance des tumeurs et de prévenir le développement de métastases dans les carcinomes ovariens et, peut-être dans d'autres types de cancer.

## RÉFÉRENCES

- Ackerman SJ, Corrette SE, Rosenberg HF, Bennett JC, Mastrianni DM, Nicholson-Weller A, Weller PF, Chin DT & Tenen DG (1993) Molecular cloning and characterization of human eosinophil Charcot-Leyden crystal protein (lysophospholipase). Similarities to IgE binding proteins and the S-type animal lectin superfamily. *J. Immunol.* 150(2):456-468.
- Ackerman SJ, Liu L, Kwatia MA, Savage MP, Leonidas DD, Swaminathan GJ & Acharya KR (2002) 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(17):14859-14868.
- Ågesen TH, Berg M, Clancy T, Thiis-Evensen E, Cekaite L, Lind GE, Nesland JM, Bakka A, Mala T, Hauss HJ, Fetveit T, Vatn MH, Hovig E, Nesbakken A, Lothe RA & Skotheim RI (2011) CLC and IFNAR1 are differentially expressed and a global immunity score is distinct between early- and late-onset colorectal cancer. *Genes Immun.* 12(8):653-662.
- Ahmed H, Pohl J, Fink NE, Strobel F & Vasta GR (1996) The primary structure and carbohydrate specificity of a beta-galactosyl-binding lectin from toad (*Bufo arenarum* Hensel) ovary reveal closer similarities to the mammalian galectin-1 than to the galectin from the clawed frog *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* 271(51):33083-33094.
- Ahmed H & Vasta GR (1994) Galectins: conservation of functionally and structurally relevant amino acid residues defines two types of carbohydrate recognition domains. *Glycobiology* 4(5):545-548.
- 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 Res.* 57(23):5272-5276.
- Almkvist J & Karlsson A (2002) Galectins as inflammatory mediators. *Glycoconj. J.* 19(7-9):575-581.
- Arthur CM, Baruffi MD, Cummings RD & Stowell SR (2015) Evolving mechanistic insights into galectin functions. *Methods Mol. Biol.* 1207:1-35.
- Barjon C, Niki T, Vérillaud B, Opolon P, Bedossa P, Hirashima M, Blanchin S, Wassef M, Rosen HR, Jimenez A-S, Wei M & Busson P (2012) A novel monoclonal antibody for detection of galectin-9 in tissue sections: application to human tissues infected by oncogenic viruses. *Infect. Agent. Cancer* 7(1):16.
- Barondes SH (1997) Galectins: A Personal Overview. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 9(45):1-7.
- Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, Gitt MA, Hirabayashi J, Hughes C & Kasai K (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. *J. Biol. Chem.* 269(33):20807-20810.
- Barondes SH & Rosen SD (1976) Cell Surface Carbohydrate-Binding Proteins: Role in Cell Recognition. *Neuronal Recognition*, Barondes SH (Édit.) Springer US, Boston, MA 10.1007/978-1-4684-2205-4\_11. p 331-356.
- Baum LG, Pang M, Perillo NL, Wu T, Delegeane A, Uittenbogaart CH, Fukuda M & Seilhamer JJ (1995) Human thymic epithelial cells express an endogenous lectin, galectin-1, which binds to core 2 O-glycans on thymocytes and T lymphoblastoid cells. *J. Exp. Med.* 181(3):877-887.
- Bennett G & Leblond CP (1977) Biosynthesis of the glycoproteins present in plasma membrane, lysosomes and secretory materials, as visualized by radioautography. *Histochem. J.* 9(4):393-417.

- Bernerd F, Sarasin A & Magnaldo T (1999) Galectin-7 overexpression is associated with the apoptotic process in UVB-induced sunburn keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96(20):11329-11334.
- Bibens-Laulan N & St-Pierre Y (2017) Intracellular galectin-7 expression in cancer cells results from an autocrine transcriptional mechanism and endocytosis of extracellular galectin-7. *PLoS ONE* 12(11):e0187194.
- Blaser C, Kaufmann M, Müller C, Zimmermann C, Wells V, Mallucci L & Pircher H (1998) Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. *Eur. J. Immunol.* 28(8):2311-2319.
- Bohn H, Kraus W & Winckler W (1983) Purification and characterization of two new soluble placental tissue proteins (PP13 and PP17). *Oncodev. Biol. Med.* 4(5):343-350.
- Bolnick JM, Kohan-Ghadr H-R, Fritz R, Bolnick AD, Kilburn BA, Diamond MP, Armant DR & Drewlo S (2016) Altered Biomarkers in Trophoblast Cells Obtained Noninvasively Prior to Clinical Manifestation of Perinatal Disease. *Sci. Rep.* 6:32382.
- Bordeaux J, Welsh A, Agarwal S, Killiam E, Baquero M, Hanna J, Anagnostou V & Rimm D (2010) Antibody validation. *Biotechniques* 48(3):197-209.
- Bowen NJ, Walker LD, Matyunina LV, Logani S, Totten KA, Benigno BB & McDonald JF (2009) Gene expression profiling supports the hypothesis that human ovarian surface epithelia are multipotent and capable of serving as ovarian cancer initiating cells. *BMC Med. Genomics* 2:71.
- Brewer CF (2002) Thermodynamic binding studies of galectin-1, -3 and -7. *Glycoconj. J.* 19(7-9):459-465.
- Bryborn M, Halldén C, Säll T & Cardell LO (2010) CLC- a novel susceptibility gene for allergic rhinitis? *Allergy* 65(2):220-228.
- Bum-Erdene K, Leffler H, Nilsson UJ & Blanchard H (2016) Structural characterisation of human galectin-4 N-terminal carbohydrate recognition domain in complex with glycerol, lactose, 3'-sulfo-lactose, and 2'-fucosyllactose. *Sci. Rep.* 6:20289.
