

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

Modulation de l'expression des gènes pro-métastatiques MMP-9 et galectine-7 dans les cellules cancéreuses

Par

Nathalie Bibens Lulan

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

Années 2011-2016

Dépôt final 25 novembre 2016

Jury d'évaluation

Président du jury : Dr Alain Lamarre

Examineur externe : Dr Borhane Annabi

Examineur externe : Dr Céline Van Themsche

Directeur de recherche : Dr Yves St-Pierre

RÉSUMÉ GÉNÉRAL

De nombreuses études démontrent les rôles cruciaux des gènes *mmp-9* et *lgals-7* dans la progression tumorale et plus particulièrement pour leurs actions généralement pro-métastatiques. La MMP-9 est une protéase surtout reconnue pour être responsable de la dégradation de la matrice extracellulaire et plus particulièrement de la lame basale, alors que la galectine-7 est reconnue pour être constitutivement surexprimée chez certaines cellules malignes, leur conférant notamment une résistance à l'apoptose. Son expression aberrante est particulièrement marquée dans les types agressifs de cancers du sein et des ovaires. Plusieurs études ont d'ailleurs démontré un lien étroit entre l'expression de la galectine-7 et l'induction de la MMP-9. L'objectif général de cette thèse visait à mieux comprendre les mécanismes moléculaires responsables de leur surexpression dans les cellules cancéreuses. Plus spécifiquement, nous avons déterminé que : 1) l'inhibition de MMP-9 par la voie de l'EGF et d'EGR-1 est dépendante de l'expression de la cytokine BMP-4 et de la voie de signalisation des Smad1/5/8 et 2) que la présence de la galectine-7 dans le microenvironnement tumoral contribue à son expression cytosolique par deux mécanismes distincts et complémentaires, soit par une induction autocrine transcriptionnelle et par l'endocytose de la forme sécrétée. De plus, nous avons démontré qu'il existe un lien étroit entre l'expression de BMP-4 et l'expression de MMP-9 et galectine-7. L'ensemble de ces résultats nous permet non seulement d'avoir une meilleure compréhension de cette relation entre la galectine-7 et MMP-9 dans les cellules cancéreuses, mais d'identifier de nouvelles pistes pour le développement de nouvelles thérapies contre le cancer, particulièrement les formes agressives pour lesquelles il existe peu de traitements efficaces.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier,

En premier lieu, mon directeur de recherche le *Dr. Yves St-Pierre* qui m'a offert cette extraordinaire opportunité d'effectuer mon doctorat au sein de son laboratoire. Un grand merci pour ton accueil chaleureux dès mon arrivée lors de ma maîtrise, pour ta gentillesse, ta compréhension, ta patience et surtout pour tout ton support. Mille remerciements de plus pour ton incroyable confiance en moi, surtout lors des moments les plus difficiles de cette aventure.

Merci à la merveilleuse *Diane Tremblay*, notre chère technicienne maintenant à la retraite qui m'a initié au travail de laboratoire, qui prenait soin de nous tous, qui nous écoutait et qui nous a toujours encouragés.

Merci à *tous mes collègues étudiants présents et passés : Geneviève, Julie, Fred, Katherine, Carole, Maria, Andrée-Anne, Maryline, Loreнна, Pascal, Cherylann France, Marlène et Clara* merci pour votre ambiance amicale, ce challenge aurait été vraiment beaucoup moins drôle sans vous !

Merci à *tous mes amis et ma famille*, qui m'ont constamment encouragée et soutenue durant ce très long et périlleux parcours. Un remerciement tout particulier à *Daniel* qui m'a offert des opportunités incroyables de vulgarisations scientifiques. Tu ne le sais sans doute pas, mais la première présentation que j'ai faite m'a beaucoup aidée lors d'une période très difficile de mon doctorat. Merci pour ta confiance qui m'a permis de maintenir la mienne.

Mais surtout, le plus grand des remerciements pour celui qui est *mon ami, mon frère, mon ange et mon grand amour : Stéphane*. Tu es le premier à avoir cru en moi et à m'avoir encouragée à poursuivre ce rêve fou. Tu es resté à mes côtés inconditionnellement, dans les bons comme dans les mauvais moments. Tu m'as soutenue sur tous les plans tout le long de cette aventure et tu m'as même patiemment prêté l'oreille sans comprendre un traître mot de ce que je te racontais de mes recherches, juste parce que j'avais besoin que quelqu'un

m'écoute. Ta présence à mes côtés est un cadeau précieux qui me permet tous les jours d'aller toujours plus haut et toujours plus loin. C'est un privilège que de pouvoir grandir à tes côtés et il n'y a pas besoin d'un diplôme pour comprendre cela... *Merci* est un bien trop faible mot pour un sentiment si grand.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ GÉNÉRAL	2
REMERCIEMENTS	3
TABLE DES MATIÈRES	5
LISTE DES FIGURES	7
LISTE DES TABLEAUX	8
LISTE DES ANNEXES	9
LISTE DES ABRÉVIATIONS	10
CHAPITRE 1 :	13
1. LES CANCERS	14
1.1. <i>Histoire et incidence</i>	14
1.2. <i>Étiologie</i>	15
1.3. <i>Histologie</i>	17
1.4. <i>Cancérogenèse</i>	19
1.5. <i>Altérations génétiques et épigénétiques</i>	23
1.5.1. <i>Instabilité génétique</i>	23
1.5.2. <i>Mutations</i>	23
1.5.3. <i>Modification épigénétique</i>	24
1.6. <i>Les gènes du cancer</i>	25
1.6.1. <i>Oncogènes</i>	26
1.6.2. <i>Gènes suppresseurs de tumeurs</i>	26
1.7. <i>Le microenvironnement tumoral</i>	27
1.7.1. <i>Microenvironnement cellulaire</i>	28
1.7.2. <i>Métastases et microenvironnement</i>	30
2. LES METALLOPROTEINASES DE LA MATRICE	33
2.1. <i>Spécificité de substrat</i>	33
2.2. <i>Structure et activation des MMPs</i>	33
2.2.1. <i>Régulation épigénétique</i>	35
2.2.2. <i>Régulation transcriptionnelle des MMPs</i>	35
2.2.3. <i>Régulations post-transcriptionnelles</i>	36
2.3. <i>Fonctions</i>	38

2.3.1.	Fonctions physiologiques des MMPs.....	39
2.4.	<i>MMPs et cancer</i>	40
2.5.	<i>MMP-9 et cancer</i>	44
3.	LES GALECTINES.....	46
3.1.	<i>Structure et classification</i>	46
3.2.	<i>Distribution des galectines</i>	47
3.3.	<i>Ligands</i>	48
3.4.	<i>Fonctions des galectines</i>	52
3.4.1.	Fonctions extracellulaires.....	53
3.4.2.	Fonctions intracellulaires.....	56
3.5.	<i>Galectines et cancers</i>	59
3.6.	<i>La galectine-7</i>	63
3.6.1.	Structure.....	63
3.6.2.	Régulation.....	63
3.6.3.	Galectine-7 et cancer.....	64
	HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DU PROJET DE THÈSE.....	67
	CHAPITRE 2:	69
	CHAPITRE 3 :	80
	CHAPITRE 4 :	106
	CONCLUSION GENERALE	116
	ANNEXES.....	118
	RÉFÉRENCES.....	126

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1: LES PRINCIPALES CAUSES DE DÉCÈS AU CANADA.....	15
FIGURE 2: CANCÉROGENÈSE. SCHÉMATISATION DES TROIS ÉTAPES PRINCIPALES DE LA CANCÉROGENÈSE.....	19
FIGURE 3: CRITÈRES DU PHÉNOTYPE CANCÉREUX.....	22
FIGURE 4: LE MICROENVIRONNEMENT TUMORAL.....	30
FIGURE 5: SCHÉMATISATION DE LA CASCADE MÉTASTATIQUE.....	31
FIGURE 6: CLASSIFICATION ET SCHÉMATISATION DE LA STRUCTURE DES MMPs.....	34
FIGURE 7: MÉCANISME D'ACTIVATION DES PRO-MMPs.....	37
FIGURE 8: DUALITÉ FONCTIONNELLE DES MMPs DANS LA TUMORIGENÈSE.....	43
FIGURE 9: CLASSIFICATION DES GALECTINES CHEZ LES MAMMIFÈRES.....	47
FIGURE 10: LATTICES DE GALECTINES.....	50
FIGURE 11: EXEMPLE D' ACTIONS DES GALECTINES DANS LE SYSTÈME IMMUNITAIRE.....	55
FIGURE 12: INTERACTIONS INTRACELLULAIRES DES GALECTINES.....	58
FIGURE 13: FONCTIONS PRO- ET ANTI-TUMORALES DES GALECTINES CYTOPLASMIQUES, MITOCHONDRIALES OU NUCLÉAIRES.....	60
FIGURE 14: SCHÉMA RÉCAPITULATIF DES RÉSULTATS.....	117

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1: NOMENCLATURE DES GRADES HISTOLOGIQUES	18
TABLEAU 2: STADIFICATION DU CANCER	18
TABLEAU 3: DISTRIBUTION PHYSIOLOGIQUE DES GALECTINES CHEZ L'HUMAIN	48
TABLEAU 4: EXEMPLES DE LIGANDS DES GALECTINES	51

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1 : ACTIVITÉ DU PROMOTEUR NF-κB SUITE À LA STIMULATION PAR LA RECOMBINANTE BMP-4	119
ANNEXE 2: ACTIVITÉ DU PROMOTEUR AP1 SUITE À LA STIMULATION PAR LA RECOMBINANTE BMP-4	120
ANNEXE 3: MODULATION DE L'EXPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE DES GÈNES GALECTINES -1, -3, -7, -8 ET -9 SUITE À LA STIMULATION EXTRACELLULAIRE GALECTINE-7	121
ANNEXE 4: MODULATION DE L'EXPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE DES GÈNES GALECTINES -1, -3 ET -7 SUITE AU TRAITEMENT EXTRACELLULAIRE GALECTINE-1.....	122
ANNEXE 5: L'ENDOCYTOSE DE LA GALECTINE-7 DANS LES CELLULES MDA-MB-231 EST DÉPENDANTE DU CRD.....	123
ANNEXE 6: EFFETS COMBINÉS DES GALECTINES-1, -7 ET -9 SUR LE NIVEAU TRANSCRIPTIONNEL DE LA GALECTINE-7	124
ANNEXE 7: BMP-4 DIMINUE L'EXPRESSION DE LA GALECTINE-7 DANS LES CELLULES MDA-MB-468	125

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
Akt	Protéine kinase B
AP-1	<i>Activator protein-1</i>
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
Bax	Bcl2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma/ leukemia-2
BMP-4	Bone morphogenetic protein 4
CAF	Carcinomes associés aux fibroblastes
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
ChIP	Immunoprécipitation de la chromatine
CRD	Domaine de reconnaissance des carbohydrates
CTD	Cellules tumorales disséminées
DAPI	4', 6'-diamino-2-phénylindole
Dnmt	ADN méthyltransférase
EGF	<i>Epithelial growth factor</i>
EGR1	<i>Early growth response 1</i>
EMMPRIN	<i>Extracellular matrix metalloproteinase inducer</i>
EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>
EMT	Transition épithélio-mésenchymateuse
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FAK	Focal adhesion kinase
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FITC	Fluorescein isothiocyanate
Gal	Galectine
GAPDH	Glyceradehyde-3-phosphate dehydrogenase
Gemin	<i>Gem (nuclear organelle) associated protein</i>
GlcNAc ou NAG	N-acétylglucosamine
HPC	Cellules progénitrices hématopoïétiques
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
IFNβ	Interféron β
IGFBP-3	<i>Insulin-like growth factor binding protein 3</i>
IL	Interleukine
JAK	Janus kinase
JNK	Jun N-terminal Kinase

KO	<i>Knock-out</i>
LacNAc	N-acétyllactosamine
LPS	Lipopolysaccharide
MEC	Matrice extracellulaire
MET	Micro environnement tumoral
mM	millimolaire
MMP	Métalloprotéinase de la matrice
MMR	<i>Mismatch repair</i>
MT-MMP	Métalloprotéinase de la matrice de type membranaire
Nf-κB	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
pb	Paire de base
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PEA3	<i>Polymavirus enhancer A binding-protein-3</i>
PI3K	Phosphoinositidine-3 kinase
PIGF	Facteur de croissance du placenta
PKA	Protéine Kinase A
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
pre-BRC	Récepteur précurseur des cellules lymphocytaires B
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
Rac-1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
Raf-1	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
Ras	<i>Rat sarcoma protein</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
Smad	<i>Similar « mother against decapentaplegic » (MAD)</i>
Sp1	Protéine spécifique 1
TAK1/TAB1	<i>TGFβ Activated Kinase-1/ TAK1 Binding Protein 1</i>
TC	Tissu conjonctif
Tcf-4	<i>Transcription factor-4</i>
TCR	<i>T-cell receptor</i>
TGF	Facteur de croissance transformant
Th1/ 2/ 17	<i>Lymphocytes T helper 1 /2 /17</i>
TIMP	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TNF	Facteur de nécrose tumorale
TTF-1	<i>Thyroid transcription factor-1</i>
UV	Ultraviolet
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
WGA	<i>Wheat germ agglutinin</i>
Wnt	<i>Wingless type protein</i>
Zn²⁺	Ion Zinc

ZO-1
 α -SRA
 μ g
 μ l

Zonula occludens-1
 α -smooth muscle actin
Microgramme
Microlitre

CHAPITRE 1 :

Revue de la littérature

1. Les Cancers

1.1. Histoire et incidence

Contrairement à la croyance populaire, le cancer, ou néoplasie, n'est pas une maladie récente, mais une pathologie aussi vieille que l'humanité. Des tumeurs du sein furent décrites dans le papyrus Ebers, l'un des plus anciens traités médicaux datant de 1600 ans avant J.C.. Des ostéosarcomes ont été diagnostiqués chez des momies égyptiennes (Capasso, 2005, Rapoport *et al.*, 2008) et Hippocrate (-460 av. J.C.) pouvait différencier clairement des cellules malignes cancéreuses de cellules bénignes d'apparence normale (Binder *et al.*, 2014). De nos jours, nos connaissances et progrès technologiques facilitent l'établissement de diagnostics beaucoup plus précoces et précis (Kaur *et al.*, 2016, Rapoport *et al.*, 2008, Valente *et al.*, 2015). De plus, la croissance et l'augmentation de l'espérance de vie (Finkel *et al.*, 2007), ainsi que l'augmentation de nombreux facteurs de risques tels que le tabac, l'alcool, les polluants industriels et autres, expliquent la forte incidence actuelle du cancer. C'est pourquoi, aujourd'hui il est considéré comme un véritable fléau qui s'étend inexorablement et qu'il est urgent d'éradiquer ou du moins de faire régresser par des préventions adaptées et des traitements efficaces.

Selon le dernier rapport statistique mondiale Globocan 2013, la prévalence du cancer serait de 25 millions de personnes avec une incidence à 14 millions dont un peu plus de 8 millions de décès par an (IARC, 2016). La société canadienne du cancer estime que c'est la principale cause de décès (**Figure 1**) et envisage que deux canadiens sur cinq seront diagnostiqués au cours de leur vie et qu'un patient sur quatre en succombera. Ce qui signifie qu'environ 196 900 nouveaux cas et 78 000 décès seront répertoriés uniquement au Canada pour l'année 2015.

Le terme très général de « cancer » ne désigne pas une maladie mais s'applique en fait à un large éventail de pathologies pouvant affecter n'importe quelle partie de notre organisme. Le « National Cancer Institute » dénombre plus de 100 types différents de cancers habituellement nommés selon le type de cellule, de tissu ou d'organe initialement atteint. Le cancer du poumon détient l'incidence la plus élevée dans le monde avec 1.8 million de nouveaux cas en 2012 ainsi que le taux de mortalité le plus fort. Il est suivi par le cancer du sein dont l'incidence est de 1.7 million, le cancer colorectal (1.4 million), le cancer de la prostate (1.1 million) et le cancer de l'estomac (1 million).

Bien que en moyenne les chances de survie suite à un diagnostic de cancer soit d'environ 63% (Comité consultatif de la Société Canadienne du Cancer, 2015), les statistiques varient considérablement selon le

type de cancer. Par exemple, les chances de survie lors d'un diagnostic du cancer de la thyroïde sont de 98% alors qu'un patient atteint du cancer du pancréas est de seulement 8%.

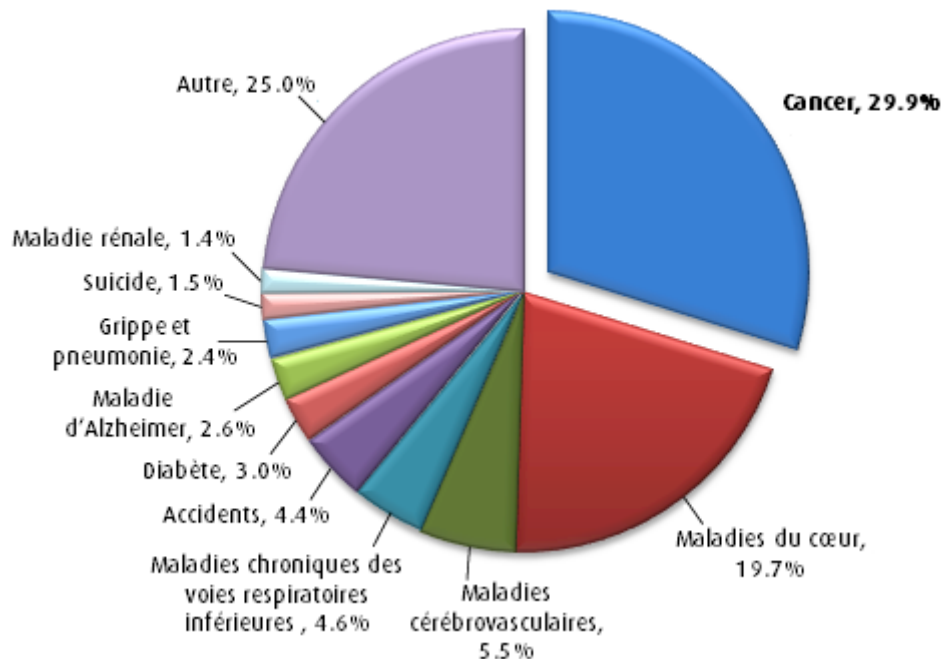


Figure 1: Les principales causes de décès au Canada. Adaptation " Statistique Canada. Principales causes de décès au Canada, 2011, CANSIM Tableau 102-0522"

1.2. Étiologie

Il existe très peu de cas où le cancer représente une cause unique. Les études de son évolution dans les populations ainsi que les observations des processus d'induction de tumeurs chez les animaux de laboratoire ont démontré que c'est une pathologie à cause multigénique qui se caractérise par la présence d'une tumeur maligne formée de cellules transformées suite à des modifications successives de plusieurs gènes. Ces modifications confèrent aux cellules transformées des capacités cancéreuses telles que l'immortalité, l'indépendance aux facteurs de croissance, la résistance aux inhibiteurs de croissance ou à l'apoptose, la néo-vascularisation et l'infiltration de tissus adjacents ou distants. Les altérations de l'ADN peuvent subvenir suite à diverses expositions à des agents génotoxiques endogènes ou exogènes et peuvent favoriser la divergence génétique entre une cellule normale et tumorale (Singh *et al.*, 2007).

Les agents génotoxiques exogènes ou *facteurs de risques externes* comprennent les cancérogènes physiques tels que les rayonnements ultraviolets et ioniques, les cancérogènes biologiques suite à une

infection chronique qui représentent près de 20% des néoplasies, les principales étant dues aux virus de l'hépatite B et C, au virus du papillome humain ou à l'infection bactérienne *Helicobacter pylori*, et les cancérigènes chimiques tels que des polluants, l'amiante, le tabac et autres (Boffetta, 2006). Aussi, selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), 30% des décès par cancer sont étroitement liés au mode de vie tel que l'environnement professionnel, qui peut favoriser l'exposition à des cancérigènes, les habitudes comme le tabac (Boyle *et al.*, 1995), l'alcool (Lachenmeier *et al.*, 2012), l'alimentation (Mandair *et al.*, 2014), la sédentarité (Ballard-Barbash *et al.*, 2012) ou l'obésité (Key *et al.*, 2010) (Renehan *et al.*, 2008). L'exposition répétée ou soutenue à ces facteurs de risques externes peut alors contribuer à l'apparition de lésions génétiques irréversibles. Les agents génotoxiques endogènes, ou *facteurs de risque internes*, sont plutôt d'ordre génétique et/ou épigénétique et comprennent notamment l'hérédité, les dérèglements hormonaux, ou un système immunitaire faible. Également, les métabolites, comme les substances oxygénées ROS (*reactive oxygen substances*), peuvent altérer le génome (De Bont *et al.*, 2004). Même si tous les cancers sont considérés comme des pathologies à base génétique, seulement 10% d'entre eux sont réellement liés à une altération constitutionnelle héréditaire (germinale) (Comité consultatif de la Société Canadienne du Cancer, 2015). Aussi, il est parfois très difficile de déterminer si les tendances d'une famille au développement d'un certain type de cancer sont réellement dues à des facteurs génétiques héréditaires ou plutôt à un mode de vie commun. Toutefois, il est clair que l'apparition et l'accumulation au cours d'une vie de changements génétiques ou épigénétiques (somatiques) spontanés est en cause dans la plupart des cancers.

Bien que toutes les populations sans exception soient touchées par cette maladie, les probabilités de développer une tumeur et les chances de survies peuvent varier selon certains critères tels que l'ethnie, le genre ou l'âge des individus (Soeberg *et al.*, 2015). Aussi, les statistiques démontrent que la gent masculine présente un peu plus de cas de cancer avec un taux de mortalité légèrement plus élevé que la population féminine (Anonyme, 1989). Effectivement, l'Institut National du Cancer américain estime qu'un homme sur deux et une femme sur trois développeront cette maladie au cours de leur vie (American Cancer Society, 2012).

L'âge est également un facteur à considérer dans les probabilités de développer un cancer puisque l'incidence de cette pathologie augmente de manière exponentielle avec l'âge des sujets (D. Li *et al.*, 2016). La majorité des Canadiens (89%) qui développent une néoplasie sont dans une tranche d'âge de 50 ans et plus et il avait été estimé que 43% des nouveaux cas en 2015 toucheraient des personnes de 70 ans et plus (Comité consultatif de la Société Canadienne du Cancer, 2015). Certaines études soulèvent

un lien de causalité entre le vieillissement cellulaire et le cancer. Par exemple, les souris transgéniques avec une surexpression de *p53*, un gène suppresseur de tumeur, sont protégées du développement d'un cancer tout en présentant une espérance de vie clairement diminuée (Tyner *et al.*, 2002). De plus, l'âge semble également agir sur les pronostics puisque 96% des décès par cancer au Canada surviennent chez les personnes de plus de 50 ans et 62% chez les patients de plus de 70 ans. Bien que l'incidence auprès des jeunes enfants soit moindre avec seulement 1%, elle est par contre des plus dévastatrice puisque le cancer représente la principale cause de décès chez les moins de 15 ans. Il est aussi à noter que 50% des cancers juvéniles émergent avant l'âge de 5 ans et les formes les plus courantes sont des leucémies, des lymphomes et des tumeurs cérébrales (American Cancer Society, 2012).

Le « *World Cancer Report 2014* » estime que l'incidence du cancer devrait augmenter à l'échelle mondiale de 14 millions au cours des deux prochaines décennies et la Société Canadienne du Cancer prévoit une augmentation approximative de 79% dans le cas du Canada (Comité consultatif de la Société Canadienne du Cancer, 2015).

1.3. Histologie

L'analyse histologique est couramment employée afin d'identifier et classer les tumeurs pour une bonne prise en charge des patients dans le choix de leurs traitements et dans le pronostic évolutif de la maladie. Elle permet de distinguer les tumeurs dites bénignes (non-cancéreuses), des tumeurs malignes (cancéreuses). Le caractère bénin ou malin d'une tumeur repose sur les observations histologiques macroscopiques des tumeurs (taille, nécrose, vascularisation...) mais aussi microscopiques et immunohistochimiques des biopsies tumorales selon leur degré de différenciation, de grade et de stade.

On distingue quatre grades histologiques qui reposent sur deux critères. Le premier critère est basé sur la différenciation des cellules tumorales comparativement aux cellules normales. Le second est basé sur la vitesse de croissance de la tumeur (**Tableau 1**). Dans un tissu normal, la différenciation correspondra aux caractères phénotypiques, immunohistochimiques et enzymatiques des cellules qui le constitue. Ces critères sont propres aux fonctions qu'exercent les cellules. La transformation de cellules normales en cellules tumorales tend à perdre progressivement les caractéristiques de différenciation d'origine. Plusieurs degrés sont identifiables, allant de « peu différencié », « modérément différencié » jusqu'à totalement « indifférencié ». Ainsi, un néoplasme bénin est « *bien différencié* » et reproduit les caractéristiques générales du tissu d'origine et ne met généralement pas la vie du patient en danger. De

plus, il a tendance à se développer lentement et à rester localisé, ce qui lui confère un bas grade histologique. À l'inverse, une tumeur maligne est majoritairement constituée de cellules « *indifférenciées* », c'est à dire qu'elles ont perdues progressivement leur différenciation morphologique, immunohistochimique et fonctionnelle d'origine. Leur activité mitotique est beaucoup plus élevée que celle du tissu d'origine ce qui leur confère un haut grade histologique.

La stadification du cancer (de 0 à IV) permet de décrire la maladie selon son extension anatomique. Ce critère dépendra de la classification TNM (*Tumor Node Metastasis*) qui repose sur la taille de la tumeur primaire (T), la présence de cellules cancéreuses dans les ganglions avoisinants, sur la propagation dans les ganglions lymphatiques (N) et finalement sur la propagation de métastases M) vers les organes éloignés. Le stade va donc varier selon la progression de la maladie (**Tableau 2**).

Tableau 1: Nomenclature des grades histologiques. Adaptation selon la "Société Canadienne du cancer"

Nomenclature	Différenciation cellulaire	Grade
G1	Bien différenciée	Bas grade
G2	Modérément différenciée	Grade intermédiaire
G3	Peu différenciée	Haut grade
G4	Indifférenciée	Haut Grade

Tableau 2: Stadification du cancer. Adaptation selon la « Société Canadienne du Cancer »

Stades	Invasion
0	<i>in situ</i>
I	Site primaire & +/- tissus avoisinants
II	Propagation localisée aux tissus avoisinants
III	Propagation profonde des tissus avoisinant ou
IV	Propagation éloignée sur site secondaire

1.4. Cancérogenèse

Le cancer est une pathologie multigénique qui nécessite plusieurs modifications génétiques et épigénétiques. Normalement, on décrit le développement d'une tumeur en un processus qui passe par trois étapes distinctes (**Figure 2**). La première étape, *l'initiation*, débute par la transformation de cellules somatiques et l'apparition de lésions irréversibles de l'ADN. La cellule nouvellement transformée peut rester dans un « état de latence néoplasique » de manière indéterminée. Chez l'adulte, cette période est généralement longue au cours de laquelle les étapes de *promotion* et de *progression* peuvent survenir.

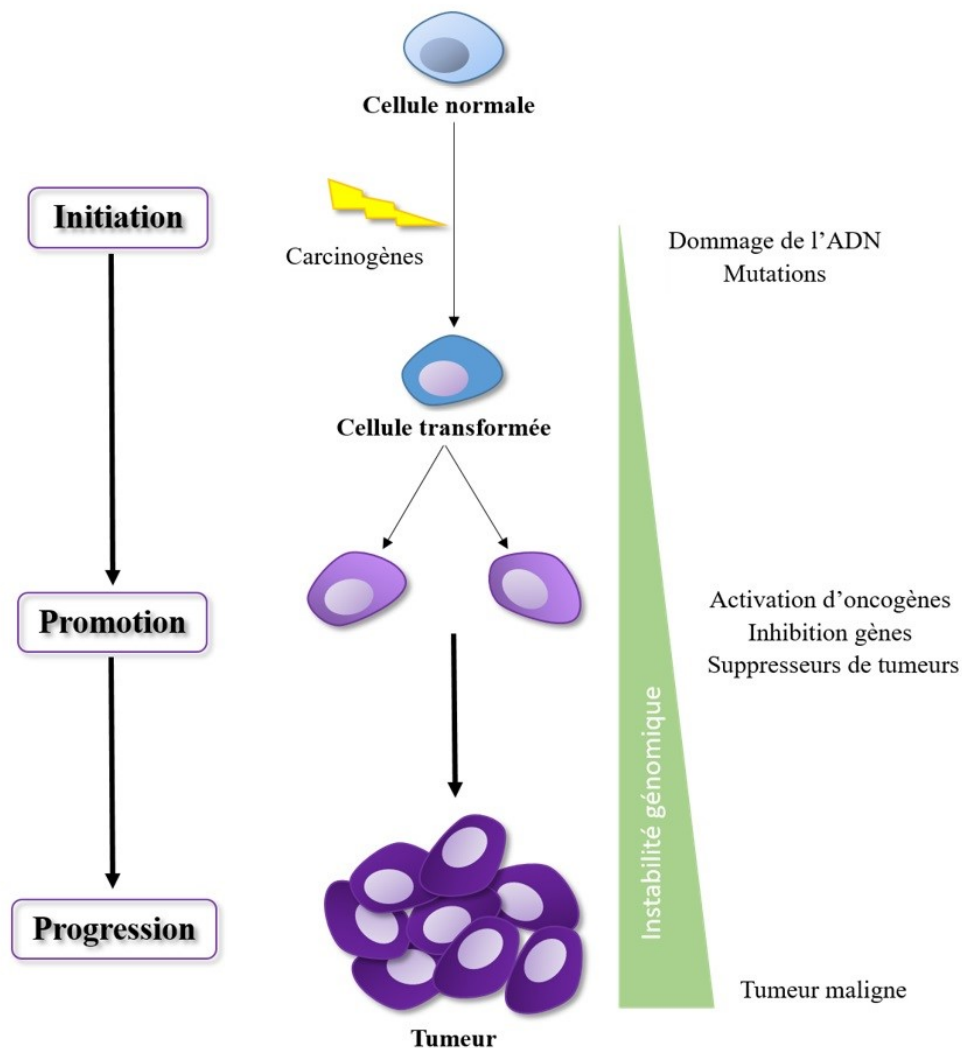


Figure 2: Cancérogenèse. Schématisation des trois étapes principales de la cancérogenèse.

La cancérogenèse juvénile est toutefois différente et se caractérise par une période de latence beaucoup plus courte tout en étant rapidement agressive et invasive (Comité consultatif de la Société Canadienne du Cancer, 2015). Suite à l'initiation, des promoteurs tels que des hormones, des facteurs de croissance, de l'inflammation ou un stress tissulaire, peuvent stimuler et prédisposer les cellules initiées à des altérations génétiques additionnelles. Cette période de promotion tumorale va permettre l'expansion clonale et sélective des cellules initiées en une dysplasie *in situ* progressive. L'instabilité génétique intrinsèque toujours plus grande des cellules transformées favorise progressivement l'apparition des caractères phénotypiques d'une cellule cancéreuse maligne par acquisition d'anomalies qui confèrent des avantages de croissance et d'expansion clonale.

Hanahan et Weinberg (Hanahan *et al.*, 2011) ont identifié les « Hallmarks of cancer » ou les capacités distinctes du phénotype cancéreux (**Figure 3**), qui sont :

- La capacité ***anormale de division cellulaire*** et ***l'indépendance aux signaux de prolifération*** généralement dû à l'activation soutenue d'oncogènes. Les mécanismes peuvent être multiples, tels que par une stimulation permanente autocrine et/ou paracrine de mitogènes normalement limités (Evan *et al.*, 2001), par l'inhibition des boucles rétroactives négatives qui agissent pour contrôler et empêcher la prolifération excessive (Sudarsanam *et al.*, 2010), ou via une surexpression ou une activité constitutive des récepteurs de prolifération à la surface des cellules cancéreuses (Machiels *et al.*, 2015, S. V. Sharma *et al.*, 2007)
- Une ***insensibilité aux signaux anti-prolifération*** qui contribue à la multiplication anarchique et incontrôlée des cellules. Par exemple, les effets suppresseur de tumeur de TGF β (Transforming Growth Factor – β) qui entraîne en temps normal l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 par l'induction de p21, sont fréquemment perdus lors de tumeurs (Derynck *et al.*, 2001).
- ***L'immortalisation*** et ***la prolifération illimitée***. Les cellules néoplasiques vont échapper au processus de vieillissement cellulaire en bloquant les mécanismes de sénescence et en permettant la dérégulation de la télomérase (Loaiza *et al.*, 2016).
- Une forte ***résistance à l'apoptose*** par inactivation ou disparition de gènes suppresseurs de tumeur. Les processus impliqués peuvent être multiples, tels que par la modification des mécanismes de reconnaissance d'altération ou d'anomalies cellulaires, ou encore par des mutations des acteurs protéiques impliqués dans l'apoptose tels que p53 ou Bcl2 (Hata *et al.*, 2015).

- **Altération des métabolismes cellulaires** qui supportent la division cellulaire des cellules tumorales tels qu'une importante dérégulation du métabolisme bioénergétique, de biosynthèse et de redox (Cairns *et al.*, 2011). Les cellules cancéreuses obtiennent principalement leur apport en énergie via une glycolyse accrue du glucose (« *effet Warburg* ») (Vander Heiden *et al.*, 2009). Les métabolites intermédiaires de la glycolyse contribuent à la synthèse d'acides nucléiques, acides aminés ainsi que de protéines et la production d'acide lactique permet l'acidification du microenvironnement tumoral ce qui contribue favorablement à la tumorigenèse (Doherty *et al.*, 2013).
- « **Switch angiogénique** ». Afin de contrer l'effet hypoxique d'une hyperplasie tumorale, les cellules néoplasiques vont activer les mécanismes *d'angiogenèse* ainsi que *bloquer ses inhibiteurs moléculaires*. La tumeur va développer un réseau vasculaire permettant l'apport de tous les nutriments et oxygène nécessaires à sa survie ainsi que le moyen d'évacuer ses déchets métaboliques et le dioxyde de carbone. Dans ces conditions, les nouveaux vaisseaux formés ont une organisation structurale anarchique et immature qui leur confère une fragilité et souvent un potentiel hémorragique (Carmeliet *et al.*, 2000). Effectivement, leurs parois présentent des espacements dus à des jonctions intercellulaires lâches, la membrane basale est discontinue voir même absente et leur recouvrement par les péricytes est très anormal (Benjamin *et al.*, 1999). Ainsi, l'angiogenèse va contribuer au développement tumoral mais aussi à la dissémination des métastases.
- **Changements des caractéristiques immunologiques** qui permettent « *l'immunoediting* » qui exerce une pression sélective clonale des cellules tumorales ayant acquis certaines facultés ***d'échappement du système immunitaire***. Ces mécanismes peuvent être multiples, par des modifications membranaires dues à la perte d'antigènes tumoraux ou à des anomalies dans leur présentation par les protéines du CMH (Complexe Majeur Histocompatibilité) (Khong *et al.*, 2004) et/ou par des modifications d'expressions des récepteurs de facteur de nécrose (TNFR, *tumor necrosis factor receptors*) et/ou des ligands inhibiteurs de l'activation des lymphocytes T cytotoxiques (Topfer *et al.*, 2011).
- La ***perte de l'inhibition de contact*** va mener à l'émergence de clones malins agressifs qui se caractérisent par la mobilité cellulaire et la perte de cohésion intercellulaire. Les cellules tumorales d'origine épithéliale subissent ce que l'on nomme le processus de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Elles vont perdre leur adhésion cellule-cellule via une diminution de E-cadhérine pour une surexpression de N-cadhérine, privant ainsi les cellules néoplasiques de ce

suppresseur clé de la motilité. La « *cascade métastatique* » se poursuit par l'invasion des cellules malignes dans la MEC. Finalement, la fragilité vasculaire décrite précédemment va faciliter l'intravasation des cellules malignes dans la circulation sanguine ou lymphatique ainsi que leur extravasation et nidification sur de nouveaux sites secondaires communément nommés « *métastases* ».

À ces caractéristiques viennent se greffer deux paramètres importants qui sont une constante et croissante *instabilité génétique* (voir chapitre 1.5.1) qui va favoriser l'apparition progressive des anomalies cancéreuses ainsi qu'un processus *d'inflammation chronique* qui contribue à la tumorigénèse.

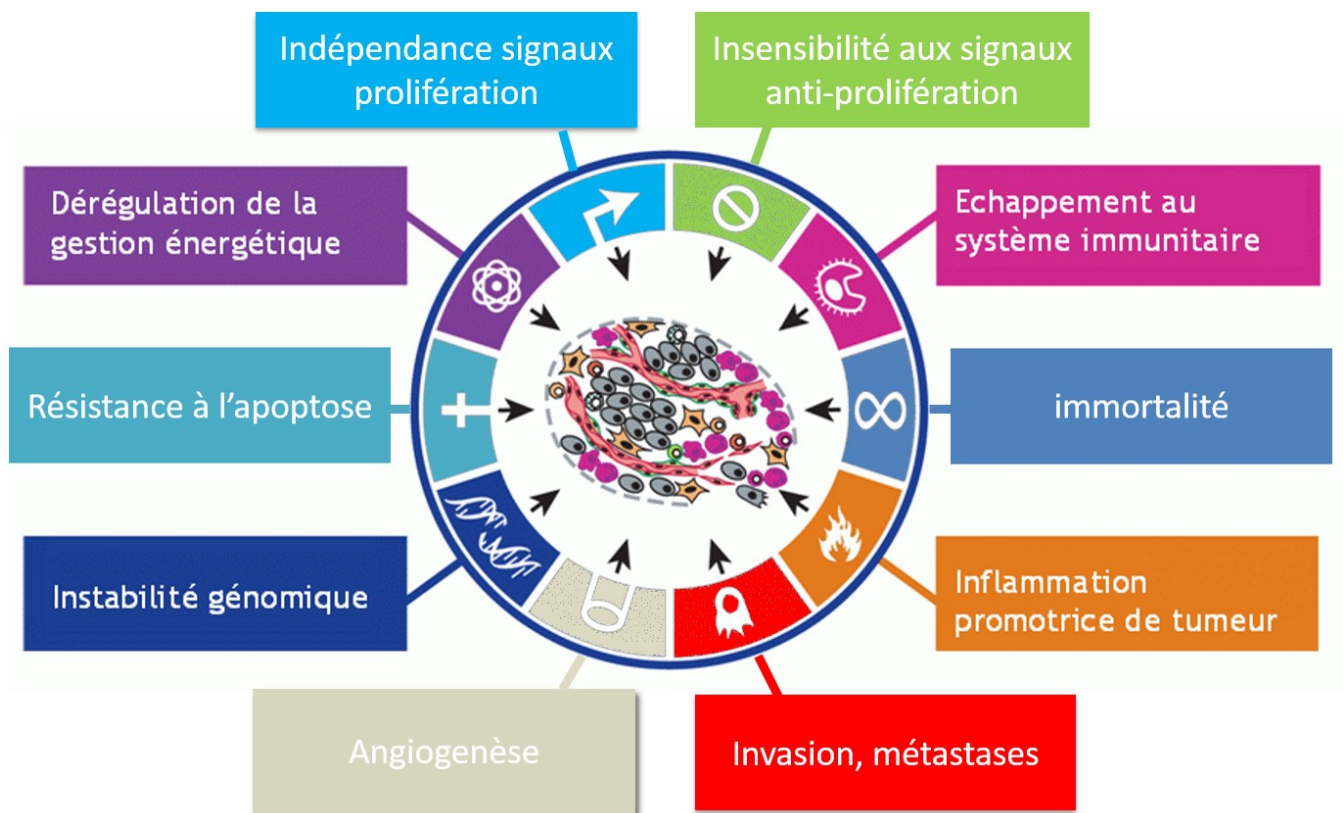


Figure 3: Critères du phénotype cancéreux. Adaptation (Hanahan et al., 2011)

1.5. Altérations génétiques et épigénétiques

Les premières indications du rôle central du génome sur le développement d'un cancer datent de la fin du XIX^{ème} et début du XX^{ème} siècle, grâce aux observations d'aberrations mitotiques et chromosomiques de cellules cancéreuses par David Von Hansemann et Theodor Boveri (Hardy *et al.*, 2005). Aujourd'hui il est clairement démontré que les cancers sont des pathologies d'origine génétique (Weinberg, 2007).

1.5.1. Instabilité génétique

L'instabilité génétique correspond à la fréquence de mutagenèse d'une cellule. Nos cellules sont soumises en permanence à des stress génotoxiques spontanés ou environnementaux qui peuvent compromettre leur intégrité génomique. Une cellule normale possède plusieurs mécanismes moléculaires de surveillance qui détectent ces erreurs génomiques et permettent l'arrêt du cycle cellulaire afin d'enclencher la réparation des dommages ou encore d'induire la mort cellulaire par apoptose lorsque ces derniers sont trop importants. Or, ces mécanismes sont déficients dans les cellules cancéreuses, aboutissant à une importante et croissante instabilité génétique qui permet une accumulation d'anomalies génotypiques et/ou caryotypiques (mutations). Les tumeurs malignes acquièrent ce qu'on nomme un « phénotype mutateur » (Loeb *et al.*, 2003)

1.5.2. Mutations

Les mutations sont des événements aléatoires qui modifient l'information génétique. Elles sont provoquées de manière accidentelle lors de la réplication ou de la division cellulaire ou induites par des facteurs mutagènes, des virus ou des transposons (Chenais, 2013). Les mutations sont héréditaires uniquement si elles touchent les cellules germinales, hors dans la majorité des cas elles affectent les cellules somatiques. Les mutations peuvent être dues à des erreurs mineures et ponctuelles au niveau des nucléotides ou encore à des changements majeurs au niveau de la structure ou du nombre de chromosomes.

On peut distinguer plusieurs sortes de mutations somatiques ponctuelles : 95% sont des *mutations par substitution* d'un nucléotide par un autre lors de la réplication. Du fait de leur structure répétitive les microsatellites de l'ADN sont particulièrement sujets à ce type d'erreurs (Watson *et al.*, 2014). Les 5% restant se divisent entre des mutations somatiques par délétion ou insertion d'une ou plusieurs bases. Toutefois, toutes les mutations ne contribuent pas obligatoirement à l'initiation ou la progression d'un cancer, les mutations dites passives (*passenger mutations*) n'avantage pas la progression tumorale à

l'inverse des mutations promotrices (*driver mutations*) qui touchent « les gènes du cancer » et contribuent directement au phénotype tumoral (Pon *et al.*, 2015, Vogelstein *et al.*, 2013). Aussi, on estime que chaque mutation *driver* confère approximativement un avantage sélectif de croissance de 0.4% conduisant progressivement à une masse de plusieurs milliards de cellules (Bozic *et al.*, 2010). Il y a une évidente corrélation entre l'âge des patients et le nombre de mutations, entre autres les cancers juvéniles affichent beaucoup moins de mutations que les tumeurs adultes.

Les *mutations chromosomiques* ou *aneuploïdies* se retrouvent dans la majorité des cancers et sont considérées comme un « facteur de mauvais pronostic » comparativement à un cancer diploïde (Zhou *et al.*, 2002). Certaines études suggèrent même que l'aneuploïdie est souvent un évènement précoce et essentiel à la tumorigenèse (Duesberg *et al.*, 1999), ou lorsqu'elle est plus tardive devient un acteur important de l'agressivité tumorale (Dutertre *et al.*, 2002). Ces mutations chromosomiques vont altérer qualitativement ou quantitativement l'expression des gènes touchés. Toutefois, le nombre de mutations dans un cancer varie selon le type de tumeur et de mutagènes impliqués. Par exemple, un cancer des poumons d'un fumeur va présenter dix fois plus de mutations que pour un non-fumeur (Govindan *et al.*, 2012).

1.5.3. Modification épigénétique

Les découvertes de ces 20 dernières années démontrent une relation étroite entre des modifications épigénétiques et de nombreuses pathologies dont les cancers (Feinberg *et al.*, 2004, Jones *et al.*, 2002). Les mécanismes épigénétiques impliquent des processus moléculaires qui permettent de moduler l'expression des gènes sans altérations génétiques directes. Les modifications des histones, la méthylation des îlots CpG de l'ADN et les microARNs sont les trois piliers de la régulation épigénétique qui peuvent agir seuls ou combinés afin de diriger l'expression des gènes.

La méthylation de résidus lysine des histones des nucléosomes entraîne généralement la condensation de la chromatine bloquant ainsi directement l'accès aux gènes, tandis que l'acétylation favorise principalement la décondensation de la chromatine libérant ainsi les gènes pour leur éventuelle transcription. Toutefois, la modification chimique par méthylation des sites CpG au niveau des promoteurs des gènes peut également inhiber l'expression génique. Effectivement, une hyperméthylation d'un promoteur se traduit généralement par une inhibition de sa transcription, à l'inverse, une hypométhylation libère l'accès du promoteur à toute la machinerie transcriptionnelle (S. Sharma *et al.*, 2010). Finalement, les microARNs dont le rôle principal est de bloquer la traduction en

protéines des ARN messagers auxquels ils vont se fixer par complémentarité des bases, permettent une régulation épigénétique post-transcriptionnelle (H. Dong *et al.*, 2013).

Le profil épigénétique d'une cellule est dynamique et réversible ; il peut être modulé selon l'âge et les facteurs environnementaux de l'organisme (Christensen *et al.*, 2009). Des études démontrent d'ailleurs l'impact des facteurs environnementaux et des modes de vie à risques sur l'apparition d'épimutations qui dans certains cas peuvent favoriser l'initiation (Feinberg *et al.*, 2006) ou la promotion néoplasique (Herceg *et al.*, 2011, Hou *et al.*, 2012). Par exemple, une recherche faite en Suède souligne la relation entre le tabagisme et des modifications épigénétiques qui peuvent augmenter les risques de tumeurs (Besingi *et al.*, 2014). De même, les perturbateurs endocriniens (Bisphénol A, insecticides, fongicides etc.) sont largement étudiés et reconnus pour modifier le profil de méthylation de l'ADN ayant pour conséquences de nombreuses malformations embryonnaires, voire même le développement de tumeurs chez les souris (Bromer *et al.*, 2009, Susiarjo *et al.*, 2013). L'épigénétique apparait donc comme à l'interface entre l'environnement et le génome. Lors d'un cancer, le profil épigénomique des cellules tumorales arbore d'importantes modifications, l'une d'entre elles durant la transformation néoplasique étant la glycosylation post-traductionnelle (Fuster *et al.*, 2005). Bien que tous les mécanismes moléculaires impliqués dans les modifications épigénétiques ne soient pas encore totalement compris, il est clair que l'hyperméthylation des îlots CpG conduit généralement à mettre sous silence les gènes suppresseurs de tumeurs, alors qu'une hypométhylation globale du génome favorise l'activation des oncogènes.

1.6. Les gènes du cancer

On dénombre près de 400 gènes impliqués dans le développement d'un cancer (Greenman *et al.*, 2007). Seulement 70 sont associés à des mutations germinales alors que plus de 342 d'entre eux sont attribuables à des mutations somatiques (R. K. Thomas *et al.*, 2007). Des études ont démontré que certains gènes fréquemment mutés nommés « montagnes » sont communément partagés par les tumeurs d'un même type (colorectal ou sein) alors qu'un plus grand nombre de gènes dits « collines » sont mutés chez moins de 5% des individus (Wood *et al.*, 2007). Ceci suggère que seulement quelques mutations génétiques sont communes et que chaque tumeur présente un profil génomique qui lui est propre. Toutefois, les gènes « *driver* » participent à la modulation de voies de signalisations cruciales qui confèrent un avantage de croissance sélective des cellules tumorales via trois processus cellulaires essentiels : la survie, le destin cellulaire ainsi que la maintenance génomique.

Cependant, de manière générale, on peut distinguer deux catégories de gènes couramment mutés lors de cancers : *les oncogènes* et *les gènes suppresseurs de tumeurs* ou anti-oncogènes. À l'état normal, un équilibre existe entre l'expression de ces deux catégories et leur mutation éventuelle peut rompre l'équilibre et favoriser la tumorigenèse.

1.6.1. Oncogènes

Les oncogènes découlent de la mutation de proto-oncogènes, des gènes régulateurs positifs de la prolifération et de la différenciation. Ainsi, les proto-oncogènes codent pour les protéines impliquées dans l'ensemble de ces mécanismes cellulaires ; on y retrouve les gènes codant pour des facteurs de croissance ou d'angiogenèse, des récepteurs membranaires ainsi que l'ensemble des molécules intervenant dans la signalisation intracellulaire jusqu'au noyau. Généralement, les mutations de proto-oncogènes sont dominantes et l'altération d'un seul allèle est suffisante pour entraîner une activation anormale oncogénique.

Les oncogènes conduisent à des modifications qualitatives ou quantitatives de l'expression de ces gènes et confèrent alors un phénotype cancéreux à une cellule initialement normale. Ils permettent généralement une augmentation incontrôlée de la croissance et de la prolifération cellulaire, parfois une diminution de la différenciation ou une inhibition de la mort cellulaire. Par exemple, 20 à 25% des tumeurs présentent des mutations ponctuelles dans la famille du proto-oncogène *ras* (K-ras, N-ras, H-ras) (Downward, 2003) qui est impliqué dans la multiplication cellulaire. Sous sa forme mutée, *K-ras* code pour une protéine tronquée qui est constitutivement active indépendamment de toutes stimulations (Takashima *et al.*, 2013) et favorise ainsi la prolifération tumorale. À date, il a été répertorié plus de 100 oncogènes ont été répertoriés.

1.6.2. Gènes suppresseurs de tumeurs

Les gènes suppresseurs de tumeurs sont quant à eux impliqués dans la régulation négative de la prolifération cellulaire et agissent soit en inhibant des voies de signalisation qui peuvent favoriser l'oncogenèse, soit en activant des voies qui peuvent bloquer l'oncogenèse. Les gènes suppresseurs de tumeur peuvent être classés en 2 catégories de gènes : les gènes impliqués dans le *contrôle de la prolifération et de la survie cellulaire* et les gènes *du maintien de l'intégrité génomique*. On observe régulièrement l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs dans les cellules cancéreuses.

L'initiation la plus courante de la cancérogenèse est l'inactivation du gène suppresseur de tumeur *p53* (M. P. Kim *et al.*, 2015). Cette protéine joue un rôle crucial en tant que « *point de contrôle* » du cycle cellulaire. Lors de la détection d'un dommage sur l'ADN, *p53* provoque l'arrêt du cycle cellulaire afin de permettre les réparations du génome où il induit l'apoptose si les dommages sont trop importants. L'altération de *p53* est communément observable dans la majorité des cancers; 70% des carcinomes ovariens (Corney *et al.*, 2008), 54% des carcinomes du sein invasifs (Shah *et al.*, 2012), 86% dans les cancers des poumons à petites cellules (Rudin *et al.*, 2012) et 73% chez les cancers du pancréas (Yachida *et al.*, 2012).

Les *gènes de réparation de l'ADN* sont un autre groupe de gènes suppresseurs de tumeurs capables de détecter et de réparer des lésions portées au génome avant que ces altérations ne soient transmises à la nouvelle génération cellulaire. Par exemple, la machinerie de réparation des mésappariements de l'ADN (*MMR mismatch repair*) permet l'élimination de mutations induites par un mauvais appariement des bases azotées lors de la réplication génomique, mais corrige aussi les boucles d'insertions ou de délétions qui peuvent résulter d'un glissement de la machinerie de réplication. Les gènes *MMR* ont été identifiés comme des gènes fortement impliqués dans de nombreux types de cancers. En outre, la mutation germinale de *MMR* est une des causes susceptibles du cancer du côlon héréditaire (Peltomaki, 1997). Une étude récente semble aussi démontrer que l'altération de *MMR* est significativement associée avec la taille et la dysplasie de haut grade des adénomes (Tanaka *et al.*, 2016).

Bien que ces deux catégories de « gènes du cancer » soient les principaux acteurs de la tumorigenèse, d'autres gènes peuvent être impliqués tels que les gènes favorisant l'échappement immunitaire (Shukla *et al.*, 2015) ou encore l'angiogenèse (Derynck *et al.*, 2001).

1.7. Le microenvironnement tumoral

L'importance du microenvironnement tumoral (MET) a été suggérée pour la première fois en 1889 par le chirurgien Stephen Paget (Anonyme, 1989) via la théorie du « *seed and soil* ». Cette théorie attribue un rôle primordial au MET (« le sol ») dans la dissémination des cellules cancéreuses (« la graine »). De nos jours, il est clairement démontré que le MET joue un rôle prépondérant sur le caractère invasif d'un cancer primitif qui ne se limite pas à la seule accumulation d'anomalies génotypiques ou épigénotypiques.

Le microenvironnement se définit comme étant l'ensemble des composants cellulaires et moléculaires de la matrice extracellulaire (MEC) qui entoure un tissu, un organe ou dans le cas qui nous intéresse la tumeur (Swartz *et al.*, 2012). Un microenvironnement « normal » est complexe et dynamique ; sa constitution dépendra de la nature du tissu auquel il appartient et avec qui il a un échange permanent et réciproque. Aussi l'homéostasie « normale » du microenvironnement joue un rôle suppresseur de la tumeur. À l'inverse, des perturbations dans le microenvironnement peuvent favoriser la transformation des cellules et la présence de cellules précancéreuses ou cancéreuses modifie le microenvironnement normal en MET qui évolue au fur et à mesure de la tumorigenèse (Witz *et al.*, 2006) et supporte la progression tumorale jusqu'à la dissémination et la colonisation de sites secondaires métastatiques. Le MET diffère par sa composition biochimique de la MEC et par un détournement comportemental des cellules stromales qui vont répondre aux besoins de la tumeur pour lui permettre de croître et de se propager. Les interactions bidirectionnelles entre les cellules tumorales avec les composants du MET permettent de moduler l'évolution tumorale ainsi que la réponse immunitaire qui lui est associée (Joyce *et al.*, 2009). **(Figure 4)**

1.7.1. Microenvironnement cellulaire

Les composantes cellulaires du MET englobent toutes les cellules avoisinantes et comprennent diverses populations cellulaires telles que les *cellules adjacentes* directes (cellules avoisinantes du même tissu) et des *cellules résidentes* du tissu conjonctif (TC) telles que les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules du système immunitaire. Hormis le comportement anormal des cellules cancéreuses, les cellules stromales non-cancéreuses du MET vont présenter de nombreuses anomalies phénotypiques et fonctionnelles. Les médiateurs solubles sécrétés par les cellules stromales vont induire des modifications du MET. Ces médiateurs comprennent de nombreux facteurs de croissances ou angiogéniques, des cytokines, des chimiokines ou des enzymes, qui peuvent moduler diverses voies de signalisations et agir sur divers mécanismes tels que le cycle cellulaire, la différenciation (Coulouarn *et al.*, 2012), l'ancrage à la MEC, l'angiogenèse, la migration et le recrutement des cellules du système immunitaire.

Les fibroblastes sont des cellules résidentes de la MEC qui contribuent à divers processus tels que la réparation tissulaire (Furtado *et al.*, 2016), la réaction inflammatoire (Ball *et al.*, 2016), la production d'enzymes (Boyd, 1996), la sécrétion de multiples médiateurs moléculaires (K. A. Thomas, 1987) et la production de divers composants de la MEC (Landau *et al.*, 2015). Les « *fibroblastes associés au*

cancer » (CAF) sont activés par des facteurs de croissance tels que TGF β ou de chimiokines tels que MCP1 (*Monocyte chemotactic protein1*) sécrétés par les cellules tumorales ou stromales (Gharaee-Kermani *et al.*, 1996). Les CAF se distinguent des fibroblastes normaux par une multiplication rapide et une mobilité accrue qui s'accompagnent d'un remodelage de la MEC via une surproduction de macromolécules de la MEC et d'enzymes hydrolytiques (Eck *et al.*, 2009). De plus, les ils vont sécréter divers facteurs de croissances ou angiogéniques, des chimiokines et fréquemment produire des molécules normalement inexprimées (Madar *et al.*, 2013). L'ensemble de ces changements qui sont induit par les interrelations entre les CAF et les cellules cancéreuses favorise la progression tumorale et contribue à leurs phénotypes agressifs (Shiga *et al.*, 2015, Yamaguchi *et al.*, 2015).

Les cellules immunitaires sont omniprésentes dans les tissus conjonctifs et participent normalement à la reconnaissance d'antigènes et aux réactions inflammatoires. Aussi, les tumeurs sont fréquemment associées à de l'inflammation chronique du fait qu'elles recrutent beaucoup de cellules immunitaires dans le MET grâce à un chimiotactisme élevé majoritairement stimulé par les cellules stromales détournées de la tumeur. Les cellules immunitaires peuvent avoir un effet anti-tumoral par la reconnaissance d'antigènes tumoraux et la destruction des cellules qui les expriment. Or, les cellules immunitaires associées au cancer vont avoir un effet pro-tumoral par l'expression de facteurs de croissance tels que EGF, FGF (*fibroblast growth factor*) ou angiogéniques tel que VEGF (Qian *et al.*, 2010). Le remodelage de la MEC est un effet pro-tumoral fréquemment observé dans les populations de cellules immunitaires associées aux tumeurs. Par exemple, les macrophages associés au cancer sécrètent des enzymes hydrolytiques telles que des protéases et régulent la fibrogénèse du collagène favorisant ainsi l'échappement et la migration des cellules malignes (Pollard, 2008). Ils peuvent également participer à la production d'un microenvironnement immunosuppresseur qui inhibe directement les acteurs de la défense immunitaire effectrice, ou induit la tolérance immune (Facciabene *et al.*, 2012) tout en favorisant le recrutement des cellules immunitaires inhibitrices (Muenst *et al.*, 2016). Par exemple, il a été démontré que les macrophages associés au cancer peuvent induire un chimiotactisme ciblé des cellules *lymphocytaires T régulateurs* (Treg) qui inhibent la réponse immunitaire effectrice des lymphocytes T cytotoxiques (Mantovani *et al.*, 2004). De plus, la forte concentration des Treg dans le MET semble aussi contribuer à la vascularisation des tumeurs (Pucino *et al.*, 2014).

Les cellules tumorales induisent aussi des modifications comportementales des cellules endothéliales avoisinantes. Ces dernières vont présenter un taux de prolifération et une migration anormale ainsi qu'une surexpression des récepteurs et médiateurs pro-angiogéniques (tels que VEGFR et VEGF) qui

augmente la néo-vascularisation de la tumeur (Costache *et al.*, 2015). De plus, les cellules endothéliales vont fréquemment présenter des altérations dans leurs interactions cellules-cellules et cellules-MEC qui vont fragiliser l'étanchéité des vaisseaux sanguins ou lymphatiques et faciliter l'infiltration des neutrophiles et macrophages qui peuvent alors stimuler un état d'inflammation chronique pro-tumoral (Deryugina *et al.*, 2015).

L'ensemble de ces interactions bidirectionnelles entre les cellules stromales et les cellules précancéreuses et cancéreuses implique la sécrétion de nombreux médiateurs biochimiques dans la MEC telles que les MMPs (métalloprotéinases de la matrice) ou les galectines.

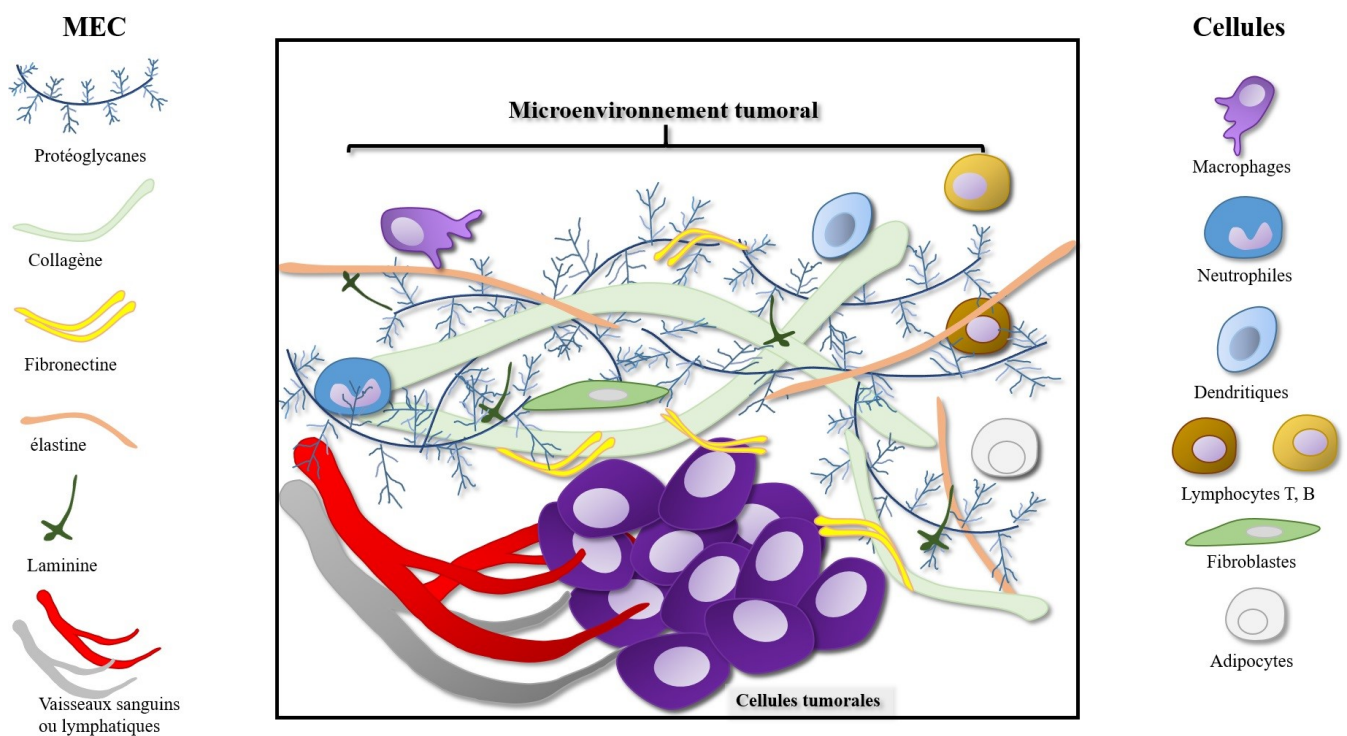


Figure 4: Le microenvironnement tumoral. Schématisation de divers composants du microenvironnement tumoral

1.7.2. Métastases et microenvironnement

La « cascade métastatique » débute par l'invasion de la MEC par les cellules tumorales malignes, qui vont perdre leur inhibition de contact ainsi que leur polarisation cellulaire pour l'acquisition d'une polarité « pathologique tumorale » qui facilite la migration cellulaire et l'invasion tissulaire (Mejean *et al.*, 2008). Comme décrit précédemment, les multiples modifications de la MEC, dont la dissolution de

l'ancrage stable sur la lame basale, vont contribuer à l'échappement des cellules cancéreuses malignes dans la MEC de la tumeur primaire. Ensuite, la chimiotactie permettra l'orientation de la migration des cellules tumorales (Petrie *et al.*, 2009), alors que la dégradation et la réorientation des macromolécules de structure de la MEC vont faciliter leur approche vers les vaisseaux sanguins ou lymphatiques et favoriser le processus d'intravasation. Dans la circulation, les cellules malignes qui survivent vont provoquer de petites embolies par formation d'agrégats avec les cellules sanguines (plaquettes et leucocytes). Suite à l'arrêt de la microcirculation à l'organe cible, les cellules malignes vont pouvoir par extravasation s'infiltrer dans un tissu distal du site primaire et permettre la formation de métastases par expansion clonale locale (**Figure 5**).