- Califice S, Castronovo V, Bracke M & van den Brûle F (2004) Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer: tumor suppression of nuclear galectin-3 vs tumor promotion of cytoplasmic galectin-3. *Oncogene* 23(45):7527-7536.
- Camby I, Belot N, Lefranc F, Sadeghi N, de Launoit Y, Kaltner H, Musette S, Darro F, Danguy A, Salmon I, Gabius H-J & Kiss R (2002) Galectin-1 Modulates Human Glioblastoma Cell Migration into the Brain Through Modifications to the Actin Cytoskeleton and Levels of Expression of Small GTPases. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 61(7):585-596.
- Camby I, Le Mercier M, Lefranc F & Kiss R (2006) Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology* 16(11):137R-157R.
- 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.
- Cao Z-Q & Guo X-L (2016) The role of galectin-4 in physiology and diseases. *Protein Cell* 7(5):314-324.
- Cedeno-Laurent F & Dimitroff CJ (2012) Galectins and their ligands: negative regulators of anti-tumor immunity. *Glycoconj. J.* 29(8-9):619-625.
- Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E, Antipin Y, Reva B, Goldberg AP, Sander C & Schultz N (2012) The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* 2(5):401-404.

- Chang CM, Reitherman RW, Rosen SD & Barondes SH (1975) Cell surface location of discoidin, a developmentally regulated carbohydrate-binding protein from *Dictyostelium discoideum*. *Exp. Cell Res.* 95(1):136-142.
- Chiariotti L, Salvatore P, Frunzio R & Bruni CB (2002) Galectin genes: regulation of expression. *Glycoconj. J.* 19(7-9):441-449.
- Cho M & Cummings RD (1995) Galectin-1, a beta-galactoside-binding lectin in Chinese hamster ovary cells. II. Localization and biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 270(10):5207-5212.
- Cho Y, Lee YB, Lee JH, Lee DH, Cho EJ, Yu SJ, Kim YJ, Kim JI, Im JH, Lee JH, Oh EJ & Yoon JH (2016) Modified AS1411 Aptamer Suppresses Hepatocellular Carcinoma by Up-Regulating Galectin-14. *PLoS ONE* 11(8):e0160822.
- Chou F-C, Chen H-Y, Kuo C-C & Sytwu H-K (2018) Role of Galectins in Tumors and in Clinical Immunotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* 19(2).
- Chua JC, Douglass JA, Gillman A, O'Hehir RE & Meeusen EN (2012) Galectin-10, a potential biomarker of eosinophilic airway inflammation. *PLoS ONE* 7(8):e42549.
- Clause N, van den Brûle 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.
- Cooper DN & Barondes SH (1999) God must love galectins; he made so many of them. *Glycobiology* 9(10):979-984.
- Cummings RD, Liu F-T & Vasta GR (2017) Galectins. *Essentials of Glycobiology*, Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, Darvill AG, Kinoshita T, Packer NH, Prestegard JH, Schnaar RL & Seeberger PH (Édit.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY)10.1101/glycobiology.3e.036.
- Dagher SF, Wang JL & Patterson RJ (1995) Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92(4):1213-1217.
- Dalotto-Moreno T, Croci DO, Cerliani JP, Martinez-Allo VC, Dergan-Dylon S, Méndez-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 Res.* 73(3):1107-1117.
- Danguy A, Camby I & Kiss R (2002) Galectins and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1572(2-3):285-293.
- Danielli JF, Rosenberg MD & Cadenhead DA (2016) *Progress in Surface and Membrane Science*. Elsevier. 350 p. <https://market.android.com/details?id=book-2QXgBAAQBAJ>
- De Re V, Simula MP, Cannizzaro R, Pavan A, De Zorzi MA, Toffoli G & Canzonieri V (2009) Galectin-10, eosinophils, and celiac disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1173:357-364.
- Demers M, Rose AAN, Grosset A-A, 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. *Am. J. Pathol.* 176(6):3023-3031.
- 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.
- Dings RPM, Miller MC, Griffin RJ & Mayo KH (2018) Galectins as Molecular Targets for Therapeutic Intervention. *Int. J. Mol. Sci.* 19(3).
- Drickamer K (1988) Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J. Biol. Chem.* 263(20):9557-9560.
- Dube-Delarosbil C & St-Pierre Y (2018) The emerging role of galectins in high-fatality cancers. *Cell. Mol. Life Sci.* 75(7):1215-1226.
- Dumic J, Dabelic S & Flögel M (2006) Galectin-3: an open-ended story. *Biochim. Biophys. Acta* 1760(4):616-635.

- Dunphy JL, Barcham GJ, Bischof RJ, Young AR, Nash A & Meeusen ENT (2002) Isolation and characterization of a novel eosinophil-specific galectin released into the lungs in response to allergen challenge. *J. Biol. Chem.* 277(17):14916-14924.
- Dyer KD, Handen JS & Rosenberg HF (1997) The genomic structure of the human Charcot-Leyden crystal protein gene is analogous to those of the galectin genes. *Genomics* 40(2):217-221.
- Ebrahim AH, Alalawi Z, Mirandola L, Rakhshanda R, Dahlbeck S, Nguyen D, Jenkins M, Grizzi F, Cobos E, Figueroa JA & Chiriva-Internati M (2014) Galectins in cancer: carcinogenesis, diagnosis and therapy. *Ann. Transl. Med.* 2(9):88.
- Edgar R, Domrachev M & Lash AE (2002) Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res.* 30(1):207-210.
- Ege CB, Akbulut M, Zekioğlu O & Ozdemir N (2011) Investigation of galectin-3 and heparanase in endometrioid and serous carcinomas of the endometrium and correlation with known predictors of survival. *Arch. Gynecol. Obstet.* 284(5):1231-1239.
- 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. *J. Biol. Chem.* 279(33):34922-34930.
- Ellerhorst J, Nguyen T, Cooper DN, Estrov Y, Lotan D & Lotan R (1999) Induction of differentiation and apoptosis in the prostate cancer cell line LNCaP by sodium butyrate and galectin-1. *Int. J. Oncol.* 14(2):225-232.
- Elmore S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35(4):495-516.
- Elola MT, Wolfenstein-Todel C, Troncoso MF, Vasta GR & Rabinovich GA (2007) Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival. *Cell. Mol. Life Sci.* 64(13):1679-1700.
- Endharti AT, Zhou YW, Nakashima I & Suzuki H (2005) Galectin-1 supports survival of naive T cells without promoting cell proliferation. *Eur. J. Immunol.* 35(1):86-97.
- Farré D, Roset R, Huerta M, Aduara JE, Roselló L, Albà MM & Messeguer X (2003) Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. *Nucleic Acids Res.* 31(13):3651-3653.
- Faustino NA & Cooper TA (2003) Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev.* 17(4):419-437.
- Fleury H, Communal L, Carmona E, Portelance L, Arcand SL, Rahimi K, Tonin PN, Provencher D & Mes-Masson AM (2015) Novel high-grade serous epithelial ovarian cancer cell lines that reflect the molecular diversity of both the sporadic and hereditary disease. *Genes Cancer* 6(9-10):378-398.
- Fogh J, Fogh JM & Orfeo T (1977) One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 59(1):221-226.
- Fouillit M, Joubert-Caron R, Poirier F, Bourin P, Monostori E, Levi-Strauss M, Raphael M, Bladier D & Caron M (2000) Regulation of CD45-induced signaling by galectin-1 in Burkitt lymphoma B cells. *Glycobiology* 10(4):413-419.
- Fouillit M, Lévi-Strauss M, Giudicelli V, Lutomski D, Bladier D, Caron M & Joubert-Caron R (1998) Affinity purification and characterization of recombinant human galectin-1. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 706(1):167-171.
- Fred Brewer C (2002) Binding and cross-linking properties of galectins. *Biochim. Biophys. Acta* 1572(2-3):255-262.
- Fritz R, Kohan-Ghadr H-R, Bolnick JM, Bolnick AD, Kilburn BA, Diamond MP, Drewlo S & Armant DR (2015) Noninvasive detection of trophoblast protein signatures linked to early pregnancy loss using trophoblast retrieval and isolation from the cervix (TRIC). *Fertil. Steril.* 104(2):339-346.e334.

- Fukuda T, Ackerman SJ, Reed CE, Peters MS, Dunnette SL & Gleich GJ (1985) Calcium ionophore A23187 calcium-dependent cytolytic degranulation in human eosinophils. *J. Immunol.* 135(2):1349-1356.
- Fukumori T, Takenaka Y, Yoshii T, Kim H-RC, Hogan V, Inohara H, Kagawa S & Raz A (2003) CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. *Cancer Res.* 63(23):8302-8311.
- Gahmberg CG, Itaya K & Hakomori S-I (1976) External Labeling of Cell Surface Carbohydrates. *Methods in Membrane Biology*, Korn ED (Édit.) Springer US, Boston, MA 10.1007/978-1-4757-5820-7\_3. p 179-210.
- Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson E, Cerami E, Sander C & Schultz N (2013) Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci. Signal.* 6(269):l1.
- Garner OB, Yun T, Pernet O, Aguilar HC, Park A, Bowden TA, Freiberg AN, Lee B & Baum LG (2015) Timing of galectin-1 exposure differentially modulates Nipah virus entry and syncytium formation in endothelial cells. *J. Virol.* 89(5):2520-2529.
- Ge X, Yamamoto S, Tsutsumi S, Midorikawa Y, Ihara S, Wang SM & Aburatani H (2005) Interpreting expression profiles of cancers by genome-wide survey of breadth of expression in normal tissues. *Genomics* 86(2):127-141.
- Gitt MA & Barondes SH (1986) Evidence that a human soluble beta-galactoside-binding lectin is encoded by a family of genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83(20):7603-7607.
- Gitt MA, Colnot C, Poirier F, Nani KJ, Barondes SH & Leffler H (1998) Galectin-4 and galectin-6 are two closely related lectins expressed in mouse gastrointestinal tract. *J. Biol. Chem.* 273(5):2954-2960.
- Gitt MA, Wisner MF, Leffler H, Herrmann J, Xia YR, Massa SM, Cooper DN, Lusic AJ & Barondes SH (1995) Sequence and mapping of galectin-5, a beta-galactoside-binding lectin, found in rat erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 270(10):5032-5038.
- Gleich GJ, Loegering DA, Mann KG & Maldonado JE (1976) Comparative properties of the Charcot-Leyden crystal protein and the major basic protein from human eosinophils. *J. Clin. Invest.* 57(3):633-640.
- Gordon-Alonso M, Hirsch T, Wildmann C & van der Bruggen P (2017) Galectin-3 captures interferon-gamma in the tumor matrix reducing chemokine gradient production and T-cell tumor infiltration. *Nat. Commun.* 8(1):793.
- Grant BD & Donaldson JG (2009) Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10(9):597-608.
- Grosset A-A, Labrie M, Gagné D, Vladioiu M-C, 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.
- Guardia CMA, Gauto DF, Di Lella S, Rabinovich GA, Martí MA & Estrin DA (2011) An integrated computational analysis of the structure, dynamics, and ligand binding interactions of the human galectin network. *J. Chem. Inf. Model.* 51(8):1918-1930.
- Hadari YR, Arbel-Goren R, Levy Y, Amsterdam A, Alon R, Zakut R & Zick Y (2000) Galectin-8 binding to integrins inhibits cell adhesion and induces apoptosis. *J. Cell Sci.* 113 ( Pt 13):2385-2397.
- Hanahan D & Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5):646-674.
- Haudek KC, Spronk KJ, Voss PG, Patterson RJ, Wang JL & Arnoys EJ (2010) Dynamics of galectin-3 in the nucleus and cytoplasm. *Biochim. Biophys. Acta* 1800(2):181-189.