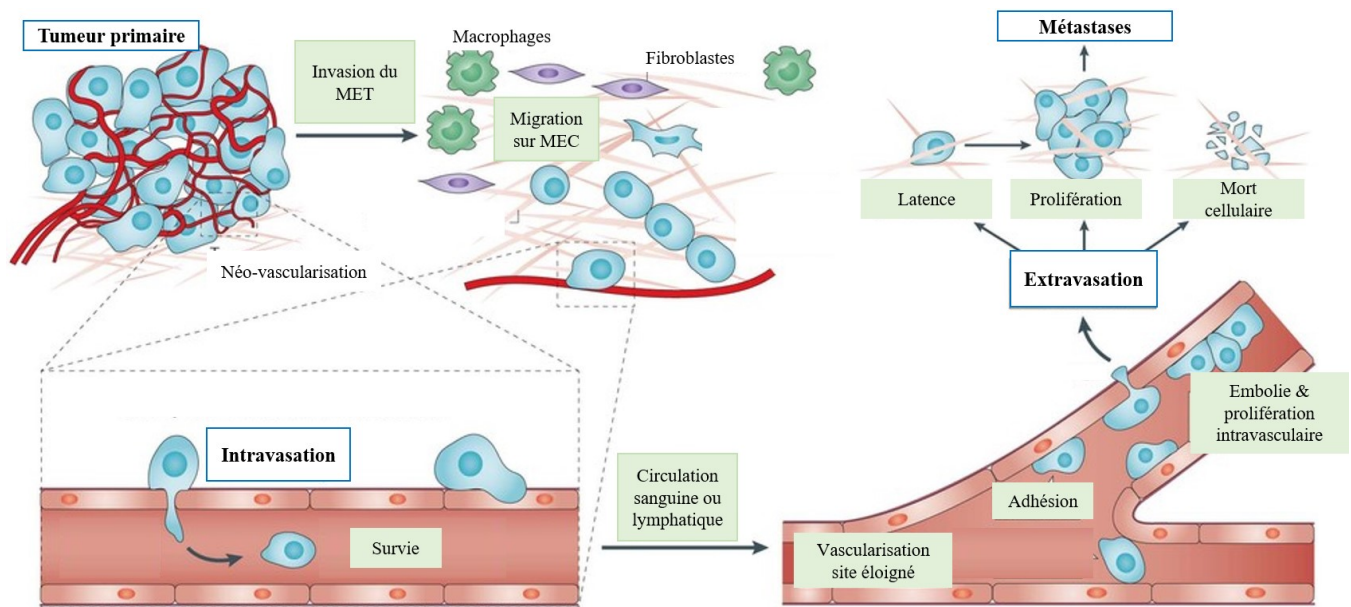


Figure 5: Schématisation de la cascade métastatique. Adaptation de (Reymond et al., 2013)

La localisation des métastases va dépendre de l'identité primaire de la tumeur, par exemple un cancer de la prostate ou du sein génère principalement des métastases osseuses, alors qu'un cancer colorectal se propage généralement au foie (Gupta *et al.*, 2006). Ces observations suggèrent l'existence de « niches pré-métastatiques » constituées d'un microenvironnement permissif à l'implantation de cellules circulantes tumorales disséminées (CTD) (Kaplan *et al.*, 2006). Des études suggèrent également que les cellules tumorales primaires amorcent la formation de ces niches pré-métastatiques par la sécrétion d'une large variété de cytokines, de facteurs de croissances et divers autres médiateurs tumoraux qui stimulent

le recrutement de cellules progénitrices dérivées de la moelle osseuse sur les futurs sites métastatiques (Sceneay *et al.*, 2013). Par exemple, il a été démontré que VEGF et PLGF (*Placenta Growth Factor*) produit par une tumeur permet le recrutement et l'agrégation de cellules progénitrices hématopoïétiques (HPCs) dans les sites prémétastatiques. Une fois sur le site, les HPCs exprimant le récepteur VEGFR1 ainsi que l'intégrine VLA-4 interagissent avec les fibroblastes locaux. L'activation des fibroblastes permet la production de fibronectine ainsi que de la métalloprotéinase matricielle 9 (MMP-9) qui contribue à d'importants remodelages du microenvironnement prémétastatique et facilite l'extravasation des CTD sur le site secondaire tumoral (Kaplan *et al.*, 2005).

2. Les métalloprotéinases de la matrice

En 1962, Jérôme Gross et Charles Lapiere cherchaient à définir les mécanismes responsables de la maturation de la queue de têtard. Leurs recherches révélèrent pour la première fois une activité de dégradation du collagène induite par l'enzyme aujourd'hui nommée collagénase interstitielle, ou métalloprotéinase matricielle-1 (MMP-1) (Gross *et al.*, 1962). Depuis, 23 MMPs ont été identifiées chez l'humain. Elles participent à de nombreux processus de remodelage. Ainsi, l'expression des MMPs varie dans les cellules de l'endomètre durant le cycle menstruel féminin (Goffin *et al.*, 2003), lors de l'embryogénèse (Buckley *et al.*, 2015), ou encore durant les processus d'inflammation et de cicatrisation (Lemaitre *et al.*, 2006).

2.1. Spécificité de substrat

Les MMPs furent initialement reconnues comme des enzymes qui dégradent les principaux composants de la MEC, tels que l'élastine, le collagène, la fibronectine, la lamine et autres (Bonnans *et al.*, 2014). Aujourd'hui, il est clair qu'elles peuvent également dégrader de nombreux substrats non-matriciels, tels que des facteurs de croissance, des récepteurs, des intégrines, des cytokines, des chimiokines et autres protéines et ainsi affecter divers processus cellulaires (Hamano *et al.*, 2003, Page-McCaw *et al.*, 2007, Ruffato *et al.*, 2008).

2.2. Structure et activation des MMPs

Les MMPs sont des protéases dépendantes de l'ion Zinc (Zn^{2+}). Elles ont une homologie de structure comprise entre 30 à 50% (Bode *et al.*, 1993) et sont constituées de plusieurs domaines : le prédomaine N-terminal qui contient le signal de sécrétion ou d'ancrage, le pro-domaine ou propeptide qui joue un rôle central dans le maintien de la forme inactive des protéases via son résidu cystéine, suivi du domaine catalytique qui contient le site de liaison à l'ion Zn^{2+} interagissant avec trois résidus histidines, et finalement une région charnière souple plus ou moins longue qui fait la liaison au domaine hemopexine C-terminal. Ce dernier joue un rôle important dans la spécificité du substrat ainsi que pour l'interaction avec les inhibiteurs naturels de MMPs (Massova *et al.*, 1998). Outre l'atome de Zn^{2+} , le site catalytique possède plusieurs ions métalliques de structure : un atome de zinc non-échangeable ainsi que deux atomes de calcium qui sont nécessaires à la stabilité et à l'activité de l'enzyme (Bode *et al.*, 1994). Bien que les MMPs furent initialement classées en quatre catégories selon leurs substrats de la MEC

(collagénases, gélatinases, stromélysines et matrilysines), aujourd’hui celles-ci sont plutôt répertoriées selon leur structure et leur spécificité de substrats (**figure 6**).

MMPs Basic:

Collagénases interstitielles : MMP-1, -8, -13.
Stromélysines: MMP-3, -10,
Autres : MMP-12, -18, -19, -20, -22, -27

MMPs Minimal (Matrilysines):

MMP-7, -26

MMPs activées par Furines:

Stromélysines: MMP-11,
Autres: MMP-28, -21

MMPs transmembranaires:

MMP-14, -15, -16, -24
GPI: MMP-17, -25

MMPs gélatinases:

MMP-2, -9

MMPs transmembranaires type II:

MMP-23A, -23B

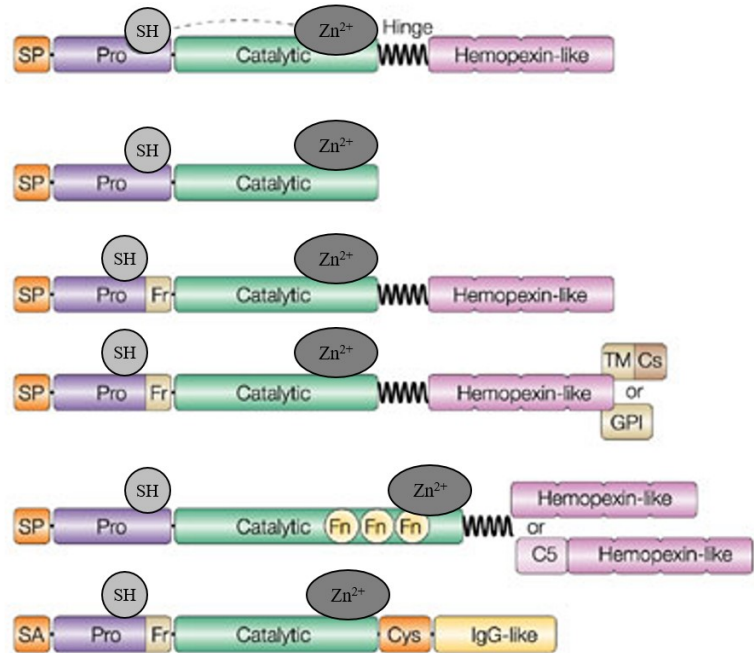


Figure 6: Classification et schématisation de la structure des MMPs. Les MMPs sont constituées d’un pro-domaine N-terminal, d’un domaine catalytique qui est relié par une région charnière flexible au domaine hemopexine C-terminal. Le pro-domaine comprend le motif « switch cystéine » qui interagit avec l’ion Zn²⁺ du domaine catalytique. SP : peptide signal de sécrétion ; Pro : domaine pro-peptidique ; SH : sulfhydryle ; Fr : furine ; Fn : insert de fibronectine de type II ; GPI : glycosylphosphatidylinositol ; TM : domaine transmembranaire ; Cs : cytosolique ; SA : signal d’ancrage ; C5 : domaine collagène V-like ; Cys : region cystéine ; domaine IgG-like. Adaptation de (Parks et al., 2004)

La majorité des MMPs sont sécrétées dans la MEC bien que certaines cellules, comme les neutrophiles/granulocytes peuvent les stocker dans des granules intracellulaires (Wilgus *et al.*, 2013). Les MMP-(14-17 et 24-25), aussi nommées MT(1-6)-MMP, sont transmembranaires et possèdent un ancrage de type GPI (glycosylphosphatidylinositol) ou TM/Cs (Segment transmembranaire de type I ou II, cytosolique) leur permettant de s’insérer dans la membrane cellulaire. De même, les MMP-23A et B aussi appelées « Cystein-Array MMPs » ont un signal d’ancrage (SA) en N-terminal. De plus, à la place du domaine hémopexine, la MMP-23 présente en C-terminal un domaine riche en cystéines suivi d’un domaine de type immunoglobuline. Certaines MMPs, dont les MT-MMPs, possèdent un site de

clivage par la furine dans leur pro-domaine peptidique, permettant leur activation intracellulaire par des protéases furine-like (Ra *et al.*, 2007).

Le contrôle rigoureux de l'expression et de l'activation des MMPs est crucial à l'homéostasie de la MEC et pour de nombreux processus cellulaires tels que le chimiotactisme, la migration cellulaire, l'apoptose ou l'inflammation. Plusieurs mécanismes régulent donc étroitement les MMPs aux niveaux épigénétique, transcriptionnel et post-transcriptionnel.

2.2.1. Régulation épigénétique

Plusieurs études ont mis en lumière les régulations épigénétiques des MMPs via la méthylation des promoteurs ou les modifications des histones. Par exemple, notre laboratoire a démontré que le niveau de méthylation du promoteur de *mmp-9* régule son expression dans des lymphomes (Chicoine *et al.*, 2002). Aussi, dans des cellules du cancer du côlon, la délétion des DNA méthyltransférases Dnmt1 et Dnmt3 par recombinaison homologue induit l'expression de *novo* de MMP-3 mais pas de MMP-1, -2 (Couillard *et al.*, 2006). Qui plus est, l'induction des gènes *mmp-3* et *mmp-10* par hypométhylation semble spécifique au type cellulaire. L'expression des gènes *mmps* est également sujette au remodelage de la chromatine. Entre autres, le recrutement de l'histone désacétylase 2 (HDAC2) ainsi que de l'enzyme de remodelage de la chromatine Mi-2 sur le promoteur de *mmp-9* réprime son expression par une perte d'accessibilité de l'ADN pour la machinerie transcriptionnelle dû à la désacétylation des histones H3/H4 (Yan *et al.*, 2003).

2.2.2. Régulation transcriptionnelle des MMPs

L'induction transcriptionnelle des gènes codant pour les MMPs peut être provoquée par une variété de stimuli exogènes incluant des hormones (Goto *et al.*, 1999), des signaux de stress (Okamoto *et al.*, 2001), ainsi qu'une large variété de mitogènes, d'interleukines et cytokines tels qu'EGF, VEGF, FGF, PDGF, IL-1, TNF- α et TGF- β (Cho *et al.*, 2000, Watari *et al.*, 1999) mais aussi par des oncogènes et des esters de phorbol (Mancini *et al.*, 2006, M. J. Park *et al.*, 2002). Un même signal peut avoir des effets différents selon la MMP ou le type cellulaire. Par exemple, TGF- β peut favoriser l'expression de la MMP-13 (Ravanti *et al.*, 1999) dans des fibroblastes gingivaux alors qu'il inhibe l'expression de la MMP-1 et MMP-3 dans les fibroblastes dermiques (Yuan *et al.*, 2001). Bien que la MMP-9 soit également inhibée lors d'une stimulation par TGF- β dans les cellules leucocytaires MM6 (Ogawa *et al.*, 2004), on observe le phénomène inverse dans les cellules des ovaires de poules lors de la maturation folliculaire (Zhu *et al.*, 2014).

Aujourd'hui, les promoteurs des gènes *mmmps* sont connus pour avoir un large éventail de modulateurs transcriptionnels. De manière générale, ils sont riches en élément AP1 proximal (aux alentours de -70pb) qui interagit avec les facteurs transcriptionnels de la famille Fos et Jun et rend ces gènes très réactifs aux changements. Par exemple, l'activation ERK (stimuli mitogéniques) induit l'expression de *c-fos* tandis que p38 et JNK (stimuli de stress ou cytokines) mènent à l'expression de *c-jun*. La présence d'un ou deux éléments *cis* PEA3 (de la famille ETS) en amont (entre -140pb et -200pb) contribue également à l'activation des promoteurs *mmmps* via sa collaboration avec AP1 (Benbow *et al.*, 1997, Westermarck *et al.*, 1999). Ces deux éléments, AP1 et PEA3, jouent un rôle important dans la régulation du niveau basal des MMPs ainsi qu'en réponse à des stimuli tels que des cytokines et des facteurs de croissance (Angel *et al.*, 1987, Gaire *et al.*, 1994). D'autres facteurs de transcription sont également reconnus pour moduler l'expression des MMPs, dont Nf- κ B, qui stimule l'expression des MMP-1, -2, -3, -9 et -11 (Philip *et al.*, 2004), bien qu'un site consensus de Nf- κ B semble important pour l'effet suppresseur de TGF- β sur l'activité du promoteur de *mmp-9* (Ogawa *et al.*, 2004). TGF- β peut aussi réprimer l'expression de MMP-1 et -3 via la liaison de Smad-3 au *cis*-élément TIE (TGF- β inhibitory élément) (Kerr *et al.*, 1990, White *et al.*, 2000). p53 peut aussi réprimer l'expression de MMP-1 et MMP-13 (Sun *et al.*, 2000, Sun *et al.*, 1999).

Les polymorphismes nucléotidiques des promoteurs *mmmps* peuvent également altérer l'affinité de liaison des facteurs de transcriptions et ainsi modifier le niveau transcriptionnel des gènes. Par exemple, le polymorphisme d'un seul nucléotide à la position -1306 (C>T) de *mmp-2* détruit un site consensus SP1, diminuant ainsi son expression de 50% (Haque *et al.*, 2015). Dans le cas du gène *mmp-9*, deux polymorphismes ont été décrits ; une substitution à la position -1562 (C > T) et une duplication du motif CA-23 (Peters *et al.*, 1999, B. Zhang *et al.*, 1999). Le premier a une moindre affinité pour les protéines histones et aboutit à une augmentation de l'activité transcriptionnelle, alors que le second affiche une activité transcriptionnelle moitié moindre du fait d'une moins bonne affinité du complexe transcriptionnel.

2.2.3. Régulations post-transcriptionnelles

La régulation post-transcriptionnelle des MMPs comprend principalement la stabilité de leurs ARNm suivi de l'activation, l'inhibition et la localisation des protéines. Des études démontrent que la protéine HuR (*human antigen R*) peut lier le transcrite de *MMP-9* et ainsi assurer sa stabilité (Akool el *et al.*, 2003). Plus précisément, la régulation post-transcriptionnelle de *MMP-9* et -13 est en partie due à de

multiples motifs AREs (*adenosine and uridine rich-elements*) situé dans la région 3'UTR (*untranslated region*) de leur ARNm permettant la liaison des protéines HuR (Huwiler *et al.*, 2003) ou KSRP (Rydziel *et al.*, 2004), toutes deux reconnues pour leur implication dans la stabilisation et l'augmentation de demi-vie des ARNm.

Initialement, les MMPs sont synthétisées sous une forme latente inactive (zymogène, pro-MMPs) puis sont sécrétées ou liées à la membrane. Leur forme inactive dépend d'un mécanisme nommé « *cystein switch* » (Van Wart *et al.*, 1990). Celui-ci consiste à l'interaction covalente du groupement cystéine sulfhydryle situé dans le motif fortement conservé PRCGxPD du propeptide avec l'ion Zn^{2+} du site catalytique. Ainsi, la présence du pro-domaine prévient la liaison et l'hydrolyse des substrats (**figure 7**) (Ra *et al.*, 2007).

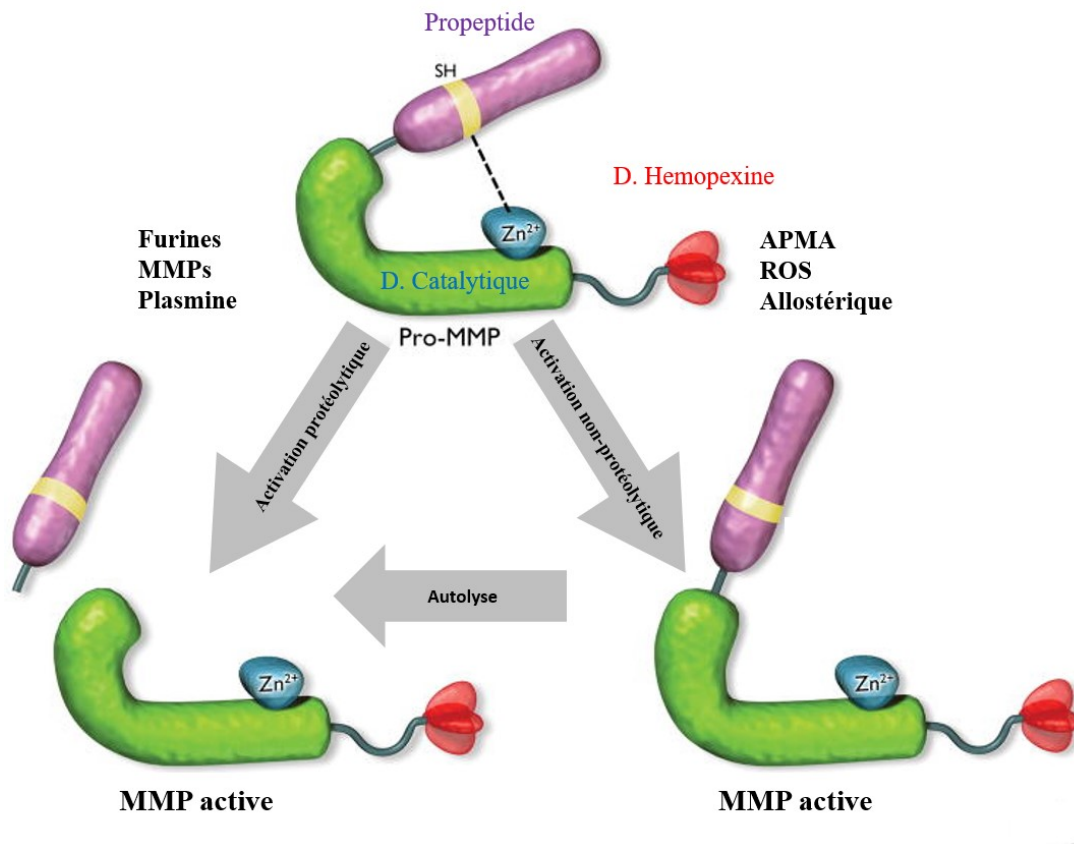


Figure 7: Mécanisme d'activation des pro-MMPs. La forme zymogène des MMPs est maintenue par un lien électrostatique entre le groupement thiol d'un acide aminé cystéine du pro-domaine et l'ion Zn^{2+} du domaine catalytique. L'activation des MMPs dépend du bri de cette interaction par clivage protéolytique du pro-domaine ou par réaction chimique non protéolytique. Dans ce dernier cas, la liaison est rompue et libère l'accès au domaine catalytique, ceci sans clivage du pro-domaine. L'activation finale semble s'effectuer par autolyse du pro-domaine. Adaptation de (X. Zhang *et al.*, 2009)

L'activité protéolytique des MMPs est également étroitement régulée par deux principaux inhibiteurs endogènes, α_2 -macroglobuline et les inhibiteurs métalloprotéinases tissulaires (TIMPs). L'équilibre entre l'expression de ces inhibiteurs et les MMPs est crucial dans le maintien de l'homéostasie de la MEC (Goffin *et al.*, 2003, Nagase *et al.*, 2006). Plus précisément, La glycoprotéine plasmatique α_2 -macroglobuline inhibe la majorité des protéases en formant un complexe reconnu par les récepteurs membranaires LRP (*low density lipoprotein receptor-related protein-1*) qui permettent leur endocytose puis leur dégradation (Zorina *et al.*, 2007). La famille des TIMPs quant à elle comprend quatre membres (1 à 4) et leur expression est très fortement régulée durant le développement et le remodelage des tissus (Brew *et al.*, 2000). TIMP-1, -2 et -4 sont sécrétées alors que la TIMP-3 reste membranaire. La cristallisation de complexe TIMP-MMP a permis d'identifier que c'est via leur domaine N-terminal qu'ils inhibent les MMPs actives (Fernandez-Catalan *et al.*, 1998, Gomis-Ruth *et al.*, 1997). Plus précisément, des résidus du domaine N-Terminal forme un complexe réversible qui chélate l'ion Zn^{2+} du domaine catalytique des MMPs et mimique ainsi un substrat (Visse *et al.*, 2003). Le domaine C-Terminal des TIMPs quant à lui, permet de réguler l'activation de pro-MMPs grâce à son interaction protéine-protéine avec le domaine hémopexine des MMPs. TIMP-2 et TIMP-4 peuvent ainsi lier la pro-MMP-2 et empêcher son activation par la MT1-MMP ou son auto-activation (Bigg *et al.*, 1997, X. Xu *et al.*, 2011). Bien que toutes les TIMPs puissent inhiber les formes actives des MMPs, elles n'ont pas toutes le même degré d'affinité (Murphy, 2011). Par exemple, TIMP-2 a une préférence pour MMP-2 et MT1-MMP (Z. Wang *et al.*, 2000, Zucker *et al.*, 1998) alors que TIMP-1 qui présente une faible affinité face aux MMP-19 et MT-MMPs, inhibe très efficacement les MMP-3 et -7 comparativement à TIMP-2 et TIMP-3 (M. H. Lee *et al.*, 2004).

2.3. Fonctions

Les MMPs jouent un rôle central dans la dégradation de la MEC et sont principalement activées lors d'évènements qui nécessitent un remodelage de celle-ci tels que lors de l'embryogenèse, de la morphogenèse ou de la cicatrisation tissulaire (Rohani *et al.*, 2015). Outre la dégradation de la MEC, les MMPs participent à de nombreux processus cellulaires, tels que la migration, la prolifération ou l'apoptose (Vu *et al.*, 2000). Il n'est donc pas étonnant de constater qu'une quelconque altération dans leur activation peut avoir d'importantes conséquences dans le développement de pathologies (Bonnans *et al.*, 2014), comme des désordres neurologiques (Paemen *et al.*, 1994), des maladies inflammatoires,

vasculaires ou auto-immunes (Hu *et al.*, 2007, Opdenakker *et al.*, 1994), les ulcères gastriques (S. L. Li *et al.*, 2013) ou bien encore lors de cancers (Kessenbrock *et al.*, 2010, Westermarck *et al.*, 1999).

2.3.1. Fonctions physiologiques des MMPs

Une large gamme de MMPs est fortement exprimée lors des processus de reproduction tels que le cycle menstruel, l'ovulation et l'involution utérine, mammaire ou prostatique (Hulboy *et al.*, 1997). L'ensemble de ces événements implique la synthèse et la sécrétion d'hormones (ex : progestérone, prostaglandine), de facteurs de croissance, de cytokines et d'enzymes protéolytiques qui induisent l'activation des MMPs (Curry *et al.*, 2003). Les MMPs jouent également un rôle important durant l'embryogenèse (Pilka *et al.*, 2003). Par exemple, lors de l'implantation, la forte expression de MMP-9 favorise la migration des trophoblastes ainsi que le remodelage de la MEC pour le développement du placenta (Alexander *et al.*, 1996).

La migration cellulaire est un processus qui implique de nombreux changements tels que l'activation des modulateurs du cytosquelette cellulaire, la modulation des sites d'adhésion et des molécules de surfaces, le réarrangement de la MEC ainsi que la présence de chimioattractants nécessaire à l'orientation migratoire. Or, les MMPs ont la capacité de moduler chacun de ces processus. Elles peuvent cliver des intégrines ainsi que des protéines de surfaces impliquées dans les jonctions cellulaires (Bartlett *et al.*, 2013) comme les E-cadhérines des jonctions serrées, menant ainsi à la rupture de l'adhésion cellulaire (Covington *et al.*, 2005). Les MMPs sont aussi étroitement liées à divers processus cellulaires comme la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire. Par exemple, l'utilisation d'inhibiteurs de MMPs réduit considérablement la réponse mitotique de cellules de muscles lisses stimulées par le facteur de croissance PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*) (Uzui *et al.*, 2000) et entraîne l'apoptose des cellules (Cowan *et al.*, 2000). De même, l'altération du signal des intégrines par les MMPs provoque l'apoptose des cellules épithéliales mammaires (Boudreau *et al.*, 1996). Qu'elles soient pro- ou anti-apoptotiques, ces activités mettent en lumière un rôle important des MMPs dans la survie cellulaire. Les MMPs contribuent également à la différenciation cellulaire et à la morphogenèse tissulaire. Entre autres, les MMP-2 et -9 favorisent la différenciation des adipocytes (Bouloumie *et al.*, 2001) et l'inhibition des MMPs qui bloque la migration des kératinocytes sur le collagène de type-1 en plus de perturber la morphogenèse épithéliale (Pilcher *et al.*, 1997). De nombreuses études soulignent aussi leur implication dans l'angiogenèse, de façon pro- ou anti-angiogénique. Effectivement, la dégradation des composants de la MEC par les MMPs entraîne la libération de facteurs de croissances ou angiogéniques séquestrés

au sein de la matrice tel que VEGF (Chang *et al.*, 2001, Somerville *et al.*, 2003). Cependant, l'action des MMPs peut aussi favoriser la production de fragments bioactifs comme l'angiostatine, un inhibiteur de l'angiogenèse (Z. Dong *et al.*, 1997). De même, le clivage de la chaîne $\gamma 2$ de la lamine V par la MMP-2 et MT1-MMP révèle un site inducteur de la migration cellulaire et contribue à la migration des cellules épithéliales (Giannelli *et al.*, 1997, Koshikawa *et al.*, 2000).

Malgré les multiples fonctions attribuables aux MMPs, la majorité des modèles murins déficients en MMPs sont viables et n'affichent pas de défauts phénotypiques majeurs (Folgueras *et al.*, 2004). Cela suggère que malgré leurs fonctions physiologiques d'importances, la redondance fonctionnelle entre les MMPs ou d'autres protéases peut compenser la perte d'une MMP spécifique (Somerville *et al.*, 2003). Une exception : les souris transgéniques déficientes en MMP-14 (MT1-MMP) qui présentent de sévères anomalies phénotypiques avec un retard important de la croissance et des anomalies squelettiques graves qui aboutissent à leur mort prématurée (Holmbeck *et al.*, 1999). D'autres études sur les souris déficientes en MMPs suggèrent aussi un rôle pour certaines dans le développement de maladies. Entre autres, les souris déficientes pour MMP-12 ne développent pas d'emphysème suite à une longue exposition à la fumée de cigarette contrairement aux souris de type sauvages. Qui plus est, leurs macrophages ne parviennent plus à franchir la membrane basale (Hautamaki *et al.*, 1997).

2.4. MMPs et cancer

Des niveaux accrus de plusieurs MMPs sont rapportés chez les patients atteints de cancers et leur forte dérégulation semble intervenir dans chacune des étapes de la tumorigenèse (Gonzalez-Avila *et al.*, 1998). Étonnamment, il semble qu'une bonne proportion des MMPs sécrétées soient produites par les cellules stromales plutôt que par les cellules tumorales (Nabeshima *et al.*, 1991), plus particulièrement par les fibroblastes, les macrophages et les cellules endothéliales (Basset *et al.*, 1997). Une des explications est que les cellules cancéreuses produisent une glycoprotéine de surface l'EMMPRIN qui stimule par contact direct les fibroblastes afin qu'ils produisent des MMPs (Toole, 2003). Toutefois, les cellules cancéreuses elles-mêmes peuvent en produire notamment au cours de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) (Gilles *et al.*, 1997).

Le niveau d'expression des MMPs peut varier selon le stade de développement tumoral, par exemple, l'expression de MMP-2 augmente progressivement avec le grade des mélanomes (Vaisanen *et al.*, 1996). De même, le profil d'expression des MMPs est plus important lors d'un stade avancé que précoce de la maladie. Par exemple, l'expression de la MMP-7 contribue précocement à la tumorigenèse du colon alors que les MMP-2, -3 et -11 sont des événements tardifs qui agissent en concert afin de faciliter

l'invasion tumorale lors des stades avancés de la maladie et lors de la dissémination en métastases (Newell *et al.*, 1994).

Il a été démontré que la surexpression de plusieurs MMPs peut initier la transformation cellulaire (Egeblad *et al.*, 2002). Par exemple, la surexpression de MMP-3 chez les souris est responsable de l'apparition *de novo* de cancers mammaires, plus précisément elle permet d'initier la EMT et d'induire une instabilité génétique dans les cellules épithéliales mammaires (Lochter *et al.*, 1997).

Plusieurs MMPs contribuent aussi à la perte de cohésion et d'inhibition de contact des cellules tumorales par protéolyse des molécules qui interviennent dans les jonctions adhérentes et favorisent ainsi la EMT et la dissémination (Lochter *et al.*, 1997). Les exemples les plus connus sont les MMP-3 et -7 qui peuvent rompre les jonctions d'adhérence par clivage des E-cadhérines et ainsi libérer la β -caténine. La translocation au noyau de cette dernière peut alors costimuler la transcription de nombreux gènes y compris des oncogènes et MMPs (Crawford *et al.*, 1999, Polakis, 1999). De même, dans le cancer gastrique, il a été démontré que les MMP-2 et -9 ont un lien étroit avec l'expression de la Claudine-4, une protéine transmembranaire indispensable à la formation des jonctions serrées (L. Y. Lee *et al.*, 2008).