- He J & Baum LG (2006a) Endothelial cell expression of galectin-1 induced by prostate cancer cells inhibits T-cell transendothelial migration. *Lab. Invest.* 86(6):578-590.
- He J & Baum LG (2006b) Galectin interactions with extracellular matrix and effects on cellular function. *Methods Enzymol.* 417:247-256.

- Hernandez JD & Baum LG (2002) Ah, sweet mystery of death! Galectins and control of cell fate. *Glycobiology* 12(10):127R-136R.
- Hirabayashi J, Hashidate T, Arata Y, Nishi N, Nakamura T, Hirashima M, Urashima T, Oka T, Futai M, Muller WEG, Yagi F & Kasai K-I (2002) Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochim. Biophys. Acta* 1572(2-3):232-254.
- Hirabayashi J & Kasai K (1994) Further evidence by site-directed mutagenesis that conserved hydrophilic residues form a carbohydrate-binding site of human galectin-1. *Glycoconj. J.* 11(5):437-442.
- Honjo Y, Nangia-Makker P, Inohara H & Raz A (2001) Down-regulation of galectin-3 suppresses tumorigenicity of human breast carcinoma cells. *Clin. Cancer Res.* 7(3):661-668.
- Hotta K, Funahashi T, Matsukawa Y, Takahashi M, Nishizawa H, Kishida K, Matsuda M, Kuriyama H, Kihara S, Nakamura T, Tochino Y, Bodkin NL, Hansen BC & Matsuzawa Y (2001) Galectin-12, an Adipose-expressed Galectin-like Molecule Possessing Apoptosis-inducing Activity. *J. Biol. Chem.* 276(36):34089-34097.
- Houzelstein D, Gonçalves IR, Fadden AJ, Sidhu SS, Cooper DNW, Drickamer K, Leffler H & Poirier F (2004) Phylogenetic analysis of the vertebrate galectin family. *Mol. Biol. Evol.* 21(7):1177-1187.
- Hsu DK & Liu F-T (2002) Regulation of cellular homeostasis by galectins. *Glycoconj. J.* 19(7-9):507-515.
- Hsu DK, Yang R-Y & Liu F-T (2006) Galectins in apoptosis. *Methods Enzymol.* 417:256-273.
- Hughes RC (2001) Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie* 83(7):667-676.
- Ito S (1974) Form and function of the glycocalyx on free cell surfaces. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 268(891):55-66.
- Jamil S, Lam I, Majd M, Tsai S-H & Duronio V (2015) Etoposide induces cell death via mitochondrial-dependent actions of p53. *Cancer Cell Int.* 15(1):79.
- 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.
- John S & Mishra R (2016) Galectin-9: From cell biology to complex disease dynamics. *J. Biosci.* 41(3):507-534.
- Joo HG, Goedegebuure PS, Sadanaga N, Nagoshi M, von Bernstorff W & Eberlein TJ (2001) Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding protein in activated T lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.* 69(4):555-564.
- Jovic M, Sharma M, Rahajeng J & Caplan S (2010) The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. *Histol. Histopathol.* 25(1):99-112.
- Kaltner H, Toegel S, Caballero GG, Manning JC, Ledeen RW & Gabius H-J (2017) Galectins: their network and roles in immunity/tumor growth control. *Histochem. Cell Biol.* 147(2):239-256.
- Kamili NA, Arthur CM, Gerner-Smidt C, Tafesse E, Blenda A, Dias-Baruffi M & Stowell SR (2016) Key regulators of galectin-glycan interactions. *Proteomics* 16(24):3111-3125.
- Kasai K & Hirabayashi J (1996) Galectins: a family of animal lectins that decipher glycodes. *J. Biochem.* 119(1):1-8.
- 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.
- Kilpatrick DC (2002) Animal lectins: a historical introduction and overview. *Biochim. Biophys. Acta* 1572(2-3):187-197.
- Kim HJ, Jeon HK, Cho YJ, Park YA, Choi JJ, Do IG, Song SY, Lee YY, Choi CH, Kim TJ, Bae DS, Lee JW & Kim BG (2012) High galectin-1 expression correlates with poor prognosis and is involved in epithelial ovarian cancer proliferation and invasion. *Eur. J. Cancer* 48(12):1914-1921.

- Kim HJ, Jeon HK, Lee JK, Sung CO, Do IG, Choi CH, Kim TJ, Kim BG, Bae DS & Lee JW (2013) Clinical significance of galectin-7 in epithelial ovarian cancer. *Anticancer Res.* 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 Res.* 59(16):4148-4154.
- Kim MK, Sung CO, Do IG, Jeon HK, Song TJ, Park HS, Lee YY, Kim BG, Lee JW & Bae DS (2011) Overexpression of Galectin-3 and its clinical significance in ovarian carcinoma. *Int. J. Clin. Oncol.* 16(4):352-358.
- Kliman HJ, Sammar M, Grimpel YI, Lynch SK, Milano KM, Pick E, Bejar J, Arad A, Lee JJ, Meiri H & Gonen R (2012) Placental protein 13 and decidual zones of necrosis: an immunologic diversion that may be linked to preeclampsia. *Reprod. Sci.* 19(1):16-30.
- Ko HL & Ren EC (2012) Functional Aspects of PARP1 in DNA Repair and Transcription. *Biomolecules* 2(4):524-548.
- Kohn KW, Zeeberg BM, Reinhold WC & Pommier Y (2014) Gene Expression Correlations in Human Cancer Cell Lines Define Molecular Interaction Networks for Epithelial Phenotype. *PLoS ONE* 9(6):e99269.
- Kohrenhagen N, Volker HU, Kapp M, Dietl J & Kammerer U (2006) Increased expression of galectin-1 during the progression of cervical neoplasia. *Int. J. Gynecol. Cancer* 16(6):2018-2022.
- Koshiyama M, Matsumura N & Konishi I (2017) Subtypes of Ovarian Cancer and Ovarian Cancer Screening. *Diagnostics (Basel)* 7(1).
- Koti M, Gooding RJ, Nuin P, Haslehurst A, Crane C, Weberpals J, Childs T, Bryson P, Dharsee M, Evans K, Feilotter HE, Park PC & Squire JA (2013) Identification of the IGF1/PI3K/NF- $\kappa$ B/ERK gene signalling networks associated with chemotherapy resistance and treatment response in high-grade serous epithelial ovarian cancer. *BMC Cancer* 13:549.
- Kubach J, Lutter P, Bopp T, Stoll S, Becker C, Huter E, Richter C, Weingarten P, Warger T, Knop J, Müllner S, Wijdenes J, Schild H, Schmitt E & Jonuleit H (2007) Human CD4+CD25+ regulatory T cells: proteome analysis identifies galectin-10 as a novel marker essential for their anergy and suppressive function. *Blood* 110(5):1550-1558.
- Kübler D, Seidler J, André S, Kumar S, Schwartz-Albiez R, Lehmann W-D & Gabius H-J (2014) Phosphorylation of multifunctional galectins by protein kinases CK1, CK2, and PKA. *Anal. Biochem.* 449:109-117.
- Kuwabara I, Kuwabara Y, Yang R-Y, Schuler M, Green DR, Zuraw BL, Hsu DK & Liu F-T (2002) Galectin-7 (PIG1) exhibits pro-apoptotic function through JNK activation and mitochondrial cytochrome c release. *J. Biol. Chem.* 277(5):3487-3497.
- Labrie M, Vladoiu MC, Grosset A-A, 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 Res.* 73(1):86-96.
- Lahm H, André S, Hoefflich A, Kaltner H, Siebert H-C, Sordat B, von der Lieth C-W, Wolf E & Gabius H-J (2004) Tumor galectinology: insights into the complex network of a family of endogenous lectins. *Glycoconj. J.* 20(4):227-238.
- Lee YJ, Song YK, Song JJ, Siervo-Sassi RR, Kim H-RC, Li L, Spitz DR, Lokshin A & Kim JH (2003) Reconstitution of galectin-3 alters glutathione content and potentiates TRAIL-induced cytotoxicity by dephosphorylation of Akt. *Exp. Cell Res.* 288(1):21-34.
- Leffler H, Carlsson S, Hedlund M, Qian Y & Poirier F (2004) Introduction to galectins. *Glycoconj. J.* 19:433-440.

- Leffler H, Masiarz FR & Barondes SH (1989) Soluble lactose-binding vertebrate lectins: a growing family. *Biochemistry* 28(23):9222-9229.
- Leonidas DD, Elbert BL, Zhou Z, Leffler H, Ackerman SJ & Acharya KR (1995) Crystal structure of human Charcot–Leyden crystal protein, an eosinophil lysophospholipase, identifies it as a new member of the carbohydrate-binding family of galectins. *Structure* 3(12):1379-1393.
- Leonidas DD, Vatzaki EH, Vorum H, Celis JE, Madsen P & Acharya KR (1998) Structural basis for the recognition of carbohydrates by human galectin-7. *Biochemistry* 37(40):13930-13940.
- Lepur A, Carlsson MC, Novak R, Dumić J, Nilsson UJ & Leffler H (2012) Galectin-3 endocytosis by carbohydrate independent and dependent pathways in different macrophage like cell types. *Biochim. Biophys. Acta* 1820(7):804-818.
- Letourneau IJ, Quinn MC, Wang LL, Portelance L, Caceres KY, Cyr L, Delvoeye N, Meunier L, de Ladurantaye M, Shen Z, Arcand SL, Tonin PN, Provencher DM & Mes-Masson AM (2012) Derivation and characterization of matched cell lines from primary and recurrent serous ovarian cancer. *BMC Cancer* 12:379.
- Liu F-T, Patterson RJ & Wang JL (2002) Intracellular functions of galectins. *Biochim. Biophys. Acta* 1572(2-3):263-273.
- Liu F-T & Rabinovich GA (2005) Galectins as modulators of tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* 5(1):29-41.
- Liu FT, Hsu DK, Zuberi RI, Kuwabara I, Chi EY & Henderson WR, Jr. (1995) Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. *Am. J. Pathol.* 147(4):1016-1028.
- Lobsanov YD, Gitt MA, Leffler H, Barondes SH & Rini JM (1993) 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(36):27034-27038.
- Madsen P, Rasmussen HH, Flint T, Gromov P, Kruse TA, Honoré B, Vorum H & Celis JE (1995) Cloning, expression, and chromosome mapping of human galectin-7. *J. Biol. Chem.* 270(11):5823-5829.
- Mandal DK & Brewer CF (1992) Cross-linking activity of the 14-kilodalton beta-galactoside-specific vertebrate lectin with asialofetuin: comparison with several galactose-specific plant lectins. *Biochemistry* 31(36):8465-8472.
- Metsalu T, Viltrop T, Tiirats A, Rajashekar B, Reimann E, Kõks S, Rull K, Milani L, Acharya G, Basnet P, Vilo J, Mägi R, Metspalu A, Peters M, Haller-Kikkatalo K & Salumets A (2014) Using RNA sequencing for identifying gene imprinting and random monoallelic expression in human placenta. *Epigenetics* 9(10):1397-1409.
- Mitra AK, Davis DA, Tomar S, Roy L, Gurler H, Xie J, Lantvit DD, Cardenas H, Fang F, Liu Y, Loughran E, Yang J, Sharon Stack M, Emerson RE, Cowden Dahl KD, V Barbolina M, Nephew KP, Matei D & Burdette JE (2015) In vivo tumor growth of high-grade serous ovarian cancer cell lines. *Gynecol. Oncol.* 138(2):372-377.