L'implication des MMPs dans la protéolyse des composants de la MEC est une étape clé dans l'invasion tumorale (Liotta *et al.*, 1980). Plus particulièrement, pour les MMP-2 et -9 qui peuvent perturber la structure de la membrane basale par dégradation de la lamine et du collagène de type IV un constituant essentiel de la lame basale qui est la première barrière contre la migration cellulaire (Hibbs *et al.*, 1987). De même, les MMP-1 et MT1-MMP jouent un rôle particulier dans l'invasion cellulaire du fait qu'elles dégradent le collagène interstitiel de type I, II et III présents dans les tissus conjonctifs qui encerclent les cancers invasifs. Entre autres, la surexpression de MT1-MMP par les cellules du MET va permettre son interaction avec CD44 ce qui va favoriser son homodimérisation et sa localisation au front d'invasion tumoral. Ainsi la protéase membranaire peut dégrader le collagène de type I et activer la pro-MMP-2 dont l'action sur le collagène de type IV facilite l'invasion et la migration cellulaire (Seiki, 2003).

Les fonctions des MMPs dans la protéolyse de molécules bioactives, la libération de facteurs de croissance ou angiogénique, la modulation de l'apoptose et des gradients chimioattractants contribuent à la formation d'un milieu qui favorise la transformation maligne (Egeblad *et al.*, 2002). Par exemple, plusieurs MMPs, dont la MMP-9, favorisent la prolifération cellulaire par la protéolyse des composants de la MEC ou de protéines non-matricielle en permettant ainsi la libération de facteurs de croissance tels qu'IGF II (*Insuline-like Growth Factor*) initialement lié à IGFBP-3 (*insulin-like growth factor*

binding protein 3) (Martin *et al.*, 1999, Svalina *et al.*, 2016), ou bFGF (*basic fibroblast growth factor*) séquestré par le perlican (Whitelock *et al.*, 1996). Les MMPs peuvent aussi avoir un effet antiprolifératif sur les cellules pré-malignes en libérant du TGFβ. Cependant, des mutations sur les récepteurs TGFβR sont fréquemment observées durant la progression tumorale et rendent les cellules cancéreuses insensibles à la stimulation suppressive de tumeur, elles utilisent alors le TGFβ à leur avantage comme un facteur de promotion tumoral qui permet d'initier l'immunoévasion, d'induire la sécrétion autocrine de mitogènes et de favoriser la différenciation vers un phénotype invasif et métastatique (Massague, 2008).

Certaines MMPs peuvent aussi interférer sur l'apoptose des cellules malignes. Entre autres, avec le clivage de FasL qui réduit l'induction d'apoptose lors de traitements chimiothérapeutiques à la doxorubicine des cellules cancéreuses (Mitsiades *et al.*, 2001).

Aussi, il apparait que chaque MMP peut contribuer distinctement à l'angiogenèse tout au long de la tumorigenèse (Bergers *et al.*, 2000, Littlepage *et al.*, 2010). Les expérimentations chez la souris génétiquement déficiente (« *Knock-out* ») ont révélées que la MMP-2 est essentielle à l'initiation angiogénique lors du développement tumoral (Itoh *et al.*, 1998). De plus, la régulation transcriptionnelle des MMPs et du VEGF sont étroitement liés et peuvent être concomitants et mutuels. Par exemple, la production de MMP-9 et VEGF est stimulée par le facteur inductible HIF-1 d'hypoxie (Liao *et al.*, 2007). Aussi, VEGF exprimé par les tumeurs primaires facilite la production de MMP-9 des cellules métastatiques pulmonaires qui expriment le récepteur VEGFR (Hiratsuka *et al.*, 2002). À l'inverse, certaines MMPs telles que la MMP-2 dans les cellules d'adénocarcinomes humaines ou la MMP-14 dans les glioblastomes et carcinomes mammaires stimulent l'induction transcriptionnelle de VEGF (Chetty *et al.*, 2010, Deryugina *et al.*, 2002, Sounni *et al.*, 2002). Les MMPs sont également impliquées dans les processus d'intravasation et extravasation, entre autres grâce à l'importante libération et induction de VEGF dans le MET qui favorise une néovascularisation tumorale structurellement anormale, immature et perméable (Carmeliet *et al.*, 2011, Parsons-Wingerter *et al.*, 2006). L'infiltration et l'évasion des cellules malignes sont facilitées par l'action protéolytique des MMPs sur la membrane basale qui entoure l'endothélium capillaire ainsi que sur les molécules d'adhésions qui fragilisent d'autant plus la perméabilité endothéliale (Deryugina *et al.*, 2006). Les MMPs sont donc tributaires du potentiel métastatique des tumeurs. De plus, les modèles murins déficients en MMPs spécifiques ont démontré une moindre dissémination métastatique (Coussens *et al.*, 2000). La surexpression des MMPs est donc généralement considérée comme un marqueur de la tumorigenèse associé à l'acquisition de

phénotypes invasifs (Konstantinopoulos *et al.*, 2008). C'est pourquoi, dans les années 1980, il y eu un engouement de la recherche pour la production d'inhibiteurs de MMPs dans l'espoir de réduire le potentiel invasif et métastatique des tumeurs. Malheureusement, leur utilisation clinique fut un échec et n'offrit aucun avantage de survie aux patients qui présentaient alors d'importants effets secondaires. Ces derniers pouvant s'expliquer par l'utilisation d'inhibiteurs à large spectre qui ne prenait pas en compte les effets potentiellement positifs de certaines MMPs dépendamment du stade et du type de cancer (Coussens *et al.*, 2002). Aujourd'hui, de nombreuses études ont mis en lumière cette possible dualité fonctionnelle des MMPs dans la progression tumorale, c'est pourquoi il apparait maintenant indispensable d'identifier le dégradome ainsi que les rôles physiologiques selon le type de cancer et les différentes étapes de la tumorigenèse (**Figure 8**).

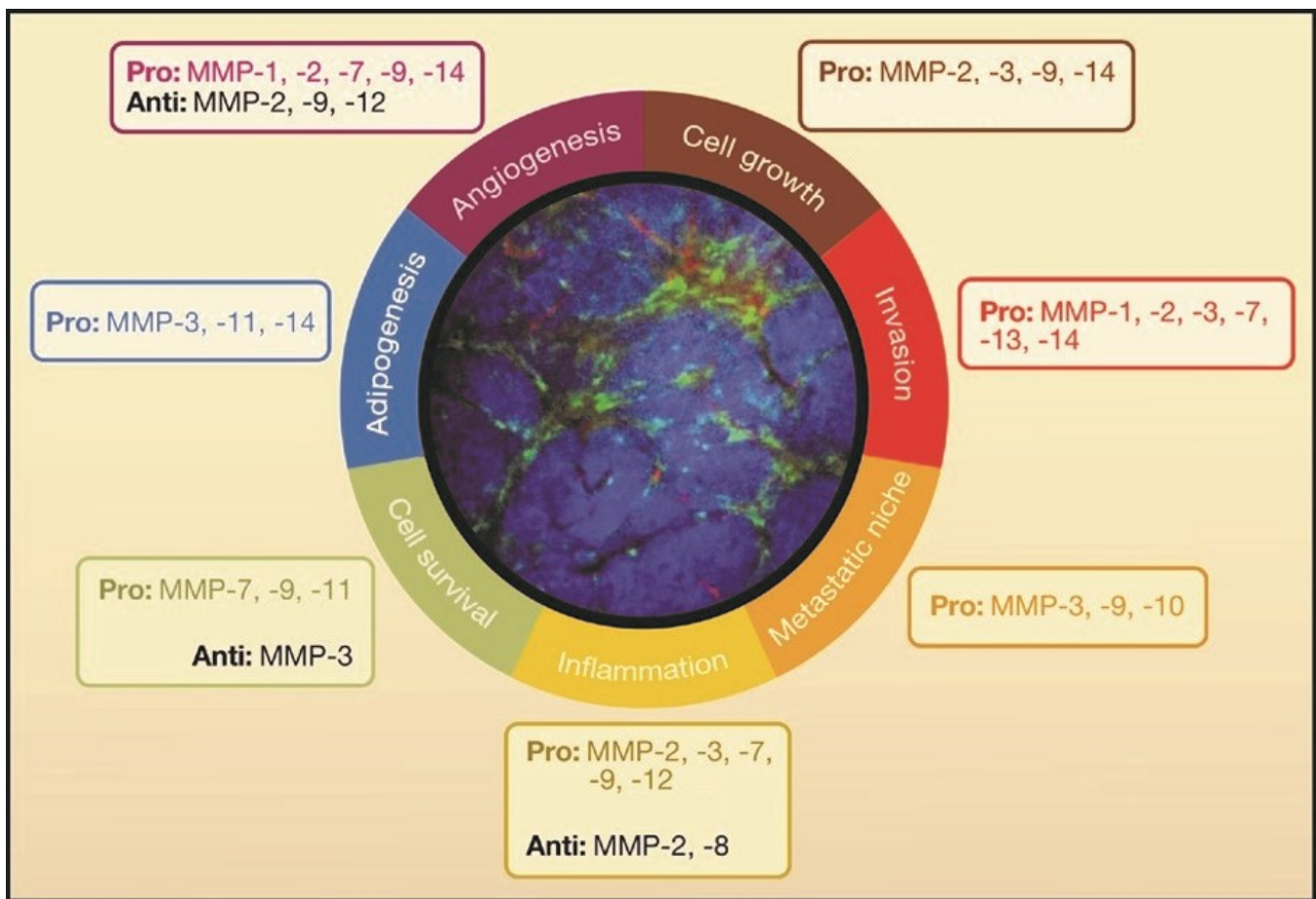


Figure 8: Dualité fonctionnelle des MMPs dans la tumorigenèse. Adaptation de (Kessenbrock *et al.*, 2010)

2.5. MMP-9 et cancer

La MMP-9 (gélatinase B) est une protéase de 92 Kda fortement glycosylée et sécrétée dans la MEC par un très grand nombre de cellules (Hashizume, 2007). Comme toutes les MMPs, elle a la capacité d'hydrolyser de nombreux constituants de la MEC ainsi que non-matriciels. Toutefois, la MMP-9 a rapidement suscité l'intérêt de la recherche du fait qu'elle est impliquée dans la rupture de la membrane basale via la dégradation du collagène de type IV qui est requise à l'invasion tumorale et à la formation de métastases (Hibbs *et al.*, 1987). Qui plus est, la MMP-9 peut intervenir et favoriser chaque étape de la progression tumorale (Farina *et al.*, 2014). Par exemple, lorsque la MMP-9 est localisée dans le noyau cellulaire neuronal, elle peut induire l'initiation, la promotion ainsi que de l'instabilité génétique en augmentant la fragmentation de l'ADN (Y. Yang *et al.*, 2010). Possiblement suite à la dégradation de son substrat PARP (poly-ADP-ribose polymérase) ce qui empêche la réparation du génome (Kwan *et al.*, 2004).

La MMP-9 joue un rôle important dans la néovascularisation et l'angiogenèse des tumeurs et peut avoir une dualité fonctionnelle en étant pro- ou anti-angiogénique (Collen *et al.*, 2003, Ito *et al.*, 2009, Littlepage *et al.*, 2010). Son rôle promoteur de l'angiogenèse est essentiellement dû à la libération, lors du remodelage de la MET, de facteurs pro-angiogéniques tel que VEGF (Deryugina *et al.*, 2015).

La MMP-9 peut également contribuer à la résistance à l'apoptose des cellules cancéreuses. Par exemple, avec la protéolyse de Fas ligand (FasL) membranaire (Musial *et al.*, 2011, Powell *et al.*, 1999). Ainsi, elle permet de libérer du FasL soluble dont l'interaction avec les récepteurs Fas (CD95) peut conduire à la signalisation nulle de la voie extrinsèque apoptotique, mais aussi promouvoir l'angiogenèse ainsi que l'évasion immunitaire (J. J. Chen *et al.*, 1998).

Effectivement, la MMP-9 est un régulateur important de la réponse immunitaire innée et tumorale (Van den Steen *et al.*, 2002) et elle est complice de l'immunoévasion des cellules cancéreuses. Par exemple, il a été démontré que la surexpression de MMP-9 dans les tissus du cancer utérin peut cliver le récepteur de l'interleukine 2 α (IL-2R α) des lymphocytes T cytotoxiques rencontrés et ainsi réduire leur action anti-tumorale (Sheu *et al.*, 2001). Elle permet également la dégradation d'ICAM-1, ce qui favorise la résistance des cellules néoplasiques face aux NK (*natural Killer cell*) (Fiore *et al.*, 2002). De même, la dégradation de la sous-unité β 2 du récepteur CD18 des macrophages réduit leur recrutement (Vaisar *et al.*, 2009) et affecte le « *homing* » des leucocytes (Bauvois, 2014).

Finalement, la MMP-9 est considérée comme une protéine pro-métastatique et un biomarqueur d'agressivité tumorale associé à un mauvais pronostic (Hurst *et al.*, 2007, Parvanescu *et al.*, 2015).

Par exemple, elle apparait comme une molécule importante dans la dissémination, les embolies lymphovasculaires et la nidification en métastases, (Deryugina *et al.*, 2015, Tanioka *et al.*, 2003). Aussi, des tests de dépistage de la MMP-9 dans les urines permettent de différencier des patients atteints de tumeurs malignes ou bénignes dans le cancer de la vessie (Eissa *et al.*, 2007) ou de prédire les chances de survie dans les ostéocarcinomes (H. Li *et al.*, 2014). Toutefois, bien que la MMP-9 soit généralement considérée comme pro-tumorale et -métastatique, certaines études rapportent un effet protecteur tel que dans les cancers oraux où son rôle peut fluctuer au cours du stade néoplasique (Vilen *et al.*, 2013). C'est pourquoi, il est crucial de bien comprendre sa régulation tout au long de la progression tumorale dans chaque type de cancer.

3. Les galectines

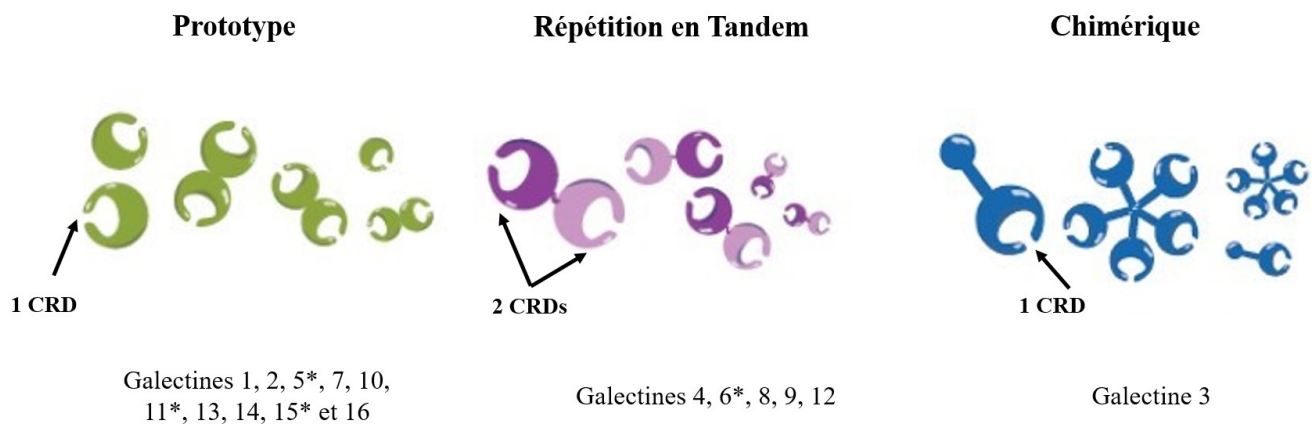
La glycosylation reflète un ensemble de réactions enzymatiques complexes qui permettent des modifications post-transcriptionnelles par ajout de sucres (monosaccharides, oligosaccharides, glycanes) sur pratiquement toutes les protéines ou lipides cellulaires. Ces glycoprotéines ou glycolipides sont principalement membranaires situés du côté extracellulaire ou encore des protéines et peptides sécrétés dans le microenvironnement. Les multiples possibilités d'interactions qu'offrent ces glycoformes ont un impact fondamental sur de nombreux et cruciaux processus biologiques (Moremen *et al.*, 2012) tels que l'adhésion cellulaire (glycocalyx), la régulation de la croissance, l'apoptose, ou encore la reconnaissance du système immunitaire (Marth *et al.*, 2008). Les lectines sont des protéines qui reconnaissent et lient spécifiquement les glucides, parmi celles-ci l'on retrouve la famille des galectines.

Depuis plusieurs décennies, les galectines font l'objet de multiples recherches scientifiques. Elles ont été initialement identifiées selon leur ordre de découverte et sous divers noms comme des lectines de type S (Drickamer *et al.*, 1993). C'est en 1994 qu'elles furent pour la première fois classées et qualifiées de galectines, une famille de lectines qui se caractérise pour leur grande affinité aux β -D-galactosides ainsi que pour leur forte homologie de séquence du site de liaison au sucre nommé domaine de reconnaissance aux carbohydrates (CRD) (Barondes *et al.*, 1994). Par la suite, grâce aux progrès en technique de clonage et d'analyse séquentielle, plusieurs protéines précédemment identifiées chez les vertébrés (Houzelstein *et al.*, 2004) mais aussi chez les invertébrés (Vasta *et al.*, 2015), les nématodes (Hirabayashi *et al.*, 1996) ou encore chez les champignons (D. N. Cooper *et al.*, 1997) ont été regroupées dans la famille des galectines. Aujourd'hui, l'on dénombre 16 différentes galectines chez les mammifères dont 12 chez l'humain (F. T. Liu *et al.*, 2005).

3.1. Structure et classification

Les galectines sont de petites molécules solubles de 14 à 35 kDa constituées d'une seule chaîne polypeptidique qui ne possède pas de séquence-signal pour la voie de sécrétion classique (Nickel, 2003) mais qui présentent une similarité significative de leur CRD. Ce dernier est composé d'environ 130 acides aminés qui forment une pochette constituée de deux feuillets β en sandwich permettant la reconnaissance des β -D-galactosides avec une préférence pour les (N) et (O) glycanes (Leffler *et al.*, 2004). On distingue trois sous-types de galectines qui reposent sur leur propriété structurale et leur nombre de CRD : le type « proto », « chimérique » et finalement « répétition en tandem » (**Figure 9**).

L'organisation « proto » comprend les galectines -1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14, -15 et -16 et possède un seul CRD. La majorité d'entre elles peuvent former des homodimères de manière non-covalente et favorise ainsi leur liaison à deux ligands bien distincts. Il y aurait donc un équilibre monomères-dimères qui serait dépendent de la concentration dans le milieu (Giudicelli *et al.*, 1997). L'organisation « chimérique » est propre à la galectine-3. Celle-ci arbore un seul CDR et possède un long domaine N-terminal non-lectine qui lui permet de former des complexes pentamériques à la manière des immunoglobulines M (IgM). Finalement, l'organisation « répétition en tandem » est constituée des galectines 4, 6, 8, 9 et 12. Elles ont la particularité d'avoir deux CRDs différents qui sont reliés de manière covalente par un petit pont peptidique propre à chaque galectine. De plus, l'épissage alternatif permet la formation de divers isoformes comme dans le cas de la galectine-8 ou -9 (Bidon-Wagner *et al.*, 2004).















*Figure 9: Classification des galectines chez les mammifères. Schématisation de l'organisation structurale des galectines, adaptation de (R. Y. Yang et al., 2008) (*galectines non-humaines)*

3.2. Distribution des galectines

La majorité des cellules expriment un profil diversifié de galectines selon le tissu auquel elles appartiennent ainsi que son stade de développement. Certaines galectines comme la galectine-1 ou -3 sont distribuées dans une grande variété de tissus et de types cellulaires, alors que d'autres, comme la galectine-4 et la galectine-7, semblent plus spécifiques (**Tableau 3**). Bien que l'on commence à avoir une vision d'ensemble de la distribution des galectines les plus étudiées (galectine-1, -3 ou -7), les « galectinomes », c'est à dire les profils d'expression de toutes les galectines, restent à déterminer dans

la majorité des tissus. Aux vues de certaines redondances fonctionnelles ou d'effets antagonistes des galectines, il est donc important de mieux comprendre leur distribution et leurs rôles.

Tableau 3: Distribution physiologique des galectines chez l'humain. Adaptation de (Rapoport et al., 2008, Vladoiu et al., 2014) avec complément d'informations de (Kaur et al., 2016)

Types/ Galectines	Organes/ Tissus/ Cellules
 1	Squelette, muscles, cœur, poumons, foie, ganglions, thymus, colon, neurones, reins, placenta ...
 2	Cellules épithéliales de l'estomac
 3	Macrophages, granulocytes, mastocytes, cellules épithéliales, fibroblastes, reins, neurones ...
 4	Gastro-intestinale, épithélium buccal
 7	Épithélium stratifié de l'œsophage, langue, lèvres, de l'estomac, cornée, corpuscule Hassaall du thymus, cellule myoépithéliale mammaire, kératinocytes ...
 8	Reins, foie, muscle cardiaque, poumons, cerveau
 9	Thymus, reins, poumons, muscles, lymphomes
 10	Éosinophiles
 12	Adipocytes, cœur, pancréas, rate, thymus
 13	Placenta
 14	Éosinophiles, placenta
 16	Placenta

3.3. Ligands

Les galectines sont essentiellement reconnues pour leur capacité à lier des sucres β -galactosides via leur CRD (**Tableau 4**). Bien que très similaires, les CRDs ne sont pas parfaitement identiques et possèdent des affinités pour certains ligands plutôt que d'autres (Hirabayashi *et al.*, 2002). C'est pourquoi les ramifications glucidiques des glycoconjugués affectent les liaisons ainsi que les fonctions des galectines. Outre les variations du CRD, la spécificité de liaison peut dépendre de la nature même de la galectine ainsi que de la présentation des ligands. Par exemple, un homodimère de galectine-1 ainsi qu'un bi-CRDs de galectine-9 peuvent avoir un ligand en commun mais démontrer une interaction différente selon la valence des glycoprotéines et selon la nature de la galectine. Aussi, le pont peptidique de la galectine-9 dont la structure est flexible permet la liaison de glycanes éloignés et d'une orientation plus variable comparativement à un homodimère de galectine-1 dont l'orientation des CRDs est beaucoup plus rigide (Bi *et al.*, 2008). La structure minimale de reconnaissance des galectines est le disaccharide

N-acétyl-lactosamine (LacNac) que l'on retrouve chez les N et O-glycanes et leurs affinités augmentent proportionnellement avec le nombre de résidus LacNac des glycoformes (Patnaik *et al.*, 2006). Toutefois, le niveau d'affinité d'une galectine à une autre peut varier, par exemple la galectine-1 et -3 ont une plus grande affinité de liaison au LacNac que la galectine-7. De plus, les modifications des saccharides terminaux tels que la balance entre α -2,3 ou α -2,6 acide sialique ou encore l'arrangement et la disponibilité des ligands peuvent influencer la spécificité de liaison des galectines (Elola *et al.*, 2015, Hirabayashi *et al.*, 2002, Stowell *et al.*, 2008a). Par exemple, le profil de glycosylation et la disposition membranaire de gp120 du virus VIH favorise l'interaction avec la galectine-1 au détriment de la galectine-3 (C. St-Pierre *et al.*, 2011). De même, des ramifications α -2,6 acide sialique sur CD45 réduisent son interaction avec la galectine-1 (Amano *et al.*, 2003).

Les galectines peuvent être sous une forme monomérique, dimérique ou encore polymérique selon leur type structural et leur concentration dans le milieu (Morris *et al.*, 2004). Par conséquent, les oligomères de galectines ont la capacité de lier un à plusieurs ligands glycosylés, proches ou éloignés en « cis » ou en « trans ». Ainsi, les galectines contribuent à la formation de complexes multivalents formant des lattices ou treillis à la surface des cellules permettant de compartimenter la membrane plasmique en radeaux lipidique et cytosquelettique sous-membranaires (Kusumi *et al.*, 2012) ce qui a pour effet de restreindre la mobilité des glycoprotéines transmembranaires et de stabiliser les récepteurs membranaires (Lajoie *et al.*, 2009, Nabi *et al.*, 2015) (**Figure 10**). Cependant, certaines protéines, telles que les MMPs, peuvent altérer la capacité de multimérisation des galectines. Par exemple, le domaine N-terminal de la galectine-3 est sensible à l'hydrolyse des protéases MMP-9, MMP-2 et MMP-7, ce qui bloque son oligomérisation (Ochieng *et al.*, 1994, Puthenedam *et al.*, 2011). L'effet de la MMP-7 sur la galectine-3 a aussi pour effet de diminuer la cicatrisation des plaies et la migration cellulaire lors de maladie inflammatoire de l'intestin.

Outre leurs interactions avec le CRD, les galectines peuvent interagir avec des ligands via des interactions protéine-protéine (**Tableau 4**). Par exemple, la galectine-1 intracellulaire peut lier la protéine H-Ras et moduler son ancrage à la membrane plasmique (Paz *et al.*, 2001). De même, cette même galectine est connue pour sa liaison CRD-indépendante avec le récepteur pre-BCR antigénique des lymphocytes B (Gauthier *et al.*, 2002). Autres exemples : les galectines-3 et -7 qui peuvent lier de manière CRD-indépendante plusieurs membres de la famille Bcl2 (Villeneuve *et al.*, 2011).

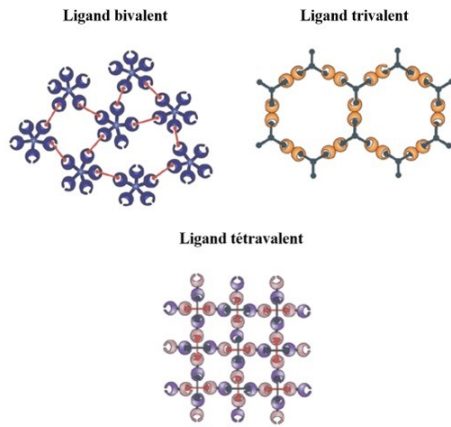
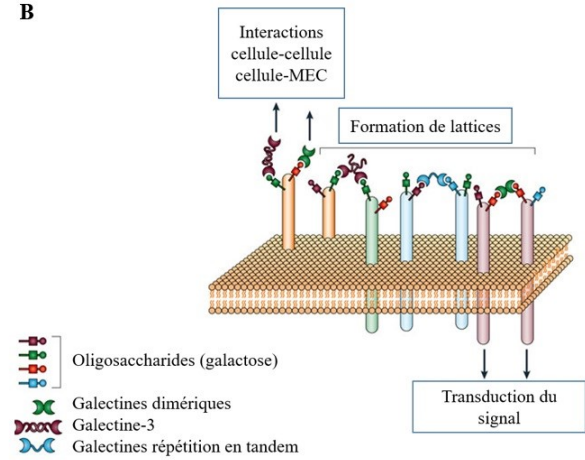
A**B**

Figure 10: Lattices de Galectines. A) Exemple schématique de lattices de la liaison de galectines sur divers ligands multivalents glycosylés. Adaptation de (Rabinovich et al., 2009) B) Formation de lattices via les liaisons de galectines sur des glycoformes transmembranaires. Adaptation de (F. T. Liu et al., 2005)

*Tableau 4: Exemples de ligands des galectines. Principaux partenaires des galectines intracellulaires ou extracellulaires. Adaptation de (Rapoport et al., 2008, Vladoiu et al., 2014) * CRD-indépendant.*

Récepteurs	Galectines
Intracellulaire	
H-Ras	galectine-1*
K-Ras	galectine-3
Bcl-2	galectine-3*, -7*
Cyclins	galectine-3, -12
Smad3	galectine-7
Cytokeratines	galectine-3
Chrp	galectine-3
Monomérique actine	galectine-1
Gemin4, 2	galectine-1*, -3*
Axin/ β -catenin /APC	galectine-3*, -4
Extracellulaire	
Lamine/ fibronectine/ vitronectine	galectine-1, -2, -3, -4, -8
Intégrines	galectine-1, -2, -8
Lymphocytes T, antigènes CD45, CD43, CD7, CD3, CD2	galectine-1, -3
CD95 (APO-1/Fas)	galectine-3*
Pre-BCR	galectine-1*
LAMP-1, -2	galectine-1, -3
GM1	galectine-3, -7
3'-O-Su-Gal-terminated glycosphingolipides	galectine-4, -8
90K/MAK-2BP	galectine-1, -2, -3, -7
Oncoantigènes: CA125, CEA	galectine-1, -3, -4, -8

3.4. Fonctions des galectines

Les galectines sont clairement pléiotropiques et une même galectine peut avoir des fonctions totalement opposées dépendamment du contexte biologique. Elles participent à de multiples processus biologiques clés tels que le développement embryonnaire (Barrientos *et al.*, 2014, Yun *et al.*, 2014), la différenciation cellulaire (Abedin *et al.*, 2003), la régulation de la croissance et du cycle cellulaire (R. Y. Yang *et al.*, 1996, R. Y. Yang *et al.*, 2001), l'adhésion et la migration cellulaire (Gendronneau *et al.*, 2015), la prolifération, l'apoptose (Takano *et al.*, 2016), l'angiogenèse (Blois *et al.*, 2015), la transduction de signaux (Hsu *et al.*, 2004), le pré-épissage d'ARNm (Vyakarnam *et al.*, 1997), la régulation du système immunitaire et inflammatoire (Nieminen *et al.*, 2005), la reconnaissance de pathogènes et contribuent également à l'immunité innée (H. Y. Chen *et al.*, 2014). Par le fait même, elles sont impliquées dans de nombreuses pathologies dont les cancers (Kalan *et al.*, 2015, Moriyama *et al.*, 2014, van der Hoeven *et al.*, 2016).

Leurs fonctions variées vont dépendre en tout premier lieu du type de galectine ainsi que de l'identité cellulaire. Par exemple, l'inhibition de la galectine-3 permet une réduction de la croissance cellulaire de carcinomes thyroïdiens et mammaires (Honjo *et al.*, 2001, Yoshii *et al.*, 2001) alors que c'est via sa surexpression qu'on observe le même phénotype pour des cellules tumorales de la prostate (Ellerhorst *et al.*, 2002). De plus, la concentration des galectines dans le milieu peut faire varier leurs fonctions (Ochieng *et al.*, 1998). En effet, il a été démontré que l'adhérence des neutrophiles sur la lamine augmente en présence de galectine-3 recombinante alors que la forme libre de galectine-3 sur des cellules non-adhérées peut bloquer des intégrines ou saturer des ligands lactosamines empêchant (Kuwabara *et al.*, 1996).

L'oligomérisation des galectines est aussi un facteur crucial de leurs fonctions. Ainsi, seule la forme dimérique de galectine-1, contrairement à sa forme monomérique, induit l'exposition de phosphatidylsérine et favorise la reconnaissance phagocytaire des neutrophiles par les macrophages (Dias-Baruffi *et al.*, 2003). Aussi, l'hydrolyse de galectine-3 par des protéases MMPs interfère avec son oligomérisation et la formation de lattices à la surface cellulaire ce qui modifie son activité biologique (Ochieng *et al.*, 1998).

Finalement, leur localisation joue un rôle primordial et une même galectine peut présenter une dichotomie fonctionnelle dépendamment si elle est extra ou intracellulaire (Compagno *et al.*, 2014).

3.4.1. Fonctions extracellulaires

Les galectines sécrétées dans le stroma peuvent soit se lier aux divers glycoformes des membranes cellulaires, soit interagir avec divers éléments de la MEC ou encore se retrouver dans la circulation sanguine (McCullough *et al.*, 2011). Leur liaison aux glycoformes membranaires est à la base de l'adhésion cellulaire. Par exemple, il a été clairement démontré que la galectine-3 module l'adhésion homotypique de cellules tumorales (Inohara *et al.*, 1995). Elle peut aussi interagir avec la protéine glycosylée N-cadhérine des jonctions d'adhérence et favoriser des échanges entre les micro-domaines membranaires (Boscher *et al.*, 2012). Les nombreuses interactions galectines/ intégrines ont aussi un effet sur l'adhérence cellulaire, tel que le complexe galectine-3/CD98 qui provoque le regroupement des intégrines en micro-domaines et augmente leur avidité (Kuwabara *et al.*, 1996). De plus, la galectine-3 permet aussi la modulation d'expression de certaines intégrines telles que la $\alpha 6\beta 1$ (Warfield *et al.*, 1997), $\alpha 4\beta 7$ (Matarrese *et al.*, 2000), ou réduit la sous unité $\beta 1$ (ou CD29) en provoquant son endocytose (Furtak *et al.*, 2001). De plus, la liaison des galectines aux intégrines peut moduler le cycle cellulaire. Par exemple, la galectine-1 avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ a un effet antiprolifératif et permet l'inhibition de la voie Ras-MEK-ERK ainsi que l'induction de p21 et p27 qui mènent vers un arrêt du cycle cellulaire en stade G1 (Fischer *et al.*, 2005).