- Moon BK, Lee YJ, Battle P, Jessup JM, Raz A & Kim HR (2001) Galectin-3 protects human breast carcinoma cells against nitric oxide-induced apoptosis: implication of galectin-3 function during metastasis. *Am. J. Pathol.* 159(3):1055-1060.
- Müller S, Schaffer T, Flogerzi B, Fleetwood A, Weimann R, Schoepfer AM & Seibold F (2006) Galectin-3 modulates T cell activity and is reduced in the inflamed intestinal epithelium in IBD. *Inflamm. Bowel Dis.* 12(7):588-597.
- Nagy N, Bronckart Y, Camby I, Legendre H, Lahm H, Kaltner H, Hadari Y, Van Ham P, Yeaton P, Pector JC, Zick Y, Salmon I, Danguy A, Kiss R & Gabius HJ (2002) Galectin-8 expression decreases in cancer compared with normal and dysplastic human colon tissue and acts significantly on human colon cancer cell migration as a suppressor. *Gut* 50(3):392-401.

- Nickel W (2003) The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes. *Eur. J. Biochem.* 270(10):2109-2119.
- 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.
- Noh S, Jin S, Park CO, Lee YS, Lee N, Lee J, Shin JU, Kim SH, Yun KN, Kim JY & Lee KH (2015) Elevated Galectin-10 Expression of IL-22 Producing T Cells in Atopic Dermatitis Patients. *J. Invest. Dermatol.* 10.1038/jid.2015.369.
- Norambuena A, Metz C, Vicuña L, Silva A, Pardo E, Oyanadel C, Massardo L, González A & Soza A (2009) Galectin-8 induces apoptosis in Jurkat T cells by phosphatidic acid-mediated ERK1/2 activation supported by protein kinase A down-regulation. *J. Biol. Chem.* 284(19):12670-12679.
- Ochieng J, Furtak V & Lukyanov P (2002) Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconj. J.* 19(7-9):527-535.
- Oda Y, Herrmann J, Gitt MA, Turck CW, Burlingame AL, Barondes SH & Leffler H (1993) Soluble lactose-binding lectin from rat intestine with two different carbohydrate-binding domains in the same peptide chain. *J. Biol. Chem.* 268(8):5929-5939.
- 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.
- Patterson RJ, Wang W & Wang JL (2002) Understanding the biochemical activities of galectin-1 and galectin-3 in the nucleus. *Glycoconj. J.* 19(7-9):499-506.
- 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.
- Perillo NL, Marcus ME & Baum LG (1998) Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. *J. Mol. Med.* 76(6):402-412.
- Perillo NL, Pace KE, Seilhamer JJ & Baum LG (1995) Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature* 378(6558):736-739.
- Perillo NL, Uittenbogaart CH, Nguyen JT & Baum LG (1997) Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of human thymocytes. *J. Exp. Med.* 185(10):1851-1858.
- Petryszak R, Keays M, Tang YA, Fonseca NA, Barrera E, Burdett T, Füllgrabe A, Fuentes AM-P, Jupp S, Koskinen S, Mannion O, Huerta L, Megy K, Snow C, Williams E, Barzine M, Hastings E, Weisser H, Wright J, Jaiswal P, Huber W, Choudhary J, Parkinson HE & Brazma A (2016) Expression Atlas update--an integrated database of gene and protein expression in humans, animals and plants. *Nucleic Acids Res.* 44(D1):D746-752.
- Pickup MW, Mouw JK & Weaver VM (2014) The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep.* 15(12):1243-1253.
- Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW & Vogelstein B (1997) A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 389(6648):300-305.
- Rabinovich GA (1999) Galectins: an evolutionarily conserved family of animal lectins with multifunctional properties; a trip from the gene to clinical therapy. *Cell Death Differ.* 6(8):711-721.
- Rabinovich GA, Rubinstein N & Fainboim L (2002a) Unlocking the secrets of galectins: a challenge at the frontier of glyco-immunology. *J. Leukoc. Biol.* 71(5):741-752.
- Rabinovich GA & Toscano MA (2009) Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 9(5):338-352.
- Rabinovich GA, Toscano MA, Ilarregui JM & Rubinstein N (2002b) Shedding light on the immunomodulatory properties of galectins: Novel regulators of innate and adaptive immune responses. *Glycoconj. J.* 19(7-9):565-573.

- Rambourg A (1971) Morphological and histochemical aspects of glycoproteins at the surface of animal cells. *Int. Rev. Cytol.* 31:57-114.
- Römer CE & Elling L (2011) Galectins: Structures, binding properties and function in cell adhesion. *Biomaterials-Physics and Chemistry*, InTech.
- Rosen SD, Kafka JA, Simpson DL & Barondes SH (1973) Developmentally regulated, carbohydrate-binding protein in *Dictyostelium discoideum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70(9):2554-2557.
- Rubinstein N, Alvarez M, Zwirner NW, Toscano MA, Ilarregui JM, Bravo A, Mordoh J, Fainboim L, Podhajcer OL & Rabinovich GA (2004a) 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.
- Rubinstein N, Ilarregui JM, Toscano MA & Rabinovich GA (2004b) The role of galectins in the initiation, amplification and resolution of the inflammatory response. *Tissue Antigens* 64(1):1-12.
- Sakula A (1986) Charcot-Leyden crystals and Curschmann spirals in asthmatic sputum. *Thorax* 41(7):503-507.
- Salatino M, Dalotto-Moreno T & Rabinovich GA (2013) Thwarting galectin-induced immunosuppression in breast cancer. *Oncoimmunology* 2(5):e24077.
- Sammar M, Nisamblatt S, Gonen R, Huppertz B, Gizurarson S, Osol G & Meiri H (2014) The role of the carbohydrate recognition domain of placental protein 13 (PP13) in pregnancy evaluated with recombinant PP13 and the DelT221 PP13 variant. *PLoS ONE* 9(7):e102832.