Outre les pontages cellule-cellule, les galectines permettent des interactions étroites cellule-matrice du fait que la MEC est une source très riche en constituants glycosylés (Friedrichs *et al.*, 2008, F. van den Brule *et al.*, 2003, Warfield *et al.*, 1997). Ces interactions permettent de moduler la concentration en galectines dans le microenvironnement et induisent différents événements. Par exemple, la forte sécrétion de la galectine-1 par des cellules stromales favorise sa localisation à la surface cellulaire qui, en contact avec des lymphocytes T, provoque la mort par apoptose de ces derniers. En revanche, la faible expression de la galectine-1 dans le microenvironnement permet sa liaison au matrigel et provoque plus efficacement l'apoptose des lymphocytes T sans contact direct avec les cellules stromales (J. He *et al.*, 2004).

Les galectines sont également reconnues pour stimuler la migration cellulaire, telle que l'interaction de la galectine-3 aux intégrines $\alpha 3\beta 1$ qui contribue à la formation de lamellipodes et augmente la motilité des cellules épithéliales de la cornée (Fujii *et al.*, 2015, Saravanan *et al.*, 2009). De même, il est clairement démontré que le glycome des cellules endothéliales joue un rôle essentiel dans le processus d'angiogenèse (Nguyen *et al.*, 1992). En effet, la ségrégation des récepteurs VEGFR2 (*vascular endothelial growth factor receptor 2*) en micro-domaines via la galectine-1 mime la fonction

signalétique d'un ligand VEGF-A et induit la phosphorylation des voies de signalisations (ERK1/2 et Akt) qui modulent la migration des cellules endothéliales (Elola *et al.*, 2015, Hsieh *et al.*, 2008). De plus, Markoska et ses collègues ont démontré que la galectine-3 induit le « *clustering* » des intégrines $\alpha 5\beta 1$ ainsi que l'activation de la kinase d'adhésion focale (FAK) nécessaire à l'induction des facteurs de croissance pro-angiogéniques VEGF et bFGF (Markowska *et al.*, 2010).

Plusieurs galectines sont également impliquées dans la cicatrisation des plaies lors de l'étape de ré-épithélialisation des tissus (Cao *et al.*, 2015). Par exemple, Puthenedam et son équipe ont mis en évidence que l'hydrolyse de la galectine-3 par la MMP-7 a pour conséquence une déficience de la cicatrisation des cellules épithéliales intestinales (Puthenedam *et al.*, 2011). Outre leur rôle dans la migration cellulaire et dans le remodelage des jonctions intercellulaires (Panjwani, 2014), certaines galectines engendrent aussi un remodelage de la MEC, mécanisme tout aussi nécessaire à la cicatrisation. Entre autres, la galectine-3 semble promouvoir un état pro-inflammatoire bénéfique à la cicatrisation (Henderson *et al.*, 2009) et son interaction avec les récepteurs membranaires CD147, une glycoprotéine exprimée durant la cicatrisation, stimule l'induction et l'activation de MMP-9 (Mauris *et al.*, 2014).

Les galectines sont fortement exprimées par les leucocytes et sont très étudiées pour leur implication dans la modulation du système immunitaire innée et adaptatif (**Figure 11**). Leur capacité à réorganiser les glycoprotéines membranaires en treillis moléculaire permet la stabilisation des récepteurs membranaires glycosylés perturbant ainsi leur motilité latérale, leur recyclage ainsi que l'activation sous-jacente de diverses voies de transduction du signal (Boscher *et al.*, 2011, Rabinovich *et al.*, 2007). Par exemple, la stabilisation de CD45 par la galectine-3 réduit le clustering des récepteurs antigéniques des lymphocytes T (TCR) aux synapses immunologiques (I. J. Chen *et al.*, 2007, Demetriou *et al.*, 2001). Les galectines peuvent aussi influencer l'immunité adaptative par de multiples processus clés tels que la signalisation, la production de cytokines, l'activation et la survie des cellules immunitaires (Di Lella *et al.*, 2011). Par exemple, la galectine-1 régule l'homéostasie, la différenciation, la prolifération des cellules T (Rabinovich *et al.*, 2009), la sécrétion de l'interleukine 10 (Stowell *et al.*, 2008b) mais aussi l'apoptose des cellules Th1 (T-helper-1) et Th17 (T-helper-17) (Toscano *et al.*, 2007). Celle-ci est également reconnue pour son implication dans la bonne maturation des lymphocytes B ou elle a été identifiée comme un ligand des pre-BCR (pré-récepteur B) qui favorise le clustering entre les cellules pre-B et les cellules stromales (Gauthier *et al.*, 2002). La galectine-8, quant à elle, participe à la survie et

au développement des thymocytes ainsi qu'à la production des cellules T mémoires (Tribulatti *et al.*, 2007).

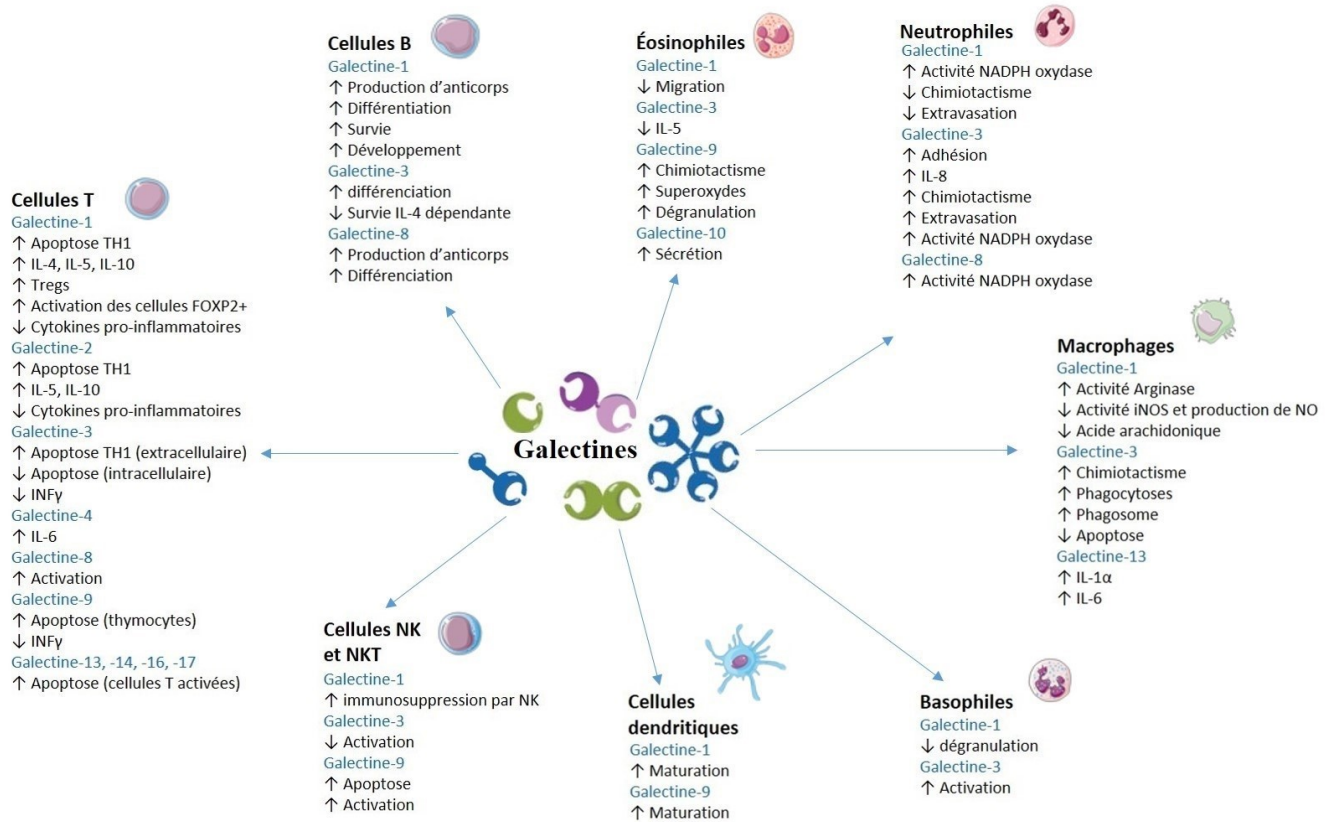


Figure 11: Exemple d'actions des galectines dans le système immunitaire. Adaptation de (Than *et al.*, 2015)

Les galectines jouent parfois le rôle d'alarmines, c'est-à-dire des molécules sécrétées en tant que « signaux d'alarme » par des cellules endommagées ou infectées permettant l'activation du système immunitaire innée (de Haan *et al.*, 2013). Bien que la galectine-3 et 9 se comportent comme des alarmines pro-inflammatoires dans le développement d'une infection létale par *F.novicida* (Mishra *et al.*, 2013a, Steichen *et al.*, 2015), la galectine-1 quant à elle, semble avoir une action anti-inflammatoire bénéfique au remodelage post-infarctus chez la souris (Seropian *et al.*, 2013).

Les galectines ont également divers rôles cruciaux dans la reconnaissance de motifs antigéniques (Vasta, 2009), la chimiotaxie, la migration, la synthèse et la libération de réactifs pro- et anti-inflammatoires, ou encore dans l'élimination des pathogènes et des cellules endommagées (Di Lella *et al.*, 2011). Par

exemple, la galectine-3 exogène abaisse le seuil d'activation des neutrophiles stimulés par le LPS (lipopolysaccharide) en interagissant directement avec ce dernier améliorant ainsi la capacité de liaison des neutrophiles au LPS (Fermino *et al.*, 2011). D'autres études ont démontré que la galectine-1 contrôle l'adhérence des neutrophiles en altérant leur chimiotaxie et en réduisant leur roulement et leur adhérence aux cellules endothéliales (D. Cooper *et al.*, 2008) et joue un rôle dans la libération des superoxydes (Almkvist *et al.*, 2002).

3.4.2. Fonctions intracellulaires

Les fonctions intracellulaires, tout comme les fonctions extracellulaires des galectines, peuvent être très diversifiées et parfois même antagonistes d'une galectine à une autre, ou d'un contexte cellulaire à un autre. Plusieurs compartiments cellulaires peuvent accueillir les galectines, le cytoplasme, le noyau mais aussi les mitochondries, les phagosomes et exosomes (Vladoiu *et al.*, 2014). La distribution des galectines intracellulaires dépendra du type cellulaire, de leur stade de développement et des conditions de culture. Par exemple, l'expression ectopique de galectine-3 dans des cellules « *baby hamster kidney* » (BHK) présente une localisation uniquement cytoplasmique alors que les lignées Cos-7 ou Rb-1 favorisent la localisation nucléaire de la galectine-3 (Gaudin *et al.*, 2000). Les fibroblastes prolifératifs, quant à eux, vont exprimer une galectine-3 nucléaire alors que ces mêmes cellules quiescentes vont l'exprimer uniquement au cytoplasme (Moutsatsos *et al.*, 1987). Non seulement, la compartimentation offre de nouvelles cibles d'interactions aux galectines, généralement CRD-indépendantes, mais cela affecte également leurs fonctions (**Figure 12**). Elles sont, entre autres, impliquées dans la croissance et la progression du cycle cellulaire, l'apoptose, l'épissage alternatif, l'inflammation ou encore dans le tri des protéines membranaires (F. T. Liu *et al.*, 2002) et modulent diverses voies signalétiques (F. T. Liu *et al.*, 2005, Oka *et al.*, 2005).

De manière générale, la galectine-3 est reconnue pour avoir un large répertoire de partenaires tant dans le cytoplasme, le noyau que la mitochondrie. Lorsqu'elle est cytoplasmique, elle peut interagir avec l'ATP synthase à la membrane interne des mitochondries et inhiber la production d'ATP (D. W. Kim *et al.*, 2008). Le rôle de la galectine-3 dans la prolifération cellulaire fut également mis en évidence dans des cellules de cancer du sein où une nette diminution de l'incorporation de thymidine dans l'ADN est observable suite à son inhibition par siRNA (Vandenbrule *et al.*, 1997). De même, des études sur la galectine-7 intracellulaire ont pu démontrer son rôle dans la prolifération et la différenciation des kératinocytes (H. L. Chen *et al.*, 2016).

L'apoptose est l'une des fonctions la plus étudiée chez les galectines pour laquelle la localisation intra ou extracellulaire joue un rôle prépondérant. Par exemple, seule l'expression intracellulaire de la galectine-1 induit l'apoptose des cellules Colo201 contrairement à sa forme extracellulaire (Horiguchi *et al.*, 2003). De même, Fukumori et son équipe ont démontré que la galectine-3 exogène est pro-apoptotique pour les cellules lymphocytaires T. Toutefois, ils ont aussi mis en évidence une diaphonie entre l'activité pro-apoptotique de la galectine-3 sécrétée et la présence de la galectine-3 intracellulaire qui joue un rôle anti-apoptotique (Fukumori *et al.*, 2003). Par ailleurs, la localisation sous-membranaire de celle-ci avec « le récepteur de mort » Fas lui confère également un rôle anti-apoptotique via la voie extrinsèque (Fukumori *et al.*, 2004) et favorise la survie et la prolifération des lymphocytes T (R. Y. Yang *et al.*, 1996). D'autres protéines semblent s'associer à la galectine-3 dans son effet sur l'apoptose telles que Bcl-2 une protéine mitochondriale non-glycosylée, Synexin, Nucling ou Alix/AIP1 (Akahani *et al.*, 1997, L. Liu *et al.*, 2004, Yu *et al.*, 2002). À l'inverse, la galectine-7 endogène chez les kératinocytes est généralement associée à une activité pro-apoptotique en amont de l'activation de JNK et de la libération du cytochrome C (Kuwabara *et al.*, 2002).

L'ancrage de protéines membranaires peut aussi dépendre de galectines intracellulaires. Par exemple, la galectine-1 est essentielle à la localisation de H et K-Ras membranaire (Paz *et al.*, 2001) alors que la galectine-3 a une préférence pour l'oncoprotéine K-Ras. Plus précisément, la relocalisation de l'oncoprotéine Ras-GDP par la galectine-1 est nécessaire pour son activation en Ras-GTP. La grande affinité de cette galectine pour la forme active Ras-GTP permet de stabiliser celle-ci à la membrane interne et augmente et prolonge l'activation de la voie signalétique ERK (Elad-Sfadia *et al.*, 2002). Par comparaison, la galectine-3 stabilise la protéine oncogénique K-Ras en augmentant et prolongeant son activité Ras-GTP via l'activation de PI3K et l'inhibition de ERK (Elad-Sfadia *et al.*, 2004). De multiples autres voies signalétiques peuvent être altérées suite à la présence de galectines intracellulaires. Par exemple, la voie Wnt/ β -caténine est affectée négativement par la présence de la galectine-1 ou 3 endogènes qui séquestrent la β -caténine à la membrane plasmique et inhibe ainsi son action transcriptionnelle (Ose *et al.*, 2012). Par ailleurs, la galectine-3 nucléaire peut interagir avec le complexe β -caténine/TCF qui va alors favoriser la transcription de Tcf-4 et stimuler l'expression de c-Myc et de la cycline D1 engendrant une modulation positivement de la progression cellulaire (Shimura *et al.*, 2004). Les facteurs de transcription tels que TTF-1 (Paron *et al.*, 2003) et Smad (Lim *et al.*, 2014) sont également connus comme des partenaires d'interactions des galectines 3 et 1 respectivement, modulant ainsi leur translocation au noyau et leur fonction transcriptionnelle.

Certaines galectines intracellulaires prennent également part à l'épissage alternatif, telles que les galectines-1 et 3 qui sont reconnues pour former un complexe avec les membres de spliceosome Gemin2 et 4 de manière CRD indépendant. La répression de ces galectines altère le bon épissage des pré-ARNm, cependant elles semblent redondantes dans cette fonction puisque la présence d'une des deux est suffisante pour un retour à la normale (J. W. Park *et al.*, 2001, Vyakarnam *et al.*, 1997). Aussi, des analyses de la structure tridimensionnelle de galectine-3 montrent un réseau linéaire de trois résidus arginine chargés positivement dans le CRD qui, en absence de ligand, semble être un site potentiel à la liaison de l'ARN (Seetharaman *et al.*, 1998). La galectine-3 nucléaire joue également un rôle dans la réparation au dommage de l'ADN à travers son interaction avec BARD1 et BRCA1 (Carvalho *et al.*, 2014). Les galectines intracellulaires peuvent également influencer les processus d'inflammation. Entre autres, les galectines-1 et 9 diminuent le recrutement et l'infiltration des leucocytes sur le site d'inflammation (Iqbal *et al.*, 2011).

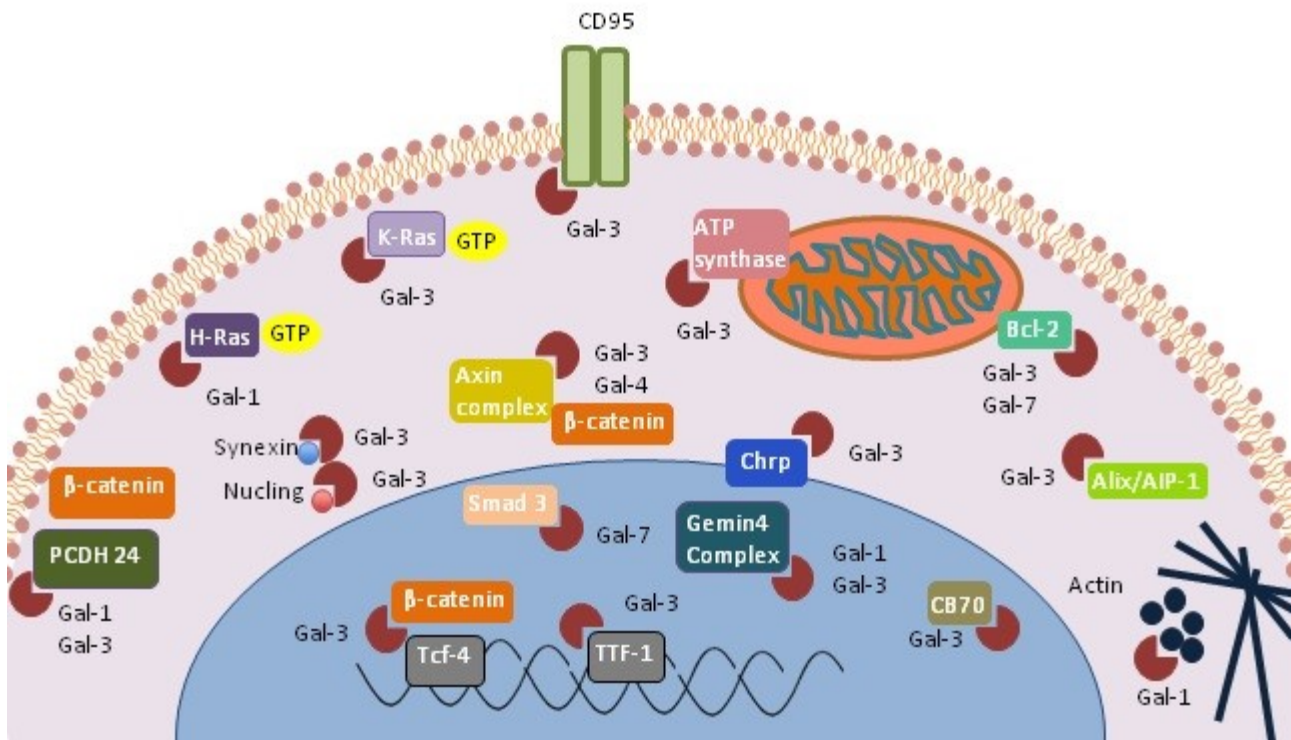


Figure 12: Interactions intracellulaires des galectines. Adaptation de (Vladoiu *et al.*, 2014)

3.5. Galectines et cancers

La transformation radicale du profil de glycosylation des cellules tumorales est considérée comme une caractéristique déterminante de la tumorigenèse. Les principales modifications comprennent d'importants changements de O et N-glycanes et de leurs ramifications tout au long de la tumorigenèse. C'est pourquoi, le glycome des cellules cancéreuses ainsi que celui du microenvironnement tumoral servent souvent de biomarqueurs pour le stade ou le potentiel métastatique d'un cancer (Stowell *et al.*, 2015). Outre le fait que le glycome tumoral confère une activité de liaison spécifique, le profil d'expression des galectines peut différer distinctement de celui d'un tissu sain. Par exemple, une expression forte de la galectine-3 nucléaire est observable dans des tissus sains de la muqueuse colorectale, alors qu'elle est régulée à la baisse lors des premiers stades de la progression néoplasique colorectale (Sanjuan *et al.*, 1997). Par conséquent, les altérations du glycome affectent les interactions des galectines sur la localisation ou la stabilisation des récepteurs membranaires. C'est donc sans grande surprise que les galectines sont reconnues comme des joueurs clés du développement néoplasique en étant pro ou anti-tumorale (**Figure 13**) et ceci dépendamment du type de cancer, du type de galectine et de sa localisation. Par exemple, dans les carcinomes de la prostate, la galectine-3 nucléaire a un effet anti-tumoral, alors que la cytoplasmique favorise le développement néoplasique (F. A. van den Brule *et al.*, 2000). L'expression à la hausse d'oncogènes associés à l'inhibition de gènes suppresseurs de tumeurs est à l'origine de la transformation cellulaire et de la tumorigenèse. Or, certaines galectines contribuent, voire même sont nécessaires, à la transformation des cellules normales. Entre autres, l'inhibition de la galectine-1 conduit à la perte du phénotype cancéreux de gliomes du système nerveux central (Yamaoka *et al.*, 2000). De même, l'inhibition de la galectine-3 dans les cellules de cancers du sein ou de la thyroïde favorise la perte du phénotype acquis cancéreux (Honjo *et al.*, 2001, Yoshii *et al.*, 2001). À l'inverse, des transfectants stables de la galectine-3 dans des cellules folliculaires de la thyroïde normale ont acquis certaines marques d'un phénotype cancéreux comprenant l'indépendance aux facteurs de croissances, une clonogénicité importante ainsi que la perte d'inhibition de contact (Takenaka *et al.*, 2003). Plus récemment, une étude a mis en lumière la capacité de la galectine-1 à promouvoir la transformation de fibroblastes normaux en CAF dans le cancer gastrique (Zheng *et al.*, 2016). Aux vues de la pléiotropie fonctionnelle des galectines, il n'est pas étonnant de constater que celles-ci puissent jouer d'importants rôles pro- ou anti-tumoraux tout au long de la tumorigenèse. Outre le potentiel transformant de la galectine-3 sur les cellules de carcinome du sein et de la thyroïde, Raz et

son équipe ont également mis en évidence qu'elle agit comme un régulateur positif de la prolifération (Honjo *et al.*, 2001, Yoshii *et al.*, 2001).

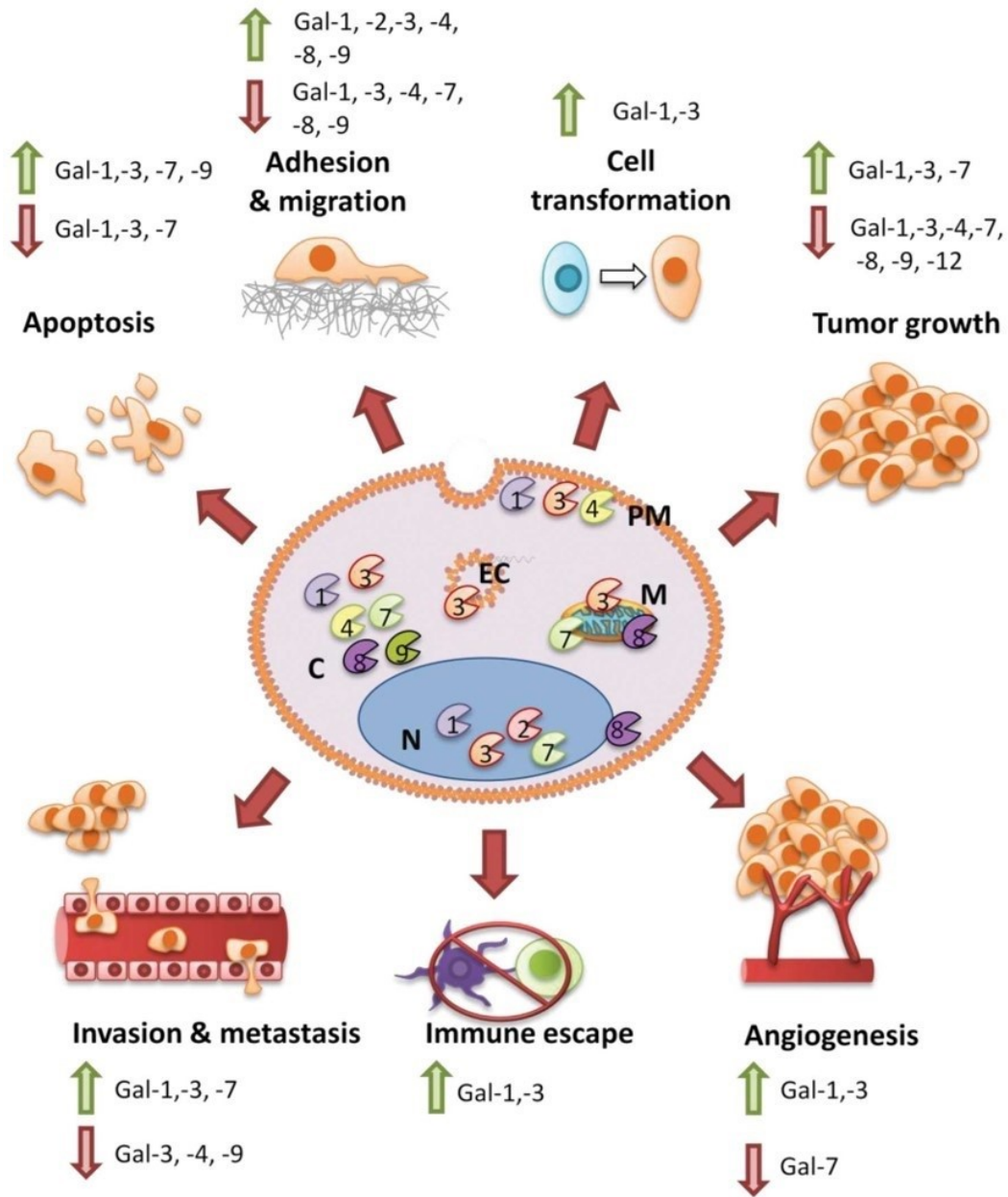


Figure 13: Fonctions pro- et anti-tumorales des galectines cytoplasmiques, mitochondriales ou nucléaires. Adaptation de (Vladoiu *et al.*, 2014)

Aussi, les transfectants stables de la galectine-3 dans des cellules normales de la thyroïde ont révélé l'expression d'une série de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire comprenant les antigènes nucléaires de prolifération cellulaire (PCNA), le facteur de réplication C ainsi que les gènes qui participent à la transition G1-S (Takenaka *et al.*, 2003). Plusieurs études suggèrent que c'est via son interaction avec des facteurs de transcriptions tels que TTF-1 (Paron *et al.*, 2003) ou avec certains modulateurs du cycle cellulaire que la galectine-3 peut contrôler la prolifération cellulaire. Par exemple, la survie des cellules BT549 du cancer du sein suite à une perte d'adhésion dépend de l'expression de la galectine-3 nucléaire. Celle-ci induit l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 en régulant à la baisse les cyclines A et E tout en augmentant leurs inhibiteurs naturels p21 et p27 (H. R. Kim *et al.*, 1999). De manière similaire, la liaison de la galectine-1 extracellulaire et non pas nucléaire, à l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ a un effet anti-prolifératif qui stimule l'expression de p21 et p27 et stoppe la croissance cellulaire en phase G1 de diverses lignées de carcinomes épithéliaux (Fischer *et al.*, 2005). À l'inverse, la galectine-3 nucléaire stabilise le complexe transcriptionnel au site du facteur de transcription CREB et augmente l'activation du promoteur de la cycline D1, ce qui a un effet positif sur la prolifération tumorale (Lin *et al.*, 2002).

Les interactions des galectines sur des récepteurs membranaires activés tels qu'EGFR, FGFR, PDGFR, ou IGFR peuvent non seulement réguler leur distribution membranaire en lattices, mais stabilise et prolonge la signalisation intracellulaire induite en séquestrant les récepteurs à la membrane et en bloquant leur recyclage via l'endocytose. Ainsi, les galectines contribuent à la prolifération des cellules tumorales (Lau *et al.*, 2007, H. J. Park *et al.*, 2006). Cependant, une étude a démontré la possibilité du phénomène inverse avec la galectine-3 qui favorise la prolifération via l'endocytose de la glycoprotéine membranaire MUC1 et EGFR dans les adénocarcinomes pancréatique (Merlin *et al.*, 2011).

Suite à l'acquisition du phénotype cancéreux, la survie de la tumeur est étroitement liée à sa capacité de résistance aux signaux pro-apoptotiques induits par les cellules du système immunitaire ou lors des traitements de chimio ou de radiothérapie. Or, l'implication des galectines dans les processus d'apoptose est largement documentée et bien que l'ajout de galectines recombinantes extracellulaires puisse induire l'apoptose de diverses cellules cancéreuses (F. T. Liu *et al.*, 2005), de nombreuses études soulignent aussi leur action pro-tumorale qui favorise la survie des cellules néoplasiques par inhibition de la mort cellulaire programmée. L'exemple le plus souvent cité est celui de la galectine-3 qui présente un motif NWGR C-terminal responsable entre autres, des interactions avec les protéines Bcl-2 (R. Y. Yang *et al.*,

1996) et Bax (Harazono *et al.*, 2014). Lors de stimuli apoptotiques chimiothérapeutiques (cisplatine), une simple altération du motif par substitution d'une glycine par une alanine parvient à contrer la résistance apoptotique induite par la galectine-3 dans les cellules du cancer du sein BT-549 de manière Bcl-2 indépendante (Akahani *et al.*, 1997). Par contre, sa localisation à la mitochondrie avec Bcl-2 prévient la libération du cytochrome C et participe à la survie des cellules tumorales. De même, l'interaction de la galectine-3 avec Bax, une protéine pro-apoptotique, perturbe l'homodimérisation de cette dernière contrecarrant ainsi la mort cellulaire. L'équipe de Raz a également démontré que la fonction anti-apoptotique de la galectine-3 dépend de sa phosphorylation sur le résidu sérine 6 (Yoshii *et al.*, 2002) ainsi que de la translocation du noyau vers le cytoplasme (Takenaka *et al.*, 2004).

Les galectines sont impliquées dans l'angiogenèse tumorale (Griffioen *et al.*, 2014). Leur expression est souvent augmentée par les cellules endothéliales du MET, telle que pour la galectine-1 dans les cellules endothéliales de cancers du poumon ou de la prostate (Clausse *et al.*, 1999, Lotan *et al.*, 1994). D'après Markowska et ses collaborateurs, les galectines agissent aussi en prolongeant la signalisation des médiateurs de l'angiogenèse avec leurs corécepteurs (Markowska *et al.*, 2011). Il a également été démontré que la galectine-1 peut agir elle-même comme un facteur de croissance pro-angiogénique même en absence de ligand VEGF (Crocchi *et al.*, 2014). Une autre étude démontre aussi que le clivage de la galectine-3 par les MMP-2 et -9 induit l'angiogenèse des cancers du sein et de la prostate (Nangia-Makker *et al.*, 2010).