- Sampson JF, Suryawanshi A, Chen W-S, Rabinovich GA & Panjwani N (2016) Galectin-8 promotes regulatory T-cell differentiation by modulating IL-2 and TGF $\beta$  signaling. *Immunol. Cell Biol.* 94(2):213-219.
- Satelli A, Rao PS, Gupta PK, Lockman PR, Srivenugopal KS & Rao US (2008) Varied expression and localization of multiple galectins in different cancer cell lines. *Oncol. Rep.* 19(3):587-594.
- 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). *Immunol. Rev.* 230(1):172-187.
- Schulz H, Schmoeckel E, Kuhn C, Hofmann S, Mayr D, Mahner S & Jeschke U (2017) Galectins-1, -3, and -7 Are Prognostic Markers for Survival of Ovarian Cancer Patients. *Int. J. Mol. Sci.* 18(6).
- Schumann W & Ferreira LCS (2004) Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Genet. Mol. Biol.* 27(3):442-453.
- Seelenmeyer C, Wegehingel S, Tews I, Künzler M, Aebi M & Nickel W (2005) Cell surface counter receptors are essential components of the unconventional export machinery of galectin-1. *J. Cell Biol.* 171(2):373-381.
- Shekhar MPV, Nangia-Makker P, Tait L, Miller F & Raz A (2004) 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.* 165(6):1931-1941.
- Shimura T, Takenaka Y, Tsutsumi S, Hogan V, Kikuchi A & Raz A (2004) Galectin-3, a novel binding partner of beta-catenin. *Cancer Res.* 64(18):6363-6367.
- Sprent J & Kishimoto H (2001) The thymus and central tolerance. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 356(1409):609-616.
- St-Pierre Y, Champion CG & Grosset A-A (2012) A distinctive role for galectin-7 in cancer? *Front. Biosci.* 17:438-450.

- Staribratova D, Belovejdov V, Staikov D & Dikov D (2010) Demonstration of Charcot-Leyden crystals in eosinophilic cystitis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 134(10):1420.
- 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.
- Straube T, von Mach T, Hönig E, Greb C, Schneider D & Jacob R (2013) pH-dependent recycling of galectin-3 at the apical membrane of epithelial cells. *Traffic* 14(9):1014-1027.
- Sturm A, Lensch M, André S, Kaltner H, Wiedenmann B, Rosewicz S, Dignass AU & Gabius H-J (2004) Human galectin-2: novel inducer of T cell apoptosis with distinct profile of caspase activation. *J. Immunol.* 173(6):3825-3837.
- Su J, Gao J, Si Y, Cui L, Song C, Wang Y, Wu R, Tai G & Zhou Y (2018a) Galectin-10: a new structural type of prototype galectin dimer and effects on saccharide ligand binding. *Glycobiology* 28(3):159-168.
- Su J, Wang Y, Si Y, Gao J, Song C, Cui L, Wu R, Tai G & Zhou Y (2018b) Galectin-13, a different prototype galectin, does not bind  $\beta$ -galactosides and forms dimers via intermolecular disulfide bridges between Cys-136 and Cys-138. *Sci. Rep.* 8(1):980.
- Swaminathan GJ, Leonidas DD, Savage MP, Ackerman SJ & Acharya KR (1999) Selective Recognition of Mannose by the Human Eosinophil Charcot-Leyden Crystal Protein (Galectin-10): A Crystallographic Study at 1.8 Å Resolution. *Biochemistry* 38(42):13837-13843.
- Teichberg VI, Silman I, Beitsch DD & Resheff G (1975) A beta-D-galactoside binding protein from electric organ tissue of *Electrophorus electricus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72(4):1383-1387.
- Than NG, Balogh A, Romero R, Kárpáti E, Erez O, Szilágyi A, Kovalszky I, Sammar M, Gizurarson S, Matkó J, Závodszy P, Papp Z & Meiri H (2014a) Placental Protein 13 (PP13) - A Placental Immunoregulatory Galectin Protecting Pregnancy. *Front. Immunol.* 5:348.
- Than NG, Romero R, Balogh A, Karpáti E, Mastrolia SA, Staretz-Chacham O, Hahn S, Erez O, Papp Z & Kim CJ (2015) Galectins: Double-edged Swords in the Cross-roads of Pregnancy Complications and Female Reproductive Tract Inflammation and Neoplasia. *J. Pathol. Transl. Med.* 49(3):181-208.
- 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, Zavodszy P, Papp Z & Wildman DE (2009) A primate subfamily of galectins expressed at the maternal-fetal interface that promote immune cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106(24):9731-9736.
- Than NG, Romero R, Xu Y, Erez O, Xu Z, Bhatti G, Leavitt R, Chung TH, El-Azzamy H, LaJeunesse C, Wang B, Balogh A, Szalai G, Land S, Dong Z, Hassan SS, Chaiworapongsa T, Krispin M, Kim CJ, Tarca AL, Papp Z & Bohn H (2014b) Evolutionary origins of the placental expression of chromosome 19 cluster galectins and their complex dysregulation in preeclampsia. *Placenta* 35(11):855-865.
- Than NG, Sumegi B, Than GN, Berente Z & Bohn H (1999) Isolation and sequence analysis of a cDNA encoding human placental tissue protein 13 (PP13), a new lysophospholipase, homologue of human eosinophil Charcot-Leyden Crystal protein. *Placenta* 20(8):703-710.
- Thiemann S & Baum LG (2011) The road less traveled: regulation of leukocyte migration across vascular and lymphatic endothelium by galectins. *J. Clin. Immunol.* 31(1):2-9.
- Thiemann S & Baum LG (2016) Galectins and Immune Responses-Just How Do They Do Those Things They Do? *Annu. Rev. Immunol.* 34:243-264.
- Thompson CB (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267(5203):1456-1462.

- 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.