Les galectines peuvent également favoriser l'immuno-évasion des cellules cancéreuses. Une combinaison d'expériences *in vitro* et *in vivo* ont permis d'établir une corrélation entre l'expression de la galectine-1 et l'échappement tumoral à la surveillance des lymphocytes T (Rubinstein *et al.*, 2004). La galectine-1 apparaît comme un régulateur négatif de l'activation et de la survie des lymphocytes T effecteurs. L'inhibition de son effet immuno-évasif dans les tissus tumoraux mène à la réduction de la masse tumorale et à la stimulation d'une réponse spécifique des lymphocytes T (Rabinovich, 2005).

Finalement, les galectines sont reconnues pour contribuer au potentiel métastatique, entre autres, en régulant l'expression des intégrines des cellules tumorales (Matarrese *et al.*, 2000). La perturbation des interactions cellules-cellules ou cellules-matrices conduit alors à la perte d'adhésion qui favorise la migration des cellules tumorales (Hughes, 2001, F. T. Liu *et al.*, 2005). De plus, elles augmentent la capacité des cellules malignes à l'intravasation et à la formation d'embolies vasculaires en liant les sucres exprimés en surface des cellules tumorales (Raz *et al.*, 1987). Récemment, une étude a démontré que les métastases osseuses des cancers du sein expriment et libèrent de la galectine-3. Sous sa forme

multimérique elle inhibe la différenciation des pré-ostéoblastes tout en favorisant la maturation des ostéoclastes via sa liaison avec la myosin-2A et permet ainsi d'induire efficacement une signalisation pro-métastatique qui mène à un important remodelage ostéolytique (Nakajima *et al.*, 2016). Cependant, les auteurs ont également révélé que la galectine-3 agit à l'inverse dans le microenvironnement métastatique du cancer de la prostate via sa forme clivée qui contribue à l'activation des pré-ostéoblastes et bloque la maturation des pré-ostéoclastes permettant ainsi une augmentation de l'activité ostéoclastique.

3.6. La galectine-7

3.6.1. Structure

La galectine-7 fut découverte en 1995 par l'équipe de Madsen qui recherchait un marqueur protéique de différenciation entre les kératinocytes normaux de l'épiderme et les cellules cancéreuses de la peau (Madsen *et al.*, 1995). Aujourd'hui, l'on sait que la galectine-7 est principalement exprimée dans les épithéliums stratifiés de la peau mais aussi dans tous les différents épithéliums tissulaires tels que celui de l'œsophage, des muqueuses buccales et de la langue, du pharynx et hypopharynx, des glandes salivaires, sébacées ou mammaires, du thymus, de la cornée, du système urinaire et reproducteur (ovaire, utérus) ou de l'estomac (Magnaldo *et al.*, 1998, Saussez *et al.*, 2006, Y. St-Pierre *et al.*, 2012). De type « proto », la galectine-7 possède un seul CRD qui forme préférentiellement des homodimères (Kopitz *et al.*, 2003). La cristallisation de la galectine-7 sous sa forme libre et liée à un carbohydrate a permis d'identifier 7 acides aminés de son CRD responsables de sa liaison aux sucres (H49, N51, R53, N62, W69, E72 et R74). Cette étude a permis aussi d'établir une similarité de repliement avec les galectines -1 et -2 qui présentent toutefois un arrangement différent lors de leur dimérisation ce qui expliquerait en partie, la spécificité de substrat de chacune des galectines (Leonidas *et al.*, 1998).

3.6.2. Régulation

Initialement, la galectine-7 fut reconnue pour être l'un des gènes induit par le facteur de transcription pro-apoptotique p53 dans le cancer du côlon (Polyak *et al.*, 1997). Plus récemment, notre laboratoire a également démontré dans le cancer du sein que des mutants p53 peuvent toujours induire son expression en étant dépendant de l'activité de Nf- κ B. C'est pourquoi la forte expression de galectine-7 dans les cancers agressifs du sein favoriserait la résistance apoptotique des cellules malignes (Campion *et al.*, 2013). Par la suite, la lumière fut mise sur l'induction transcriptionnelle du gène *Igals7* par le facteur de

transcription C/EBP β (Campion *et al.*, 2014). En effet, l'inhibition de la voie de signalisation de Nf- κ B ou une mutation dans le site consensus de C/EBP β du promoteur *Igals7* réduit son expression transcriptionnelle et protéique. À l'inverse, la surexpression ectopique de C/EBP β permet une augmentation transcriptionnelle et protéique de la galectine-7. La régulation transcriptionnelle du gène *Igals7* est également modulée par la méthylation de l'ADN (Demers *et al.*, 2009, S. J. Kim *et al.*, 2013b).

3.6.3. Galectine-7 et cancer

La première fonction identifiée pour la galectine-7 fut son rôle dans la cicatrisation et la ré-épithélialisation (Cao *et al.*, 2002, Cao *et al.*, 2003). Par la suite, de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* avec des souris KO ont permis d'associer la galectine-7 au processus d'apoptose, de migration et de prolifération des kératinocytes (Bernerd *et al.*, 1999, Gendronneau *et al.*, 2015). Durant la dernière décennie, de plus en plus d'études ont cherché à comprendre plus précisément le rôle de la galectine-7 dans différents types de cancers. Il apparaît clairement que son profil d'expression peut varier entre un tissu sein et tumoral. Par exemple, même si les cellules basales de la prostate expriment fortement la galectine-7 en temps normal, celle-ci est totalement absente lors de carcinomes prostatiques. À l'inverse, les tissus ovariens normaux n'expriment aucunement la galectine-7, mais son expression est détectable dans les cellules épithéliales du cancer des ovaires et plus fréquemment dans des cancers de hauts grades et dans les métastases (Labrie *et al.*, 2014).

Aujourd'hui, il est clair que la galectine-7 contribue sur de multiples fronts à la progression tumorale, entre autres via la prolifération, l'angiogenèse, l'apoptose, la migration cellulaire et le potentiel métastatique. Toutefois, comme beaucoup de galectines, son rôle reste ambigu puisqu'elle peut également avoir une fonction protectrice face au cancer dépendamment du type de tumeur mais aussi de sa localisation intra ou extracellulaire.

Initialement, Volgenstein et ses collaborateurs ont identifié la galectine-7 comme une protéine pro-apoptotique qui contribue à l'élimination des cellules tumorales (Polyak *et al.*, 1997). Plus précisément, ils démontrèrent que la surexpression de p53 permet d'induire précocement la galectine-7 dans les cellules du cancer du côlon DLD-1. Par la suite, une étude faite sur les kératinocytes de la peau confirma ces résultats en démontrant que l'induction de l'apoptose par des UV conduit à une surexpression de la galectine-7 qui corrèle avec la stabilisation d'expression de p53. De plus, l'inhibition de p53 ou la présence de mutants permet de contrer cet effet pro-apoptotique (Bernerd *et al.*, 1999). Quelques années

plus tard, l'équipe de Kuwabara suggère que la galectine-7 agit sur l'apoptose par des interactions intracellulaires avec des médiateurs pro-apoptotiques tel que Bcl-2 (Kuwabara *et al.*, 2002, Villeneuve *et al.*, 2011).

La galectine-7 est aussi reconnue pour contrer la croissance tumorale. En effet, des xénogreffes de cellules DLD-1 surexprimant la galectine-7 chez des souris immunodéficientes se caractérisent par une croissance tumorale ralentie (Ueda *et al.*, 2004) ainsi qu'une plus faible densité vasculaire qui suggère également une fonction anti-angiogénique de la galectine-7 ectopique (Ueda *et al.*, 2004). De même, des études sur les cancers gastriques concluent à un effet anti-tumoral de la galectine-7 dont la forte expression est associée à une baisse de la prolifération, migration et invasion des cellules tumorales ainsi qu'à un meilleur taux de survie des patients (S. J. Kim *et al.*, 2013b). Une récente étude dans notre laboratoire souligne l'effet anti-tumoral de la galectine-7 dans les carcinomes prostatiques en favorisant l'apoptose et en inhibant la migration et l'invasion des cellules tumorales (Labrie *et al.*, 2015).

Malgré ses fonctions anti-tumorales, la majorité des études caractérisent plutôt la galectine-7 comme un acteur pro-tumoral dépendamment du type et du stade de la tumeur (Kaur *et al.*, 2016). Par exemple, des analyses immunohistochimiques de la galectine-7 dans des tumeurs de la thyroïde suggèrent une double fonction. Tout d'abord, sa faible expression dans les adénomes bénins favorise la survie des cellules tumorales face à sa fonction pro-apoptotique. Dans un second temps, c'est sa surexpression progressive dans les carcinomes malins qui contribuent à la progression tumorale (Rorive *et al.*, 2002). De manière similaire, l'expression de la galectine-7 varie selon le niveau de différenciation des cancers de la vessie. Sa forte expression est associée aux carcinomes à cellules squameuses hautement différenciées, alors qu'une expression plus modérée est significative de carcinomes urothéliaux (Ostergaard *et al.*, 1997). Également, l'initiation de la tumorigenèse chez les patients atteint de carcinomes squameux de la tête et du cou dépend de la surexpression de la galectine-7 dans le noyau des cellules tumorales alors que son expression est plutôt cytoplasmique lors de stades plus avancés (Saussez *et al.*, 2008). Une étude récente de notre laboratoire a pu identifier des effets anti-apoptotiques de la galectine-7 dans le cancer du sein. En effet, l'utilisation d'un mutant du CRD (R74S) démontre que cette fonction est indépendante du CRD et de la localisation nucléaire ou mitochondriale mais possiblement induite via la dégradation de p53 par le protéasome (Grosset *et al.*, 2014).

La galectine-7 est également considérée comme une molécule pro-métastatique dans certains lymphomes et carcinomes mammaires. Suite à l'identification de sa modulation à la hausse dans des lymphomes murins hautement agressifs (164T2S11 et S19) (Moisan *et al.*, 2003), des expériences *in*

vivo ont permis de constater que sa surexpression ectopique dans des lymphomes non-agressifs est suffisante à l'acquisition d'un phénotype agressif ainsi qu'à la dissémination métastatique dans les ganglions périphériques, les reins et le foie (Demers *et al.*, 2005). Les auteurs démontrèrent également que l'expression ectopique de la galectine-7 correspond à une augmentation de la MMP-9 CRD dépendante et que l'inhibition de la galectine-7 dans les lymphomes agressifs correspond à une réduction de l'infiltration des cellules tumorales et de la MMP-9 (Demers *et al.*, 2007). De plus, la surexpression de la galectine-7 dans des cellules de carcinomes murins injectées dans les glandes mammaires de souris BALB/c favorise la formation de métastases osseuses et pulmonaires (Demers *et al.*, 2010).

HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DU PROJET DE THÈSE

Mise en contexte :

De nombreuses études démontrent les rôles cruciaux des gènes pro-métastatiques *mmp-9* et *lgals-7* (Farina *et al.*, 2014, Kaur *et al.*, 2016). Bien qu'un grand nombre d'études contribue à la compréhension des mécanismes moléculaires responsables de la surexpression de MMP-9, de plus amples recherches sont encore nécessaires à l'identification des acteurs inhibiteurs de son expression. Notre laboratoire a précédemment pu démontrer que l'expression anormalement élevée du facteur de croissance EGF par les cellules de lymphome T induit chez les cellules stromales une augmentation du facteur de transcription à réponse précoce/immédiate EGR-1, lui-même responsable de l'inhibition de l'expression de *mmp-9*. Toutefois, les intermédiaires moléculaires impliqués restent à déterminer. Parallèlement, une étude récente a mis en évidence la capacité de la cytokine BMP-4 (*Bone morphogenetic protein 4*) à inhiber la MMP-9 dans un contexte de maladies rétinienne (J. Xu *et al.*, 2012). Parallèlement, des études ont révélé un lien étroit entre l'expression de la galectine-7 et d'induction de la MMP-9 (Demers *et al.*, 2005, Labrie *et al.*, 2014, J. E. Park *et al.*, 2009). Toutefois, les mécanismes responsables de la surexpression cytosolique de la galectine-7 dans certains cancers restent encore à éclaircir afin d'anticiper ses actions potentiellement pro- ou anti-tumorales.

But de l'étude :

Étudier les mécanismes moléculaires qui contrôlent l'expression de MMP-9 et galectine-7 dans les cellules cancéreuses.

Hypothèses :

- L'inhibition de l'expression MMP-9 via EGF\EGR-1 (Bouchard *et al.*, 2010) pourrait impliquer la protéine de morphogenèse osseuse 4 (BMP-4)
- La possible endocytose de la galectine-7 contribue à son expression constitutive dans différents cancers.

Objectifs :

- Déterminer l'implication de la BMP-4 dans l'inhibition de MMP-9 via EGF/EGR1

- Identifier les mécanismes de régulation d'expression intracellulaire de la galectine-7
 - Déterminer si la galectine-7 extracellulaire peut moduler sa propre expression transcriptionnelle et protéique.
 - Déterminer si le pool intracellulaire de la galectne-7 peut provenir de l'endocytose de la galectine-7 extracellulaire.

CHAPITRE 2:

Bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) and epidermal growth factor (EGF) inhibit metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in cancer cells.

La protéine de morphogenèse osseuse 4 (BMP-4) et le facteur de croissance épidermique (EGF) inhibent l'expression de la métalloprotéinase-9 (MMP-9) dans les cellules cancéreuses.

Résumé

Introduction :

La MMP-9 est largement reconnue pour ses multiples rôles dans la progression tumorale dont ses actions pro-métastatiques. C'est pourquoi, de nombreuses études se sont concentrées sur la compréhension des mécanismes moléculaires responsables de sa surexpression dans les cancers. Cependant, de plus amples connaissances sont encore nécessaires afin d'identifier les voies de signalisations qui favorisent son inhibition.

Dernièrement, une étude de notre laboratoire a démontré que l'induction par l'EGF des cellules de lymphome favorise l'expression du facteur de transcription EGR1 qui module négativement l'expression transcriptionnelle et protéique de la MMP-9 dans les cellules stromales (Bouchard *et al.*, 2010). Parallèlement, une autre étude menée par Xu et ses collaborateurs a permis de démontrer que la BMP-4 inhibe l'expression de la MMP-9 dans les cellules de la rétine (J. Xu *et al.*, 2012). Dans cet article, nous avons cherché à déterminer si l'inhibition de la MMP-9 induite par EGF/EGR1 met à contribution la protéine BMP-4.

Méthodologies et résultats :

L'utilisation de la protéine recombinante EGF humaine, ainsi que la surexpression par transfections transitoires d'EGR1 nous ont permis d'identifier une corrélation entre l'inhibition de la MMP-9 et l'induction de la BMP-4 tant au niveau transcriptionnel (RT-PCR) que protéique (Immunobuvardage et zymographie). L'utilisation subséquente de recombinante humaine BMP-4 et de son expression ectopique par transfection transitoire, ont permis d'observer une importante diminution transcriptionnelle et protéique de la MMP-9 spécifiquement, dans les cellules de fibrosarcomes et de cancer du sein. Nous avons appuyé nos résultats par l'utilisation de gremlin, un inhibiteur naturel de BMP-4, qui contre efficacement l'inhibition de la MMP-9 par EGF. Par la suite, nous avons confirmé la modulation transcriptionnelle de MMP-9 par BMP-4 via l'utilisation du vecteur rapporteur luciférase codant pour le promoteur de la *mmp-9* humaine. De plus, nous avons démontré que la BMP-4 inhibe le

pouvoir invasif des cellules HT1080 sur matrigel. Finalement, nous avons prouvé que la signalisation Smad1/5/8 est nécessaire à l'inhibition de la MMP-9 par BMP-4.

Conclusion :

Dans cet article, nous rapportons qu'EGF collabore avec la BMP-4 afin d'inhiber l'expression de la MMP-9 ainsi que le potentiel invasif des cellules cancéreuses HT1080.

Contribution des auteurs :

La conception des expériences a été effectuée par le Docteur Yves St-Pierre et moi-même. J'ai réalisé l'ensemble des expériences de cet article. Docteur Yves St-Pierre et moi avons écrit l'article.

Bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) and epidermal growth factor (EGF) inhibit metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in cancer cells

Nathalie Bibens Laulan¹ and Yves St-Pierre ¹

¹ INRS-Institut National de la Recherche Scientifique, INRS-Institut-Armand-Frappier, Boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada

Correspondence to: Yves St-Pierre, email: yves.st-pierre@iaf.inrs.ca

Keywords: Gene expression, matrix metalloproteinase-9, bone morphogenetic protein-4, EGF, gremlin

Received: February 02, 2015

Accepted: March 16, 2015

Published: March 23, 2015

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

ABSTRACT

Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) plays a central role in the progression of the cancer. While a large number of studies have contributed to our understanding of the molecular mechanisms responsible for upregulating MMP-9 gene expression in normal and cancer cells, our knowledge on the signals that suppress MMP-9 expression is much more limited. Here, we report that EGF and BMP-4 cooperate to inhibit MMP-9 expression in cancer cells. Treatment with EGF reduces the expression of MMP-9 at both mRNA while augmenting BMP-4 expression. Interestingly, recombinant BMP-4 suppressed constitutive and PMA-induced MMP-9 expression in both fibrosarcoma and breast cancer cells. Addition of gremlin a natural inhibitor of BMP-4, inhibited the suppression of MMP-9 by EGF. The suppression of MMP-9 by BMP-4 likely occurs at the transcriptional level since BMP-4 suppressed MMP-9 mRNA expression and activation of a reporter vector encoding the human MMP-9 promoter. The suppressive effect of BMP-4 occurs via Smad1/5/8 and is specific since BMP-4 did not inhibit MMP-2 while BMP-2 was ineffective in suppressing MMP-9. Taken together, these results are consistent with a new paradigm for the role of EGF and BMPs in controlling MMP gene expression in cancer cells.

INTRODUCTION

Tumor cell proliferation, invasion and metastasis are mediated, at least in part, through the degradation of the extracellular matrix by metalloproteinases (MMPs) locally produced by tumor and stromal cells. A point in case is MMP-9, which plays a significant role in cell invasion and metastasis in several cancers [1-4]. Consequently, a large number of studies have focused their attention on identifying and characterizing the molecular mechanisms that are responsible for increased expression of MMP-9 in cancer. In contrast, our knowledge on the molecular mechanisms that suppress MMP-9 remains largely unexplored and largely focused on epigenetic mechanisms, including DNA methylation [5-7]. Using an experimental mouse lymphoma model, where MMP-9 plays a central role, our group has recently shown that the EGF/EGR1 (epidermal growth factor/ early growth response 1) pathway was involved in the repression of MMP-9

expression by stromal cells [8]. More specifically, we found that expression of MMP-9 in stromal was repressed by the activation of the *EGR1* gene induced by EGF secreted by tumor cells and it correlates with decreased MMP-9. How EGF/EGR-1 suppresses MMP-9, however, remains unknown.

Bone morphogenetic proteins (BMPs) were initially identified by Marshall Urist in 1960 [9]. Today, more than 30 members the BMP family have been reported. BMPs are extracellular proteins that bind membrane anchored serine/threonine receptors and induce a signal through intracellular R-Smads (1/5/8) signalization. Activated R-Smads form a heteromeric complex with the classic Smad4 which translocates to the nucleus and activates the transcription of BMP target genes [10]. Until recently, BMPs have been well known for their role in bone formation and as being powerful developmental regulators. The functions of BMPs, however, seems to go well beyond their role in bone formation. They also

control a broad range of biological activities. During embryonic development, for example, BMP-4 is involved in gastrulation, mesoderm formation, hematopoiesis and development of several organs and tissues [11-13]. In fact, their role as critical signaling molecules that regulate cell fate decision, cell differentiation, cell survival and vasculogenesis, motility and cell adhesion are now well recognized. Not surprisingly, these properties have attracted the attention of an increasing number of investigators in the field of cancer. Abnormally high levels of BMPs have been reported in many cancer and have been associated with a poor prognosis, consistent with their ability promote dissemination, invasiveness and migration [14, 15]. Their role in cancer progression, however, remains ambiguous since several studies have shown that BMPs have anti-tumor functions [16, 17]. For example, while we know that BMPs can increase MMP expression in some cancer cells, such as gastric or prostate cancer cells [18, 19], others have shown that BMP-4 treatment of C3HT101/2 stem cells blocks MMP-3 and MMP-13 expression [20]. Such an ability to suppress MMPs has also been reported for BMP-4 and -6 [16, 21]. These results suggest the existence of a functional relationship between BMPs and MMPs. Here, we have investigated whether BMPs could be involved in the suppression of MMP-9 by EGF/EGR-1.

RESULTS

MMP-9 and BMP-4 expression in HT1080 cells following EGF/EGR-1 activation

Using an *in vivo* mouse model, we have previously shown that EGF suppresses MMP-9 gene expression [8]. Using the human HT1080 cells, an *in vitro* cell model commonly used to study the molecular mechanisms regulating human MMP-9, we have confirmed that EGF can suppress MMP-9 in a dose-dependent manner at the mRNA level (Fig. 1A). Similar results were obtained at the protein level as shown by Western blot and zymography (Fig. 1B-C). Such inhibition of MMP-9 by EGF was also observed in human breast cancer cell lines (Supplementary Fig.S1). Because BMP-4 has recently been shown to inhibit choroidal neovascularization by inhibiting VEGF and MMP-9 expression [21], we next investigated whether BMP-4 could be involved in the suppression of MMP-9 expression by EGF/EGR-1. We indeed found that suppression of MMP-9 by EGF in HT1080 cells correlated with increased *BMP-4* gene expression (Fig. 2A). Such increase in BMP-4 expression was also observed in stable transfectants of HT1080 cells expressing constitutive levels of EGR-1, a transcription factor known to be activated EGF (Fig. 2B). We thus tested whether treatment of HT1080 cells with recombinant BMP-4 (rBMP-4) could

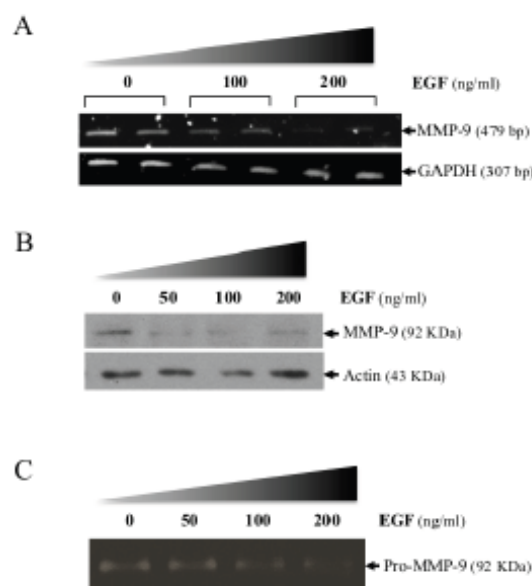


Figure 1: Suppression of MMP-9 in HT1080 cells following treatment with EGF. (A) MMP-9 mRNA expression in absence or presence of recombinant EGF. Levels of transcripts were measured 16 h after adding EGF. GAPDH was used as loading and specificity control. Suppression of MMP-9 expression by increasing doses of EGF was confirmed at the protein level using (B) Western-blot analysis and (C) gelatin zymography. Data are representative of at least two independent experiments.

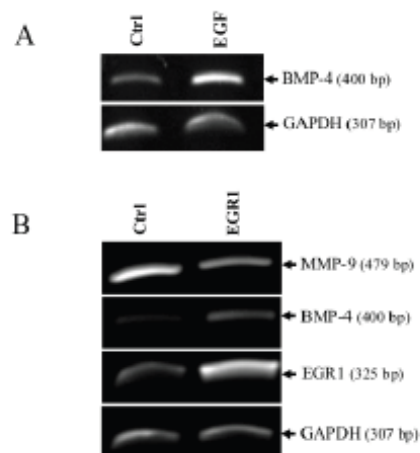


Figure 2: BMP-4 expression in HT1080 cells by EGF/EGR1. (A) BMP-4 mRNA expression in absence or presence of recombinant EGF. Levels of transcripts were measured 16 h after adding EGF. GAPDH was used as loading and specificity control. (B), BMP-4 and MMP-9 expression in HT1080 cells following stable expression of an expression vector encoding human EGR1. GAPDH was used as loading and specificity control. Data are representative of at least two independent experiments.

downregulate MMP-9 expression in HT1080 cells. Our results showed that rBMP-4 suppressed the expression of MMP-9 by HT1080 cells at both mRNA and protein levels (Fig. 3 A-B). The ability of BMP-4 to inhibit MMP-9 was specific since rBMP-4 did not modulate MMP-2. Moreover, no detectable decrease of MMP-9 was observed following treatment with recombinant BMP-2 (Supplementary Fig. S2). We also confirmed that rBMP-4 was biologically active, as shown by its ability to induce phosphorylation of Smad1/5/8 (Fig. 3C). The use of a luciferase reporter containing the human MMP-9 promoter further indicated that BMP-4 is likely to suppress MMP-9 expression at the transcriptional level (Fig. 3D). Ectopic expression of flagged-BMP-4 in HT1080 cells was also effective in suppressing MMP-9, further supporting the specificity of the inhibition (Fig. 4A-C). The ability of BMP-4 to inhibit MMP-9 expression was not restricted to HT1080 cells. We observed a similar decrease of MMP-9 by BMP-4 at both mRNA and proteins levels using the human breast epithelial MDA-MB-231, MDA-MB-468 and SK-BR3 cells, which express MMP-9 following stimulation with PMA (Fig. 5).

Restoration of MMP-9 gene expression with gremlin

To further confirm that BMP-4 inhibits the expression of MMP-9, we used gremlin, a natural

antagonist of BMP-4 which is highly expressed in cancer-associated stromal cells [22]. Our results showed that treatment of HT1080 cells with increasing concentrations of recombinant gremlin induced a detectable increase in MMP-9 expression in HT1080 cells at both mRNA and protein levels (Fig. 6A-B). Gremlin also blocked the EGF-mediated MMP-9 suppression (Fig. 6C). It also restored PMA-induced MMP-9 expression in cells treated with BMP-4. We also observed a significant increase in MMP-9 transcription and protein in MDA-MB-231 during treatment with gremlin (Supplementary Fig. S2). The effectiveness of gremlin to block BMP-4-induced signals was further confirmed by monitoring the phosphorylation of Smad1/5/8 (Fig. 6D).

BMP-4 over-expression inhibited HT1080 cellular invasion

Because elevated level of MMP-9 is well known to increase the migratory properties of tumor cells *in vivo* and *in vitro* [1, 2, 4], we next tested whether BMP-4 was able to suppress the invasion of HT1080 cells. For this purpose, we compared the *in vitro* transmigration of HT1080 cells through Matrigel in absence and presence of recombinant BMP-4. Our results showed that BMP-4 did indeed reduce the invasiveness of HT1080 cells as compared to control cells (Fig. 7).

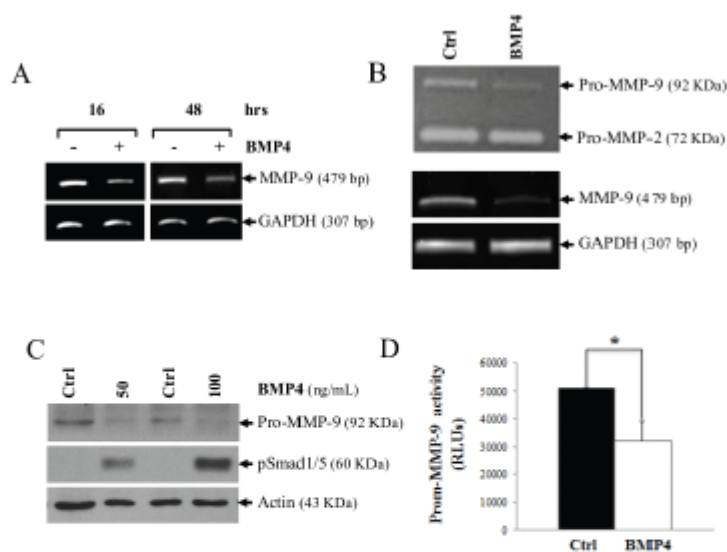


Figure 3: MMP-9 is decreased following BMP-4 stimulation in HT1080 cells. (A) MMP-9 mRNA expression 24 and 48h following stimulation with recombinant BMP-4 (200 ng/ml). GAPDH was used as loading and specificity control. In (B), a zymogram (top gel) showing reduced MMP-9 secretion in supernatants of HT1080 cells treated for 16h with recombinant BMP-4 (200ng/ml). The lower panel shows the MMP-9 mRNA level of the treated cells. (C) Western blot analysis showing expression of MMP-9 and phosphorylation of Smad1/5 after treatment with human recombinant BMP-4. (D) Luciferase activity of in HT1080 cells transfected with a luciferase reporter vector containing the MMP-9-promoter following treatment with human recombinant BMP-4. Statistical analyses were carried out using Student's t test for unpaired samples. (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$).

Smad6 affect the down-regulation of MMP-9 induced by BMP-4

BMPs are well-known for their ability to induce signaling through the canonical pathway of Smad1/5/8, co-Smad (Smad4) and inhibitory Smad6 and 7. To determine whether this molecular pathway was involved in MMP-9 suppression by BMP-4, we carried a transient transfection of HT1080 cells using an expression vector encoding Smad6, which dimerizes with Smad1/5/8, thereby blocking its translocation to the nucleus [23]. We first confirmed that *de novo* expression of Smad6 was effective in blocking the phosphorylation of Smad1/5/8 while reducing the ability of BMP-4 to suppress MMP-9 (Fig. 8).

DISCUSSION

A large number of studies have contributed to our understanding of the molecular mechanisms responsible for upregulating MMP-9 gene expression in normal and cancer cells. In contrast, our knowledge on the repressive signals that suppress MMP-9 expression remains fragmented. In a previous study, we had found that EGF suppressed the expression of MMP-9 *in vivo* and in

HT1080 cells [8]. Here we have extended this work by showing that: 1) EGF-mediated suppression of MMP-9 was also observed in other cancer cells, most notably in human breast cancer cells; 2) stimulation with EGF also induced expression of BMP-4; this effect was observed in both HT1080 fibrosarcoma cells and MDA-MB-231, MDA-MB-468, SK-BR3 mammary epithelial cells; 3) the suppression of MMP-9 by BMP-4 likely occurs at the transcriptional level since BMP-4 suppresses MMP-9 mRNA expression and suppresses the activation of a reporter vector encoding the human MMP-9 promoter; BMP-4-mediated suppression of MMP-9 likely involves the Smad1/5/8 pathway. Moreover, transfection of a vector encoding Smad6 suggests that the suppressive effect of BMP-4 possibly involves the Smad1/5/8 pathway. Finally, we found that the effect of BMP-4 on MMP-9 was specific since BMP-4 did not inhibit MMP-2 while BMP-2 was ineffective in suppressing MMP-9.

BMPs are often associated with a poor prognosis in patients with different types of cancers. This seems to be largely due to the fact that BMPs target genes encoding osteoblast proteins and osteoblast-specific transcription factors [24]. For example, in prostate cancer, BMP-6 promotes osteoblastic activity of prostate cancer cells and confer them with a more invasive phenotype [25, 26]. Similarly, BMP-7 promotes expression of VEGF which

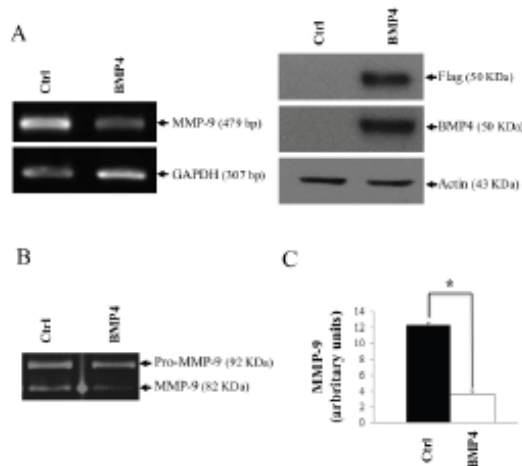


Figure 4: *De novo* expression of BMP-4 reduces MMP-9 gene expression. (A) MMP-9 mRNA expression in mock-transfected HT1080 cells or HT1080 cells transfected with an expression vector encoding a flagged human BMP-4 (pCMV-BMP-4-Flag). GAPDH was used as loading and specificity control. The lower panel represents the control Western blot gels showing *de novo* expression of flagged BMP-4 in transfected cells. (B) Zymography (left panel) showing MMP-9 in the supernatant of transfected cells as in (A). (C) Quantitative analyses of MMP-9 expression by imaging densitometry is shown on the right histogram, which represents the means of independent experiments shown in (A). Data are representative of at least three independent experiments. (* = $p \leq 0,05$)

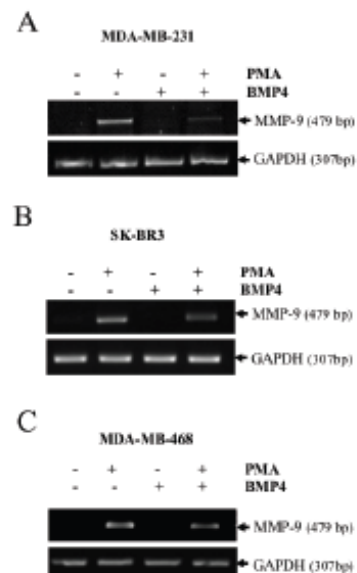


Figure 5: MMP-9 expression is suppressed by BMP-4 in MDA-MB-231, MDA-MB-468 and SKBR3 cells. MMP-9 mRNA expression in PMA-stimulated cells (20ng/ml) treated with or without recombinant BMP-4 (50 or 100 ng/ml) in MDA-MB-231 cells (A), SK-BR3 (B) and MDA-MB-468 cells (C). GAPDH was used as loading and specificity control. Data are representative of at least three independent experiments.

contributes to the osteoblastic metastasis lesions [27]. A number of studies have shown, however, that BMPs may have a dual role in cancer and may in fact hamper tumor progression. For example, the bone morphogenetic protein pathway is active in human colon adenomas but inactivated in colorectal cancer [28]. A mutation of the receptor BMPR1A (bone morphogenetic protein receptor type IA) also promotes colon cancer [29]. Other studies have further shown that BMPs may also exert an anti-tumorigenic effect in breast cancer [16, 17]. In patients with familial adenomatous polyposis, BMP-2 can also block cell growth while promoting apoptosis of mature epithelial cells [30]. Such suppressive effect for BMPs seems to be particularly true for BMP-4. A recent clinical study has shown that patients high levels of BMP-4 have a better chance for survival when compared to patients with high-grade glioma who have a lower expression level of BMP-4 [31]. Also, BMP-4 negatively regulates tumor-

initiating cells [32]. Whether such dual role in cancer is due to the ability to regulate MMPs is an interesting possibility since MMPs have also been reported to have a dual role in cancer. Our results herein and those from other groups showing that BMPs can suppress MMP gene

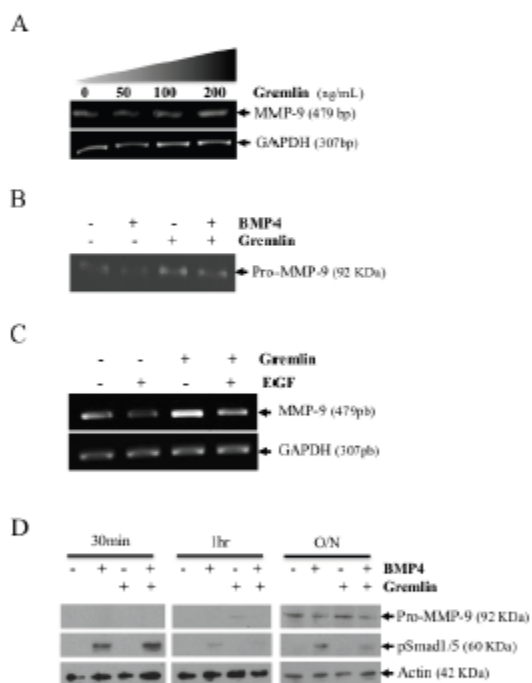


Figure 6: MMP-9 is increased following treatment of HT1080 cells with gremlin. (A) MMP-9 mRNA expression in cells treated with increasing concentrations of gremlin. GAPDH was used as loading and specificity control. (B) Zymogram showing MMP-9 in the supernatant of HT1080 cells treated with recombinant BMP-4 in absence or presence of gremlin. (C) Kinetic analysis showing MMP-9 expression and phosphorylation of Smad1/5 in cells treated treatment with human recombinant BMP-4 with or without gremlin. Data are representative of at least three independent experiments. (D) MMP-9 mRNA expression in absence or presence of recombinant EGF and gremlin in HT1080 cells.

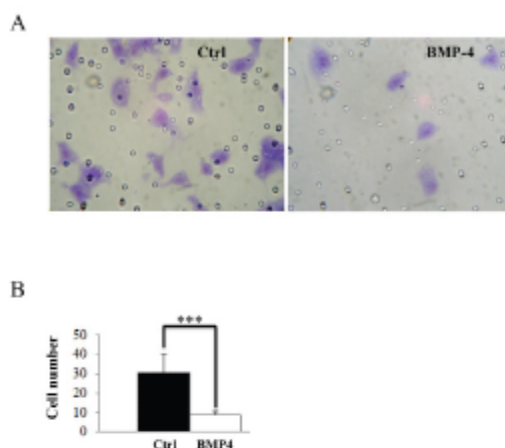


Figure 7: BMP-4 inhibits *in vitro* HT1080 cell invasion. (A) HT1080 cell migration across Matrigel with or without recombinant BMP-4. (B) Migrated HT1080 cells were quantified. Data are average \pm SEM; n = 10 unit areas. Data are representative of at least three independent experiments. (***) $p \leq 0.001$.

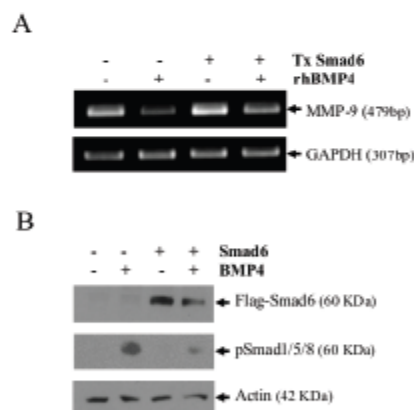


Figure 8: Smad6 reduces the ability of BMP-4 to suppress MMP-9 expression. (A) MMP-9 mRNA expression in mock-transfected HT1080 cells or HT1080 cells transfected with an expression vector encoding a flagged Smad6 (pCS2-Smad6-Flag). MMP-9 expression was measured 16h after transfection. The lower panel represents the control Western blot gels showing *de novo* expression of Smad6 in transfected cells. GAPDH and actin were used as loading and specificity controls for RT-PCR and Western blot analyses respectively. In (B), a zymogram showing MMP-9 in the supernatant of HT1080 transfected cells. Data are representative of at least three independent experiments.

expression supports this possibility. For example, Otto et al., have shown that BMP-4 blocks expression of MMP-3 and MMP-13 in C3HT101/2 stem cells [20]. BMP-6 has also been shown to inhibit MMP-9 expression in breast cancer cells [16]. Such suppression of MMP-9 by BMPs has also been reported during choroidal neovascularization [21]. Our results showing that EGF induced BMP-4 further suggest the existence of a new functional relationship between both proteins that may be critical in the control of the invasive behavior of cancer cells. Taken together, these results are consistent with a new paradigm for the role of BMPs in controlling MMP gene expression in cancer cells. Future investigations will nevertheless be needed to solidly establish such a model and how the canonical Smad pathway is involved. While our preliminary studies with Smad6 are interesting in this regard, it is important to note that BMPs can activate the non-canonical MAPK (p38, MEK/ERK), Tak1/Tab1 and PI3K pathways [33, 34]. Interestingly, these non-canonical signal pathways are widely recognized to activate various transcription factors, including Nuclear factor-kappaB (NF- κ B) [35], a transcription factor well-known for its ability to modulate MMP-9 expression [36]. Future investigations will thus be needed to identify which of these pathways are involved.

Overall, our study supports the idea that targeting EGF/BMPs could be a valuable alternative to inhibit MMP-dependent tumor progression, at least in some types of cancer. Cautions need to be taken, however, since MMP activity is not limited to extracellular matrix degradation and extends to proteolysis of various proteins bound to the cell membrane or even proteins secreted by cells. The repertoire of MMP substrates, or degradome, does indeed vary depending on the type and the different grades of tumors and in many cases, local increase of MMPs may have different impact on tumor progression [37]. Clearly, prudence will be needed to fully exploit the functional relationship between BMPs and MMPs for the treatment of cancer. Lessons from the failure of MMP inhibitors in clinical trials will be valuable to this regard.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and reagents

The human MDA-MB-231, MDA-MB-468, SKBR3, MCF7 and HT1080 cell lines were obtained from the American Tissue Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). The MDA-MB-231, MDA-MB-468, MCF7 and HT1080 cells were maintained in culture in Dulbecco's modified Eagle complete medium (DMEM) [supplemented with 10% (v/v) FCS, 2 mmol/L L-glutamine and 10 mmol/L HEPES buffer]. The SKBR3 cell was maintained in culture in McCoy's medium [supplemented with 10% (v/v) FCS, 2 mmol/L L-glutamine and 10 mmol/L HEPES

buffer]. Recombinant human EGF was purchased from Prospec Technogene (Ness Ziona, Israel). PMA (Phorbol-12-myristate-13-acetate) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MI). Recombinant Human BMPs and Gremlin were obtained from Peprotech (Rocky Hill, NJ, USA). All other reagents were purchased from Sigma-Aldrich, unless otherwise indicated.

RNA extraction and semi quantitative RT-PCR

Total RNA was isolated using Trizol reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, lifetechnologies, Burlington, ON, Canada). After reverse transcription, cDNAs were amplified using the following conditions: 94°C for 1 min, followed by 30-35 cycles of the following: 94°C for 1 min, 58-64°C for 1 min (depending on the primers), and 72°C for 1 min, followed by a final extension step at 72°C for 10 min. PCR was performed in a thermal cycler (MJ Research, Watertown, MA). PCR assays using equal amounts of RNAs that were reverse-transcribed and amplified by PCR for 25 to 40 cycles with gene-specific primers (Table S1) confirmed that the amplification was in the linear range for each gene. As an internal control, amplification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA was carried out by RT-PCR using specific primers. Amplified products were analyzed by electrophoresis on 1% agarose gels using SYBR Safe DNA gel (Invitrogen) staining and UV illumination.

Vectors, transfection and luciferase assays

The vector encoding Smad6 (pCS2-Flag-Smad6) was obtained from Addgene (Cambridge, MA). The vector encoding BMP-4 (pCMV-Flag-BMP4) was obtained from Sino Biological Inc. (Beijing, China). The plasmid encoding the luciferase reporter vector containing a fragment encompassing the essential consensus sequences for the transcriptional activity of the *mmp-9* promoter (pGL3-MMP-9) has been described [36]. For transfection, cells were plated at equal density 24h before transfection. Cells were then washed twice and transfected with 2 μ g of DNA using DNAfectin 2100 according to manufacturer's protocol (ABM, Richmond, BC, Canada). After transfection, cells were incubated in complete medium at 37°C in 5% CO₂ for 4 h. The culture medium was then changed to complete DNEM medium for 20 h. For zymography only, the culture medium was changed for serum free medium for 16 h. Luciferase activity was measured using the Luciferase Assay System protocol (Promega, Madison, WI, USA) and a luminometer (Lumat LB 9507, Berthold). The transfection efficiency was monitored by co-transfection with the pCMV/ β Gal plasmid encoding β -galactosidase (Promega, Madison, WI, USA). The β -galactosidase activity was detected

by a colorimetric enzyme assay using o-nitrophenyl- β -galactopyranoside as a substrate. The ratio of luciferase to β -galactosidase activity in each served as a measured of normalized luciferase activity.

Gelatin Zymography

Zymography was performed in polyacrylamide gels that had been cast in the presence of gelatin as previously described [36]. Briefly, samples were suspended in loading buffer and, without prior denaturation, were run on a 7.5% SDS-polyacrylamide gel containing 0.5 mg/ml of gelatin. After electrophoresis, gels were washed to remove SDS and incubated for 18 h at 37°C in a denaturing buffer. Gels were subsequently stained with Coomassie brilliant blue G-250 and destained in 30% (v/v) methanol/ 10% acetic acid to detect gelatinase secretion. The proteolytic activity of MMP-9 was identified as a clear band on a blue background.

Matrigel invasion assay

Invasion assay was carried out using Matrigel-coated invasion chambers (BD Biosciences). Briefly, cells were resuspended in culture medium without FBS at the concentration of 6×10^4 cells/ml and 500 μ l of the cell suspension was seeded on the upper chamber. The lower chamber was filled with 700 μ l of the culture medium without cells and 10% FBS was added as a chemoattractant. Cells were incubated with or without rhBMP4 for 18 h in a humidified tissue culture incubator, at 37°C, 5% CO₂ atmosphere. After removing non-invasive cells with a cotton swab. Invasive cells adhering to membrane of the upper chamber were fixed with methanol 100% for 1 min and then stained with a Borax 1% toluidine 1% solution for 1 min. Number of cells on the membrane was counted under a light microscope at 40X magnification.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by a grant from the Canadian Institutes for Health Research of Canada (CIHR).

CONFLICT OF INTEREST

The authors of this manuscript have no conflicts of interest to declare.

REFERENCES

1. Bernhard EJ, Gruber SB, Muschel RJ. Direct evidence linking expression of matrix metalloproteinase 9 (92-kDa

gelatinase/collagenase) to the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:4293-4297.

2. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2:161-174.
3. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*. 2010; 141:52-67.
4. Lopez-Otin C, Matrisian LM. Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat Rev Cancer*. 2007; 7:800-808.
5. Chicoine E, Esteve PO, Robledo O, Van Themsche C, Potworowski EF, St-Pierre Y. Evidence for the role of promoter methylation in the regulation of MMP-9 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 297:765-772.
6. Couillard J, Demers M, Lavoie G, St-Pierre Y. The role of DNA hypomethylation in the control of stromelysin gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 342:1233-1239.
7. Sato N, Maehara N, Su GH, Goggins M. Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on matrix metalloproteinase expression and pancreatic cancer cell invasiveness. *J Natl Cancer Inst*. 2003; 95:327-330.
8. Bouchard F, Belanger SD, Biron-Pain K, St-Pierre Y. EGR-1 activation by EGF inhibits MMP-9 expression and lymphoma growth. *Blood*. 2010; 116:759-766.
9. Nogami H, Urist MR. The classic : a morphogenetic matrix for differentiation of cartilage in tissue culture. *Clin Orthop Relat Res*. 2009; 467:3063-3067.
10. Ten Dijke P, Korchynskiy O, Valdimarsdottir G, Goumans MJ. Controlling cell fate by bone morphogenetic protein receptors. *Mol Cell Endocrinol*. 2003; 211:105-113.
11. Cho KW, Kim JY, Song SJ, Farrell E, Eblaghie MC, Kim HJ, Tickle C, Jung HS. Molecular interactions between Tbx3 and Bmp4 and a model for dorsoventral positioning of mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:16788-16793.
12. Pizette S, Abate-Shen C, Niswander L. BMP controls proximodistal outgrowth, via induction of the apical ectodermal ridge, and dorsoventral patterning in the vertebrate limb. *Development*. 2001; 128:4463-4474.
13. Wimmier G, Blessing M, Labosky PA, Hogan BL. Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev*. 1995; 9:2105-2116.
14. Kejner AE, Burch MB, Sweeny L, Rosenthal EL. Bone morphogenetic protein 6 expression in oral cavity squamous cell cancer is associated with bone invasion. *Laryngoscope*. 2013; 123:3061-3065.
15. Owens P, Polikowsky H, Pickup MW, Gorska AE, Jovanovic B, Shaw AK, Novitskiy SV, Hong CC, Moses HL. Bone morphogenetic proteins stimulate mammary fibroblasts to promote mammary carcinoma cell invasion.

- PloS One. 2013; 8:e67533.
16. Wang C, Hu F, Guo S, Mi D, Shen W, Zhang J, Qiao Y, Zhu T, Yang S. BMP-6 inhibits MMP-9 expression by regulating heme oxygenase-1 in MCF-7 breast cancer cells. *J. Cancer Res Clin Oncol.* 2011; 137:985-995.
 17. Buijs JT, van der Horst G, van den Hoogen C, Cheung H, de Rooij B, Kroon J, Petersen M, van Overveld PG, Pelger RC, van der Pluijm G. The BMP2/7 heterodimer inhibits the human breast cancer stem cell subpopulation and bone metastases formation. *Oncogene.* 2012; 31:2164-2174.
 18. Darby S, Cross SS, Brown NJ, Hamdy FC, Robson CN. BMP-6 over-expression in prostate cancer is associated with increased Id-1 protein and a more invasive phenotype. *J Pathol.* 2008; 214:394-404.
 19. Kang MH, Oh SC, Lee HJ, Kang HN, Kim JL, Kim JS, Yoo YA. Metastatic function of BMP-2 in gastric cancer cells: the role of PI3K/AKT, MAPK, the NF-kappaB pathway, and MMP-9 expression. *Exp Cell Res.* 2011; 317:1746-1762.
 20. Otto TC, Bowers RR, Lane MD. BMP-4 treatment of C3H10T1/2 stem cells blocks expression of MMP-3 and MMP-13. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 353:1097-1104.
 21. Xu J, Zhu D, Sonoda S, He S, Spee C, Ryan SJ, Hinton DR. Over-expression of BMP4 inhibits experimental choroidal neovascularization by modulating VEGF and MMP-9. *Angiogenesis.* 2012; 15:213-227.
 22. Sneddon JB, Zhen HH, Montgomery K, van de Rijn M, Tward AD, West R, Gladstone H, Chang HY, Morganroth GS, Oro AE, Brown PO. Bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is widely expressed by cancer-associated stromal cells and can promote tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103:14842-14847.
 23. Hata A, Lagna G, Massague J, Hemmati-Brivanlou A. Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev.* 1998; 12:186-197.
 24. Reddi AH, Reddi A. Bone morphogenetic proteins (BMPs): from morphogens to metabologens. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009; 20:341-342.
 25. Dai JL, Keller J, Zhang J, Lu Y, Yao Z, Keller ET. Bone morphogenetic protein-6 promotes osteoblastic prostate cancer bone metastases through a dual mechanism. *Cancer Res.* 2005; 65:8274-8285.
 26. Darby S, Cross SS, Brown NJ, Hamdy FC, Robson CN. BMP-6 over-expression in prostate cancer is associated with increased Id-1 protein and a more invasive phenotype. *J Pathol.* 2008; 214:394-404.
 27. Dai J, Kitagawa Y, Zhang J, Yao Z, Mizokami A, Cheng S, Nör J, McCauley LK, Taichman RS, Keller ET. Vascular endothelial growth factor contributes to the prostate cancer-induced osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic protein. *Cancer Res.* 2004; 64:994-999.
 28. Kodach LL, Bleuming SA, Musler AR, Peppelenbosch MP, Hommes DW, van den Brink GR, van Noesel CJ, Offerhaus GJ, Hardwick JC. The bone morphogenetic protein pathway is active in human colon adenomas and inactivated in colorectal cancer. *Cancer.* 2008; 112:300-306.
 29. Kodach LL, Wiercinska E, de Miranda NF, Bleuming SA, Musler AR, Peppelenbosch MP, Dekker E, van den Brink GR, van Noesel CJ, Morreau H, Hommes DW, Ten Dijke P, Offerhaus GJ, Hardwick JC et al. The bone morphogenetic protein pathway is inactivated in the majority of sporadic colorectal cancers. *Gastroenterology.* 2008; 134:1332-1341.
 30. Hardwick JC, Van Den Brink GR, Bleuming SA, Ballester I, Van Den Brande JM, Keller JJ, Offerhaus GJ, Van Deventer SJ, Peppelenbosch MP. Bone morphogenetic protein 2 is expressed by, and acts upon, mature epithelial cells in the colon. *Gastroenterology.* 2004; 126:111-121.
 31. Ivanova T, Zouridis H, Wu Y, Cheng LL, Tan IB, Gopalakrishnan V, Ooi CH, Lee J, Qin L, Wu J, Lee M, Rha SY, Huang D, Liem N, Yeoh KG, Yong WP, Teh BT, Tan P. Integrated epigenomics identifies BMP4 as a modulator of cisplatin sensitivity in gastric cancer. *Gut.* 2013; 62:22-33.
 32. Piccirillo SG, Reynolds BA, Zanetti N, Lamorte G, Binda E, Broggi G, Brem H, Olivi A, Dimeco F, Vescovi AL. Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature.* 2006; 444:761-765.
 33. Barneda-Zahonero B, Miñano-Molina A, Badiola N, Fadó R, Xifró X, Saura CA, Rodríguez-Alvarez J. Bone morphogenetic protein-6 promotes cerebellar granule neurons survival by activation of the MEK/ERK/CREB pathway. *Mol Biol Cell.* 2009; 20:5051-5063.
 34. Zhou Q, Heinke J, Vargas A, Winnik S, Krauss T, Bode C, Patterson C, Moser M. ERK signaling is a central regulator for BMP-4 dependent capillary sprouting. *Cardiovasc Res.* 2007; 76:390-399.
 35. Zhang YE. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res.* 2009; 19:128-139.
 36. Estève PO, Chicoine E, Robledo O, Aoudjit F, Descoteaux A, Potworowski EF, St-Pierre Y. Protein kinase C-zeta regulates transcription of the matrix metalloproteinase-9 gene induced by IL-1 and TNF-alpha in glioma cells via NF-kappa B. *J Biol Chem.* 2002; 277:35150-35155.
 37. Cauwe B, Martens E, Proost P, Odenakker G. Multidimensional degradomics identifies systemic autoantigens and intracellular matrix proteins as novel gelatinase B/MMP-9 substrates. *Integr Biol.* 2009; 1:404-426.

CHAPITRE 3 :

Intracellular galectin-7 expression in cancer cells results from an autocrine transcriptional mechanism and endocytosis of extracellular galectin-7

L'expression intracellulaire de la galectine-7 dans les cellules cancéreuses résulte d'un mécanisme transcriptionnel autocrine et de l'endocytose de la galectine-7 extracellulaire

Résumé

Introduction :

La galectine-7 est constitutivement surexprimée chez certaines cellules malignes et présente dans le microenvironnement tumoral. Son expression aberrante est particulièrement remarquée dans les types agressifs de cancers du sein et des ovaires (Grosset *et al.*, 2014, Labrie *et al.*, 2014). Les galectines sont clairement reconnues pour leurs actions dichotomiques pro ou anti-tumorales selon leur nature et leur localisation. La galectine-7 ne faisant pas exception, il est donc crucial de bien caractériser les divers mécanismes régulateurs de son expression et de sa localisation afin de développer de nouvelles thérapies qui visent à inhiber ses actions pro-tumorales. Bien que nos précédents travaux démontrent des régulations transcriptionnelles de son expression via l'action de facteurs transcriptionnels et de régulation épigénétique (Campion *et al.*, 2014, Campion *et al.*, 2013, Demers *et al.*, 2009), d'autres études soulèvent l'hypothèse que son expression cytosolique pourrait dériver de la capacité des cellules à endocytoser la forme extracellulaire. Dans notre étude, nous avons cherché à déterminer si l'expression de la galectine-7 dans le microenvironnement tumoral peut contribuer à son augmentation cytosolique.

Méthodologies et résultats :

Le traitement de diverses lignées cellulaires du cancer du sein et des ovaires avec la forme soluble de la galectine-7 humaine a démontré que la galectine-7 extracellulaire induit l'expression de *novo* de la galectine-7 au niveau de l'ARNm. L'implication d'un mécanisme transcriptionnel du gène *lgals7* a été confirmée par l'utilisation d'un vecteur rapporteur luciférase sous le contrôle du promoteur de *lgals7*. Cet effet autocrine s'accompagne d'une rapide expression intracellulaire et d'une compartimentalisation mitochondriale. L'utilisation d'une forme mutante (R74S) de la galectine-7 a démontré que cette internalisation est dépendante du CRD. Des expériences de cinétique où l'expression de la galectine-7 intracellulaire a été étudiée selon une cinétique et une variation de température, de même qu'avec des inhibiteurs d'endocytose ont également mis en évidence une internalisation de la galectine-7

extracellulaire clathrine dépendante. Des expériences faisant appel à des techniques de microscopie confocale en temps réel nous ont permis de confirmer l'endocytose de la galectine-7 extracellulaire.

Conclusion :

Nos résultats suggèrent que la présence de la galectine-7 dans le microenvironnement contribue à son expression intracellulaire via deux mécanismes distincts et complémentaires : (1) au niveau transcriptionnel via une boucle autocrine et (2) par endocytose de la galectine-7 extracellulaire.

Contribution des auteurs :

La conception des expériences a été effectuée par le Docteur Yves St-Pierre et moi-même. J'ai réalisé l'ensemble des expériences de cet article. Docteur Yves St-Pierre et moi avons écrit l'article.

Intracellular galectin-7 expression in cancer cells results from an autocrine transcriptional mechanism and endocytosis of extracellular galectin-7.

Nathalie Bibens-Laulan and Yves St-Pierre*.

INRS-Institut Armand-Frappier, 531 Boul. des Prairies, Laval, QC, Canada, H7V 1B7

Running title: Autocrine regulation of galectin-7

Corresponding author:

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

Abstract

The β -galactoside binding protein galectin-7 (gal-7) is constitutively expressed at abnormally high levels in the outside milieu and intracellular compartments of many types of epithelial cancer cells, most notably in aggressive forms of ovarian and breast cancer. It is thus of utmost importance to understand how gal-7 traffics between both intracellular and extracellular to develop novel drugs that target the protumorigenic functions of galectin-7. In the present work, we report that extracellular gal-7 plays a central role in controlling intracellular gal-7 in cells. It does so via two distinct yet complementary mechanisms: firstly by increasing the transcriptional activation of *lgals7* gene transcription, and secondly via carbohydrate-dependent re-entry into the cells. Such re-entry of gal-7 is inhibited by Dynasore and Pitstop-2, suggesting that gal-7 enter cells via clathrin-mediated endocytosis. Such entry of extracellular gal-7 inside cells is rapid and reaches cytosolic and mitochondrial compartments. Taken together, these findings reveal the existence of a positive self-amplification pathway that regulates intracellular gal-7 expression in breast and ovarian cancer cells.

Introduction

Galectins are intracellular small molecular weight soluble proteins that are released in the extracellular space via a non-classical export mechanism. Once in the extracellular space, they bind to repeating units of high density O-glycans on the peptide backbone of membrane receptors, facilitating the packing of glycosylated receptors into an ordered cross-linked lattice at the cell surface (Fred Brewer, 2002, Grigorian *et al.*, 2009, Nabi *et al.*, 2015). In the cytosol, they accomplish various cellular functions by interacting with multiple ligands using CRD- and CRD-independent interactions (Vladoiu *et al.*, 2014). This is particularly true for galectin-7 (gal-7). We and others have found that gal-7 is constitutively expressed in the cytosol of multiple types of cancer cells of epithelial origin, most notably breast and ovarian cancer cells (Grosset *et al.*, 2014, H. J. Kim *et al.*, 2013a, Labrie *et al.*, 2014). The mechanisms responsible for such constitutive expression of gal-7 intracellularly, however, remain largely unknown although it is logical to assume that gal-7 in cancer cells is regulated, at least in part, at the transcriptional level via DNA methylation and the implication of specific transcription factors, such as mutant p53, Nf-kB, and the

CCAAT/enhancer-binding protein beta-2 isoform (CEBP β -2) (Campion *et al.*, 2014, Champion *et al.*, 2013, Demers *et al.*, 2009). Because galectins are well known for their ability to penetrate cells via endocytosis following binding to cell surface glycoreceptors (Lepur *et al.*, 2012, Schneider *et al.*, 2010), another possibility is that cytosolic gal-7 originates from endocytic uptake from the pool present in the extracellular milieu. Solving this issue is critical for the design of gal-7-specific drugs aimed at inhibiting gal-7 protumorigenic functions, most notably in high fatality cancer for which no effective treatment exists. In the present work, we provide evidence that expression of gal-7 inside cancer cells results from both an autocrine transcriptional mechanism and the endocytosis of extracellular gal-7.

Material and Methods

Reagents and cell lines

The breast MDA-MB-231, MCF-7, MDA-MB-468 cell lines and the human fibrosarcoma HT1080 cell lines were obtained from the American Tissue Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). The ovarian cancer cell lines were kindly provided by Dr. E. Asselin (University of

Quebec in Trois-Rivières). The ovarian human A2780 and OVCAR-3 cell lines were maintained in RPMI 1640 medium and SKOV-3 cell line was maintained in McCoy's 5A medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethane sulfonic acid (HEPES) buffer and 15% (vol/vol) FBS. The other cell lines were maintained in culture in Dulbecco modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 2 mM L-glutamine, 1mM sodium pyruvate 10 mM, HEPES, and 10% (vol/vol) FBS. All cell culture products were purchased from Life Technologies (Burlington, ON, Canada). Pitstop-2 was obtained from Abcam (Toronto, ON, Canada) and Dynasore from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Anti-human galectin-7 was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) while anti-lamin A/C, anti-Cox IV and anti- β -tubulin were obtained from Cell Signaling (Danvers, MA, USA). Anti- β -actin and anti-FITC were from Sigma-Aldrich.

RNA extraction and semi-quantitative RT-PCR

Total RNA was isolated from cells using Trizol reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen,

Burlington, ON, Canada). After reverse transcription with an Omniscript reverse transcriptase kit from QIAGEN (Toronto, ON, Canada), cDNA was amplified using the following conditions: 94°C for 1 min, followed by 30-40 cycles of the following: 94°C for 1 min, 58-64°C for 1min (depending on the primers) for hybridization temperature, and 72°C for 1 min, followed by a final extension step at 72°C for 10 min. PCR assays using equal amounts of RNAs that were reverse-transcribed and amplified by PCR with genes specific primers (**Table 1**) confirmed that the amplification was in the linear range for each gene. As an internal control, amplification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA. PCR reactions were performed in a thermal cycler (MJ Research, Watertown, MA) and amplicons analyzed by electrophoresis on agarose gels using SYBR Safe DNA staining (Invitrogen) and UV illumination.

Table 1

Gene	Sense	Antisense
MMP-9	5'-CAA CAT CAC CTA TTG GAT CC-3'	5'-CGG GTG CAC CTA TTG GAT CC-3'
GAPDH	5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3'	5'-CAG AAG TGG TGG TAC CTC TTC CGA-3'
Lgals3	5'-ATG GCA GAC AAT TTT TCG CTC C-3'	5'-ATG TCA CCA GAA ATT CCC AGT T-3'
Lgals7	5'-ATG TCC AAC GTC CCC CAC AAG-3'	5'-TGA CGC GAT GAT GAG CAC CTC-3'

Vectors, transfection and luciferase assays

The pGL3 Basic luciferase reporter vector encoding for the human *lgals7* promoter region has been described (Campion *et al.*, 2013). For transfection, cells were plated at equal density 16-24 h before transfection. Cells were then transfected using DNAfectin 2100 (ABM, Richmond, BC, Canada) according to the manufacturer's protocol. After transfection, cells were incubated in complete medium at 37°C in 5% CO₂ for the indicated periods of time and subjected to a dual reporter assay. Luciferase activity was measured using the Luciferase Assay System protocol (Promega, Madison, WI, USA) and a luminometer (Lumat LB 9507, Berthold). β -galactosidase activity was measured using a colorimetric enzyme assay using the Luminescent β -Galactosidase Detection Kit II according to the manufacturer's instructions (Clontech Laboratories, Mountain View, CA). Luciferase expression levels were normalized to the levels of β -galactosidase expression.