- Troncoso MF, Ferragut F, Bacigalupo ML, Cárdenas Delgado VM, Nugnes LG, Gentilini L, Laderach D, Wolfenstein-Todel C, Compagno D, Rabinovich GA & Elola MT (2014) Galectin-8: a matricellular lectin with key roles in angiogenesis. *Glycobiology* 24(10):907-914.
- Tsai 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. *Gynecol. Oncol.* 131(3):645-649.
- Ueda S, Kuwabara I & Liu F-T (2004) Suppression of Tumor Growth by Galectin-7 Gene Transfer. *Cancer Res.* 64(16):5672-5676.
- van den Brûle F, Califice S, Garnier F, Fernandez PL, Berchuck A & Castronovo V (2003) Galectin-1 accumulation in the ovary carcinoma peritumoral stroma is induced by ovary carcinoma cells and affects both cancer cell proliferation and adhesion to laminin-1 and fibronectin. *Lab. Invest.* 83(3):377-386.
- van den Brule FA, Buicu C, Berchuck A, Bast RC, Deprez M, Liu FT, Cooper DN, Pieters C, Sobel ME & Castronovo V (1996) Expression of the 67-kD laminin receptor, galectin-1, and galectin-3 in advanced human uterine adenocarcinoma. *Hum. Pathol.* 27(11):1185-1191.
- Vang R, Shih I-M & Kurman RJ (2009) Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems. *Adv. Anat. Pathol.* 16(5):267-282.
- Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Hart G & Marth J (1999) *S-type Lectins (Galectins)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20714/> (Consulté le 2018/4/5)
- Vasta GR (2012) Galectins as pattern recognition receptors: structure, function, and evolution. *Adv. Exp. Med. Biol.* 946:21-36.
- Vasta GR, Ahmed H, Bianchet MA, Fernández-Robledo JA & Amzel LM (2012) Diversity in recognition of glycans by F-type lectins and galectins: molecular, structural, and biophysical aspects. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1253:E14-26.
- Vićovac L, Janković M & Cuperlović M (1998) Galectin-1 and -3 in cells of the first trimester placental bed. *Hum. Reprod.* 13(3):730-735.
- Visegrády B, Than NG, Kilár F, Sümegi B, Than GN & Bohn H (2001) Homology modelling and molecular dynamics studies of human placental tissue protein 13 (galectin-13). *Protein Eng.* 14(11):875-880.
- Vladoiu MC, Labrie M & St-Pierre Y (2014) Intracellular galectins in cancer cells: potential new targets for therapy (Review). *Int. J. Oncol.* 44(4):1001-1014.
- Vyakarnam A, Dagher SF, Wang JL & Patterson RJ (1997) Evidence for a role for galectin-1 in pre-mRNA splicing. *Mol. Cell. Biol.* 17(8):4730-4737.
- Wada J & Kanwar YS (1997a) Identification and characterization of galectin-9, a novel beta-galactoside-binding mammalian lectin. *J. Biol. Chem.* 272(9):6078-6086.
- Wada J, Ota K, Kumar A, Wallner EI & Kanwar YS (1997b) Developmental regulation, expression, and apoptotic potential of galectin-9, a beta-galactoside binding lectin. *J. Clin. Invest.* 99(10):2452-2461.
- Wang L & Guo X-L (2016) Molecular regulation of galectin-3 expression and therapeutic implication in cancer progression. *Biomed. Pharmacother.* 78:165-171.
- Williams BA, Kay RF & Kirk EC (2010) New perspectives on anthropoid origins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107(11):4797-4804.

- Wilson TJ, Firth MN, Powell JT & Harrison FL (1989) The sequence of the mouse 14 kDa beta-galactoside-binding lectin and evidence for its synthesis on free cytoplasmic ribosomes. *Biochem. J.* 261(3):847-852.
- Wingfield PT (2015) Overview of the purification of recombinant proteins. *Curr. Protoc. Protein Sci.* 80:6.1.1-35.
- Yamaguchi T, Hiromasa K, Kabashima-Kubo R, Yoshioka M & Nakamura M (2013) Galectin-7, induced by cis-urocanic acid and ultraviolet B irradiation, down-modulates cytokine production by T lymphocytes. *Exp. Dermatol.* 22(12):840-842.
- Yang QS, Ying K, Yuan HL, Chen JZ, Meng XF & others (2001a) Cloning and expression of a novel human galectin cDNA, predominantly expressed in placenta. *Biochim. Biophys. Acta.*
- Yang R-Y, Havel PJ & Liu F-T (2012) Galectin-12: A protein associated with lipid droplets that regulates lipid metabolism and energy balance. *Adipocyte* 1(2):96-100.
- Yang R-Y, Hsu DK, Yu L, Chen H-Y & Liu F-T (2004) Galectin-12 is required for adipogenic signaling and adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 279(28):29761-29766.
- Yang R-Y, Rabinovich GA & Liu F-T (2008) Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev. Mol. Med.* 10:e17.
- Yang RY, Hsu DK & Liu FT (1996) Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93(13):6737-6742.
- Yang RY, Hsu DK, Yu L, Ni J & Liu FT (2001b) Cell cycle regulation by galectin-12, a new member of the galectin superfamily. *J. Biol. Chem.* 276(23):20252-20260.
- Yang RY & Liu FT (2003) Galectins in cell growth and apoptosis. *Cell. Mol. Life Sci.* 60(2):267-276.
- Young AR, Barcham GJ, Kemp JM, Dunphy JL, Nash A & Meeusen EN (2009) Functional characterization of an eosinophil-specific galectin, ovine galectin-14. *Glycoconj. J.* 26(4):423-432.
- Young AR & Meeusen EN (2002) Galectins in parasite infection and allergic inflammation. *Glycoconj. J.* 19(7-9):601-606.
- Zhang P, Zhang P, Shi B, Zhou M, Jiang H, Zhang H, Pan X, Gao H, Sun H & Li Z (2014) Galectin-1 overexpression promotes progression and chemoresistance to cisplatin in epithelial ovarian cancer. *Cell Death Dis.* 5:e991.