Western Blot analysis

Whole cell extracts were homogenized in RIPA lysis buffer (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) containing protease inhibitors (Roche-Diagnostic, Mississauga, ON, Canada) following the manufacturer's instructions. Mitochondria, nuclear and cytoplasm proteins were extracted using commercial kits (Sigma-Aldrich). Extracellular proteins were collected from cell supernatant and concentrated under vacuum. Equal amounts of proteins were loaded and separated on a 15% SDS-PAGE gel. After transfer, nitrocellulose membranes were first blocked with in a 5% milk in PBS/0.05% Tween 20 solution for 1h and subsequently blotted overnight at 4°C with the primary antibody. Secondary antibodies consisted of horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit, anti-mouse, or anti-goat antibodies (GE Healthcare, Mississauga, ON, Canada). Detection was performed using the enhanced chemiluminescence (ECL) method.

Production of recombinant galectin

Production of human recombinant gal-7 was carried out as described using a pET-22b(+) plasmid encoding a synthetic, codon-optimized cDNA (Vladoiu *et al.*, 2015). In some experiments, recombinant gal-7 was labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC) as described (Vladoiu *et al.*, 2015). FITC-labeled gal-7 was purified using a PD-10 Sepharose column (GE healthcare) and eluted with PBS.

Confocal analysis

Cells were fixed in paraformaldehyde 3% [w/v] for 15 min, permeabilized in PBS/Triton X-100 0.1% [v/v] for 5 min and blocked 30 min at 4°C in 1% [v/v] BSA diluted in PBS (PBA) before addition of the antibodies. All antibodies were diluted in PBA and all washing steps were performed with PBS. Nuclei were stained with ProLong Gold Antifade Reagent with DAPI (Life Technologies). For live cell imaging, cells were seeded in 6-well plates and incubated with FITC-labeled recombinant gal-7 for time-courses ranging from 5 min to 1 hr. DAPI and WGA were used as counterstain. 3D confocal time-lapse imaging was performed at 37°C in a humidified, temperature- and CO₂-controlled live cell chamber. Images were collected sequentially

in three channels (633, 488 and 561nm laser) every 15 sec. Confocal image z-stacks of live cells were recorded with a frame size of 724x724 pixels, a pixel size of 70 nm (0.07µm x 0.07 µm x 1.00 µm) and a z-step size of 1.00 µm every 1.75 seconds. Images shown are maximum intensity projections of few mid-z-sections. All immunofluorescence analyses were carried out using a LSM 780 laser-scanning microscope (Zeiss, Jena, Germany).

Statistical analysis

Statistical significance was calculated using the unpaired Student's t-test. Results were considered statistically significant at $p \leq 0.05$.

Results

Autocrine regulation of *lgals7* in cancer cells. Sustained expression of gal-7 is commonly observed inside and outside aggressive carcinoma cells. Because binding of extracellular galectins to cell surface receptors is well known to trigger gene expression in a wide spectrum of cell types, we first investigated whether extracellular gal-7 can induce its own expression via an autocrine regulatory loop. For this purpose, cancer cells were incubated with increasing concentrations of recombinant gal-7 for

different period of times. Cells were then harvested and *lgals7* gene expression measured by standard RT-PCR. Our results showed that exposure of cancer cells to gal-7 did induce *lgals7* mRNA expression (**Fig. 1A**). Gal-7 did not induce or modulate expression of *lgals3*, indicating that this autocrine regulation was specific. This induction of *lgals7* by recombinant gal-7 was rapid and could readily be detected 3 hr. after addition of gal-7 (**Fig. 1B**). Upregulation of *lgals7* by recombinant gal7 was observed in both ovarian and breast cancer cell lines, including the human breast cancer cell line, MDA-MB-231 (**Fig. 1C, D**). Experiments where addition of recombinant gal-7 to MDA-MB-231 transfected with a luciferase reporter vector containing response elements of the *lgals7* promoter indicated that increased mRNA level of gal-7 in cancer cells occurs via *de novo* gene transcription (**Fig. 1E**). Similar results were obtained using MCF-7 and HT1080 cells (**Supplementary figure 1**). Taken together, these findings reveal the existence of a gal-7 autocrine positive feedback in ovarian and breast cancer cells.

Increased intracellular expression of gal-7.

Western blot analysis of cell lysates collected from MDA-MB-231 cells following

treatment with recombinant human gal-7 showed a rapid increase of gal-7 at the protein level (**Fig. 2A**). No such increase was observed when we incubated MDA-MB-231 cells with an equal concentration of a CRD-defective mutant form of gal-7, suggesting that *de novo* increase of gal-7 was dependent was CRD-dependent (**Fig. 2B**). This induction was also temperature dependent (**Fig. 3A**). Increased expression of gal-7 inside the cells occurred in both cytosolic and mitochondrial compartments where gal-7 is normally found (**Fig. 3A, B**).

Endocytosis of extracellular gal-7.

Although our findings that intracellular gal-7 protein levels were increased following exposure to recombinant gal-7 were consistent with our results at the mRNA level, it was important to determine whether extracellular gal-7 was endocytosed and contributed to the intracellular pool of gal-7. To test this possibility, we repeated our experiments in absence or presence two well-known pharmacological inhibitors of endocytosis, Dynasore and Pitstop-2. Our results showed that preincubation of MDA-MB-231 cells with Pitstop-2 before addition of recombinant gal-7 reduced the expression of gal-7 protein inside the cells (**Fig. 4A, B**).

Similar results were obtained using the OVCAR-3 ovarian cancer cells (**Fig. 4C**).

To further study the entry of extracellular gal-7 inside the cells, we tagged recombinant gal-7 with FITC, allowing to follow the entry of gal-7 inside the cells using anti-FITC antibodies (**Fig. 5A**). Western blot analysis of cytosolic and mitochondrial extracts of MDA-MB-231 cells using anti-FITC antibodies confirmed the entry of extracellular FITC-tagged gal-7 in the cytosol and mitochondria (**Fig. 5B**). The entry of extracellular FITC-labeled gal-7 inside MDA-MB-231 cells was confirmed by confocal microscopy analysis (**Fig. 6**). Successive imaging using live confocal microscopy revealed that entry of gal-7 occurred within minutes following a multistep process initiated by the binding and aggregation of FITC-gal-7 at the membrane level followed by a progressive accumulation in the cytosol (**Fig. 7**).

Discussion

Our results suggest that extracellular gal-7 controls the intracellular pool of gal-7. It does so via two distinct yet complementary mechanisms: firstly by increasing the transcriptional activation of *lgals7* gene transcription, and secondly via carbohydrate-dependent re-entry into the cells. These

findings are of great importance in the design of gal-7 inhibitors for the treatment of various diseases where gal-7 plays a central role, most notably in cancer (Demers *et al.*, 2009, Grosset *et al.*, 2014, Labrie *et al.*, 2014). These findings suggest that targeting extracellular gal-7 using either CRD-specific inhibitors (Cumpstey *et al.*, 2005) or dimer-disrupting peptides (DIPs) (Vladoiu *et al.*, 2015) may be more efficient than expected for targeting intracellular gal-7-mediated interactions. Furthermore, our results showing that extracellular gal-7 induces *de novo lgals7* gene activation and our approach using FITC-tagged recombinant gal-7 to follow the fate of extracellular gal-7 inside the cells provide new and original *in vitro* model systems to investigate the inhibitory activity of these gal-7-specific inhibitors. They also provide a simple and reliable experimental platform to identify and study membrane receptors that bind extracellular gal-7.

Historically, galectins have been mostly known for their presence outside the cells following their release via a non-conventional pathway and their entry into the cells into endosomal compartments. This paradigm is based on solid experimental evidence obtained in studies that focused largely on gal-1 and gal-3. For example,

Lepur et al., have shown that gal-3 enter macrophage-like cells via early endosomes rapidly (within 5-10 min) and to non-degradative vesicles, where it remains detectable for at least 24 h (Lepur *et al.*, 2012). Such rapid re-entry of gal-3 inside cells has also been shown in cells of epithelial origin (Straube *et al.*, 2013). These findings with gal-1/3 together with our results with gal-7 support the idea that entry of extracellular galectins inside cells is possibly a common mechanism adopted by multiple members of the galectin family. The level of redundancy shared by the different members of the galectin family with regards to the identity of glycoreceptors involved and the intracellular trafficking pathways that mediate such re-entry into cells remains, however, to be established. Because galectins share common cell surface glycoreceptors, one could nevertheless expect that several galectins can re-enter via the same receptors. Our results with Dynasore and Pitstop-2, two small molecular weight inhibitors of endocytosis, further suggest that gal-7 enter cells via clathrin-mediated endocytosis, the major pathway that is responsible for internalization of cell surface glycoproteins in mammalian cells (McMahon *et al.*, 2011). Dynasore inhibits endocytic pathways by rapidly blocking coated vesicle formation via

its interaction with dynamin (Macia *et al.*, 2006) while Pitstop-2 is well known for its ability to inhibit clathrin-mediated endocytosis (von Kleist *et al.*, 2011). This seems to contrast with entry of gal-3 in epithelial cells, which has been reported to be independent of clathrin-coated pits (Straube *et al.*, 2013). Clathrin-coated endocytosis, however, is used by gal-1 for its entry into cells (Fajka-Boja *et al.*, 2008). This raises an interesting question: what happens in tissue expressing more than one extracellular galectin? Do they compete with each other for the same receptors/endocytic pathways? Do they have overlapping or competitive functions? This is a critical issue if one wants to inhibit the protumoral functions of galectins. We and others have already provided evidence that multiple galectins are expressed simultaneously in different tissues, most notably in prostate and breast cancer tissues (Compagno *et al.*, 2013, Grosset *et al.*, 2016, Laderach *et al.*, 2013).

The functions of endocytosed galectin-7 inside the cells remain unclear at present. However, because gal-7 can bind to bcl-2 (Grosset *et al.*, 2014, Villeneuve *et al.*, 2011), our data raise the interesting possibility that extracellular gal-7 regulates cell survival via its interaction with bcl-2 in the cytosol. This may explain why we do find

that endocytosed gal-7 reaches mitochondria as previously suggested by Villeneuve et al.. However, our preliminary attempts to reveal a physical interaction between endocytosed gal-7 and intracellular bcl-2 have been unsuccessful. To our knowledge, however, our results show for the first time that a galectin can re-enter cells to reach the mitochondrial compartment. Interestingly, the ability of gal-1 to re-enter breast cancer cells and to translocate to the nucleus has been recently shown to control cell invasiveness (Bhat *et al.*, 2016). Given the fact that galectins can be released by stromal cells, these results suggest that cancer cells may take advantage of extracellular galectins that are released by neighboring cells to ensure their own survival. This is a real possibility that is supported by previous findings showing that gal-7 can be expressed by stromal cells, including infiltrating T cells (Luo *et al.*, 2013). Such mechanism would be reminiscent of HMGB1, a protein that is normally located inside the cells but that is released via a non-classical mechanism in danger situation (Klune *et al.*, 2008, H. Wang *et al.*, 1999). Following its re-entry into cells, cytosolic HMGB1 triggers programmed cell death, possibly by interfering with beclin1-Bcl-2 complexes (D. Tang *et al.*, 2010, J. Xu *et al.*, 2014). Interestingly, galectins shows a

number of structural and functional similarities with HMGB1. In fact, galectins are increasingly recognized as alarmins, just like HMGB1 (Mishra *et al.*, 2013b, Steichen *et al.*, 2015, Than *et al.*, 2015). These issues are currently being investigated.

Acknowledgements. This study was supported by the National Science and Engineering Research Council of Canada (Grant No. 298215-2013). The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The authors wish to thank Dr. E. Asselin for providing cell lines. They also thank M. Jesse Tremblay for his expert technical advice.

References:

1. Fred Brewer C Binding and cross-linking properties of galectins. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1572: 255-62.
2. Grigorian A, Torossian S, Demetriou M T-cell growth, cell surface organization, and the galectin-glycoprotein lattice. *Immunol Rev*. 2009;230: 232-46.
3. Nabi IR, Shankar J, Dennis JW The galectin lattice at a glance. *J Cell Sci*. 2015;128: 2213-9.
4. Vladoiu MC, Labrie M, St-Pierre Y Intracellular galectins in cancer cells: potential new targets for therapy (Review). *Int J Oncol*. 2014;44: 1001-14.
5. Kim HJ, Jeon HK, Lee JK, Sung CO, Do IG, et al. Clinical significance of galectin-7 in epithelial ovarian cancer. *Anticancer Res*. 2013;33: 1555-61.
6. Grosset AA, Labrie M, Gagne D, Vladoiu MC, Gaboury L, et al. Cytosolic galectin-7 impairs p53 functions and induces chemoresistance in breast cancer cells. *BMC Cancer*. 2014;14: 801.
7. Labrie M, Vladoiu MC, Grosset AA, Gaboury L, St-Pierre Y Expression and functions of galectin-7 in ovarian cancer. *Oncotarget*. 2014;5: 7705-21.
8. Champion CG, Labrie M, Lavoie G, St-Pierre Y Expression of galectin-7 is induced in breast cancer cells by mutant p53. *PLoS One*. 2013;8: e72468.
9. Demers M, Couillard J, Giglia-Mari G, Magnaldo T, St-Pierre Y Increased galectin-7 gene expression in lymphoma cells is under the control of DNA methylation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;387: 425-9.
10. Champion CG, Labrie M, Grosset AA, St-Pierre Y The CCAAT/enhancer-binding protein beta-2 isoform (CEBPbeta-2) upregulates galectin-7 expression in human breast cancer cells. *PLoS One*. 2014;9: e95087.
11. Lepur A, Carlsson MC, Novak R, Dumic J, Nilsson UJ, et al. Galectin-3 endocytosis by carbohydrate independent and dependent pathways in different macrophage like cell types. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820: 804-18.
12. Schneider D, Greb C, Koch A, Straube T, Elli A, et al. Trafficking of galectin-3 through endosomal organelles of polarized and non-polarized cells. *Eur J Cell Biol*. 2010;89: 788-98.
13. Vladoiu MC, Labrie M, Letourneau M, Egesborg P, Gagne D, et al. Design of a

- peptidic inhibitor that targets the dimer interface of a prototypic galectin. *Oncotarget*. 2015;6: 40970-80.
14. Cumpstey I, Carlsson S, Leffler H, Nilsson UJ Synthesis of a phenyl thio-beta-D-galactopyranoside library from 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene: discovery of efficient and selective monosaccharide inhibitors of galectin-7. *Org Biomol Chem*. 2005;3: 1922-32.
 15. Straube T, von Mach T, Honig E, Greb C, Schneider D, et al. pH-dependent recycling of galectin-3 at the apical membrane of epithelial cells. *Traffic*. 2013;14: 1014-27.
 16. McMahon HT, Boucrot E Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12: 517-33.
 17. Macia E, Ehrlich M, Massol R, Boucrot E, Brunner C, et al. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell*. 2006;10: 839-50.
 18. von Kleist L, Stahlschmidt W, Bulut H, Gromova K, Puchkov D, et al. Role of the clathrin terminal domain in regulating coated pit dynamics revealed by small molecule inhibition. *Cell*. 2011;146: 471-84.
 19. Fajka-Boja R, Blasko A, Kovacs-Solyom F, Szebeni GJ, Toth GK, et al. Co-localization of galectin-1 with GM1 ganglioside in the course of its clathrin- and raft-dependent endocytosis. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65: 2586-93.
 20. Grosset AA, Labrie M, Vladoiu MC, Yousef EM, Gaboury L, et al. Galectin signatures contribute to the heterogeneity of breast cancer and provide new prognostic information and therapeutic targets. *Oncotarget*. 2016;7: 18183-203.
 21. Compagno D, Laderach DJ, Gentilini L, Jaworski FM, Rabinovich GA Delineating the "galectin signature" of the tumor microenvironment. *Oncoimmunology*. 2013;2: e23565.
 22. Laderach DJ, Gentilini L, Jaworski FM, Compagno D Galectins as new prognostic markers and potential therapeutic targets for advanced prostate cancers. *Prostate Cancer*. 2013;2013: 519436.
 23. Villeneuve C, Baricault L, Canelle L, Barboule N, Racca C, et al. Mitochondrial proteomic approach reveals galectin-7 as a novel BCL-2 binding protein in human cells. *Mol Biol Cell*. 2011;22: 999-1013.
 24. Bhat R, Belardi B, Mori H, Kuo P, Tam A, et al. Nuclear repartitioning of galectin-1 by an extracellular glycan

- switch regulates mammary morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113: E4820-7.
25. Luo Z, Ji Y, Zhou H, Huang X, Fang J, et al. Galectin-7 in cardiac allografts in mice: increased expression compared with isografts and localization in infiltrating lymphocytes and vascular endothelial cells. *Transplant Proc*. 2013;45: 630-4.
26. Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*. 1999;285: 248-51.
27. Klune JR, Dhupar R, Cardinal J, Billiar TR, Tsung A HMGB1: endogenous danger signaling. *Mol Med*. 2008;14: 476-84.
28. Tang D, Kang R, Livesey KM, Cheh CW, Farkas A, et al. Endogenous HMGB1 regulates autophagy. *J Cell Biol*. 2010;190: 881-92.
29. Xu J, Jiang Y, Wang J, Shi X, Liu Q, et al. Macrophage endocytosis of high-mobility group box 1 triggers pyroptosis. *Cell Death Differ*. 2014;21: 1229-39.
30. Mishra BB, Li Q, Steichen AL, Binstock BJ, Metzger DW, et al. Galectin-3 functions as an alarmin: pathogenic role for sepsis development in murine respiratory tularemia. *PLoS One*. 2013;8: e59616.
31. Steichen AL, Simonson TJ, Salmon SL, Metzger DW, Mishra BB, et al. Alarmin function of galectin-9 in murine respiratory tularemia. *PLoS One*. 2015;10: e0123573.
32. Than NG, Romero R, Balogh A, Karpati E, Mastrolia SA, et al. Galectins: Double-edged Swords in the Cross-roads of Pregnancy Complications and Female Reproductive Tract Inflammation and Neoplasia. *J Pathol Transl Med*. 2015;49: 181-208.

Figure legends:

Figure 1: Increase mRNA levels of human gal-7 in cancer cells following stimulation with human recombinant galectin-7 (rhGal-7). (A) Levels of transcripts were measured by RT-PCR 16 h after addition of rhGal-7. (B) Kinetic analysis of *lgals7* mRNA expression induced by rhGal-7 (5 μ M) in OVCAR and A2780 cells. (C) mRNA level of *lgals7* in MDA-MB-231 cells after treatment with rhGal-7. (D) Quantitative analyses of *lgals7* mRNA levels in MDA-MB-231 as measured by imaging densitometry. Data are representative of at least three independent experiments. (* $p \leq 0.05$). (E) Luciferase activity measured in protein extracts collected from MDA-MB-231 cells transfected with a luciferase reporter vector containing *p200-gal7* promoter following treatment with rhGal-7 (** $p \leq 0.005$).

Figure 2: Induction of galectin-7 in MDA-MB-231 cells is CRD-dependent. (A) Expression of galectin-7 was measured by Western blot at different times following stimulation with rhGal-7. (B) Induction of galectin-7 by wild-type and mutant rhGal-7 as measured at 5 and 15 min post-stimulation.

Figure 3: Mitochondrial localization of galectin-7. (A) Western blot analysis in MDA-MB-231 cells showing expression of cytosolic and mitochondrial galectin-7 15 min after stimulation with rhGal-7 at 0°C or 37°C. Tubulin and CoxIV were used as controls for cytosolic and mitochondrial extracts respectively. (B) Quantitative analyses by imaging densitometry of data shown in (A).

Figure 4: Inhibition of internalization of galectin-7. (A) Western blot analysis showing expression of intracellular galectin-7 protein expression in MDA-MB-231 cells following treatment (15 min) with rhGal-7 (5 μ M) in absence or presence of Pitstop-2 (30 μ M). (B) Western blot analysis showing expression of cytosolic or mitochondrial gal-7 protein in absence or presence of Pitstop-2 and rhGal-7 (5 μ M) following a 15 min treatment of MDA-MB-231 cells. Tubulin and CoxIV were used as controls for cytosolic and mitochondrial extracts. (C) Western blot analysis of cell lysates collected from OVCAR-3 cells showing expression of intracellular galectin-7 following a 15 min treatment

with rhGal-7 (5 μ M) in absence or presence of Pitstop-2 (30 μ M) or Dynasore (30 μ M). Actin was used as a loading and specificity control for (A) and (C) experiments.

Figure 5: Western blot analysis showing endocytosis of FITC-labeled galectin-7. (A) Western blot analysis of cell lysates collected from MDA-MB-231 cells treated with rh-Gal-7 or FITC-rhGal-7 (15 min. post-treatment) (B) Expression of cytosolic or mitochondrial galectin-7 following treatment with rhGal-7 or FITC-rhGal-7 (15 min. post-treatment).

Figure 6: Endocytosis FITC-labeled galectin-7 viewed by confocal microscopy. (A) Confocal microscopy of MDA-MB-231 cells treated with FITC-rhGal-7 (b) during 25 minutes. Staining with DAPI (a) and WGA (c) which target the nucleus and plasma membrane respectively. (e) and (f) show cross sections of the cell. (B) Confocal microscopy of 3D sections of the cell (a). In (b), multiple cross sections in the thickness of the cell. (C) Confocal microscopy of internalization of FITC-rhGal-7. Picture at each 15 seconds. (T0: 0 sec; T1-T5: 210 at 270 sec).

Fig.1

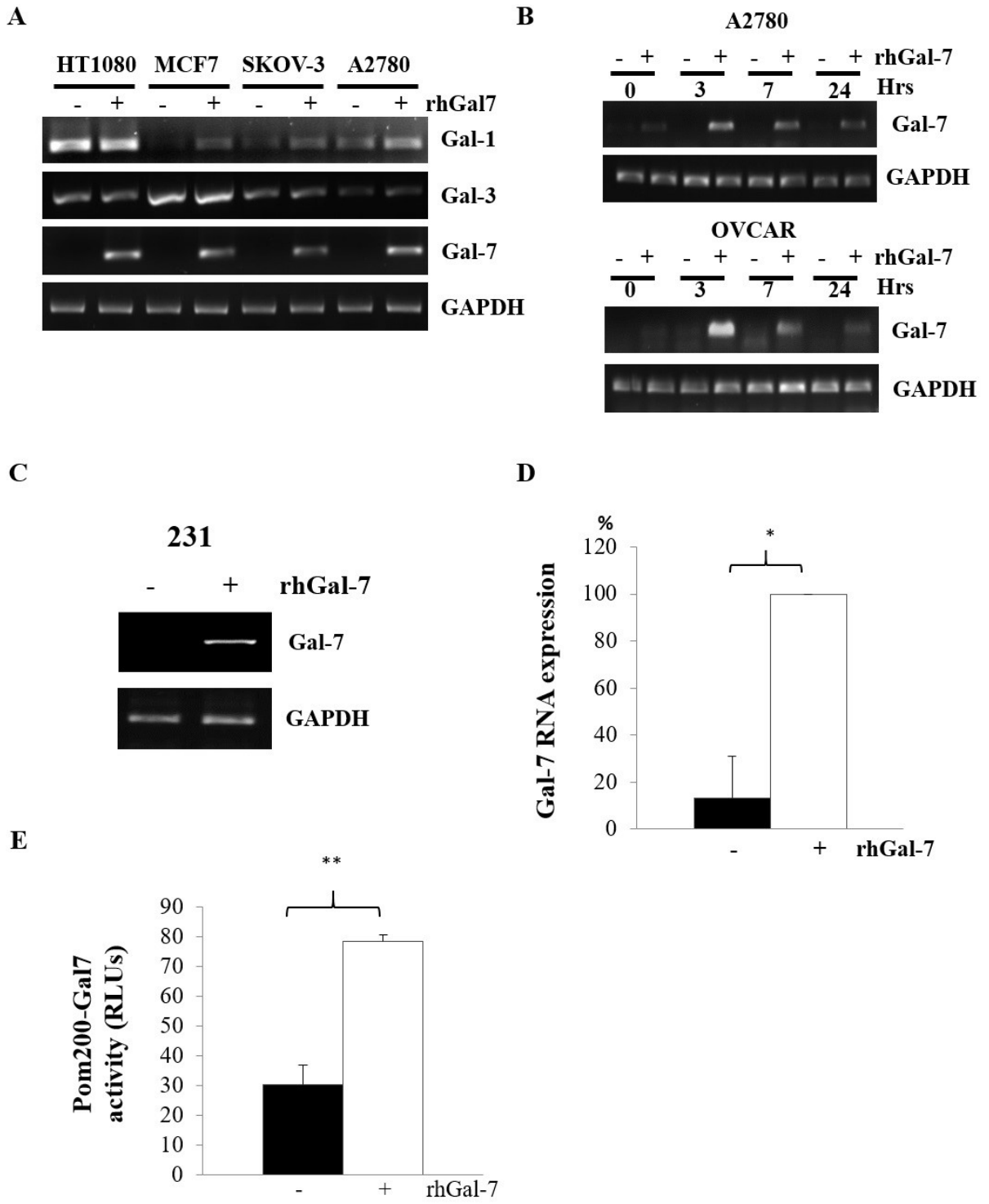
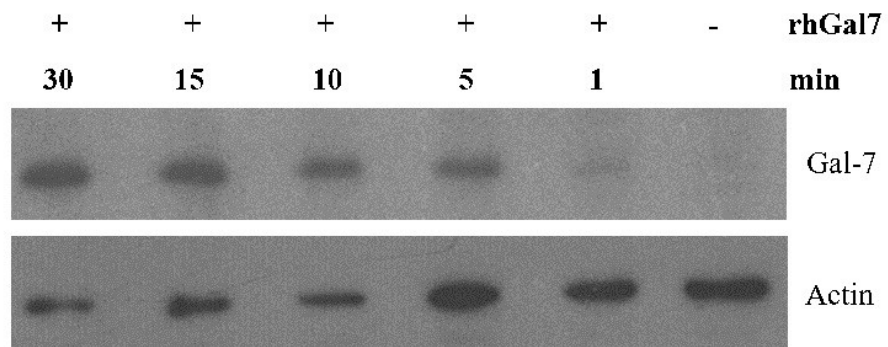
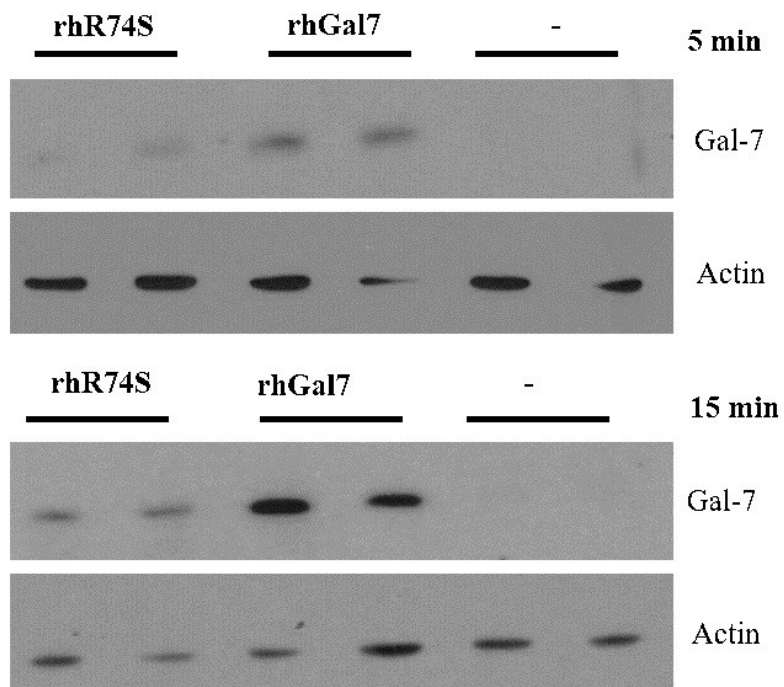


Fig.2

A



B



C

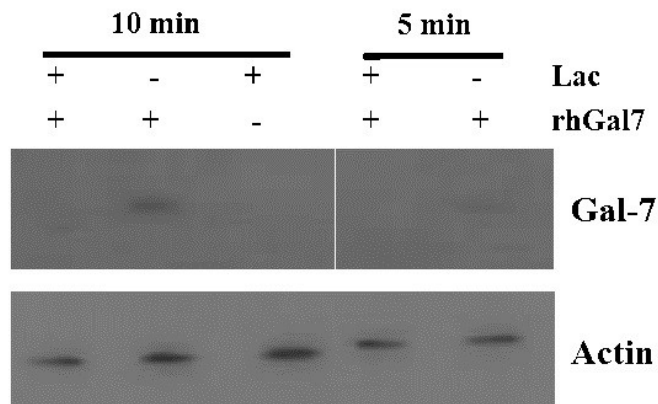
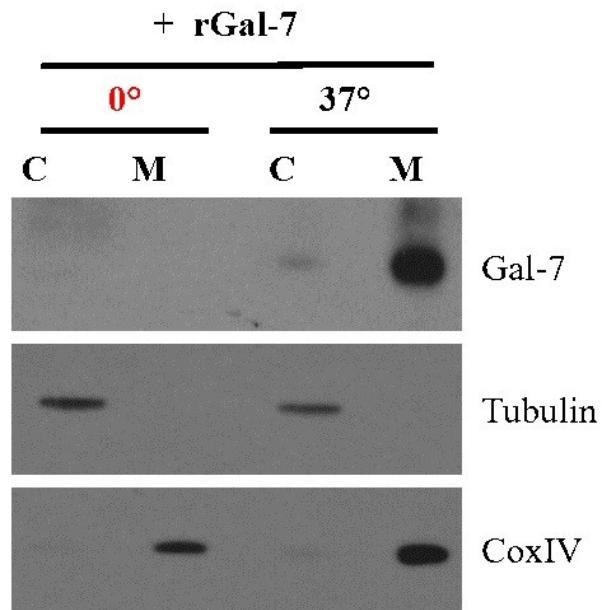


Fig.3

A



B

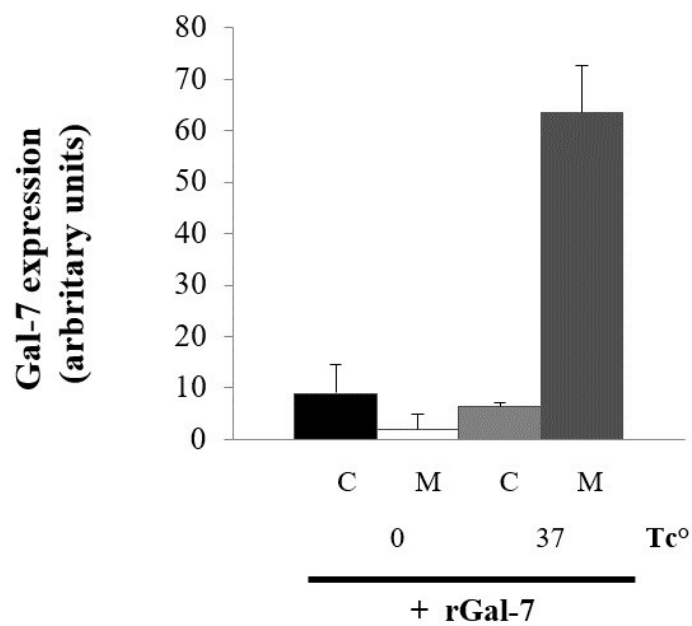
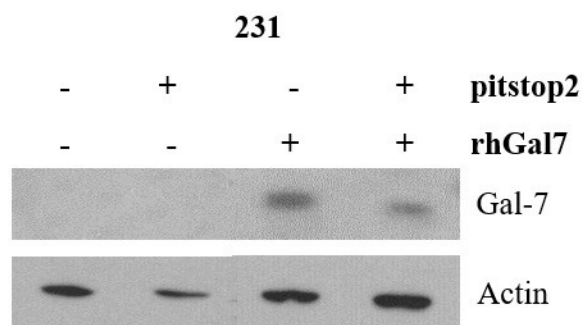
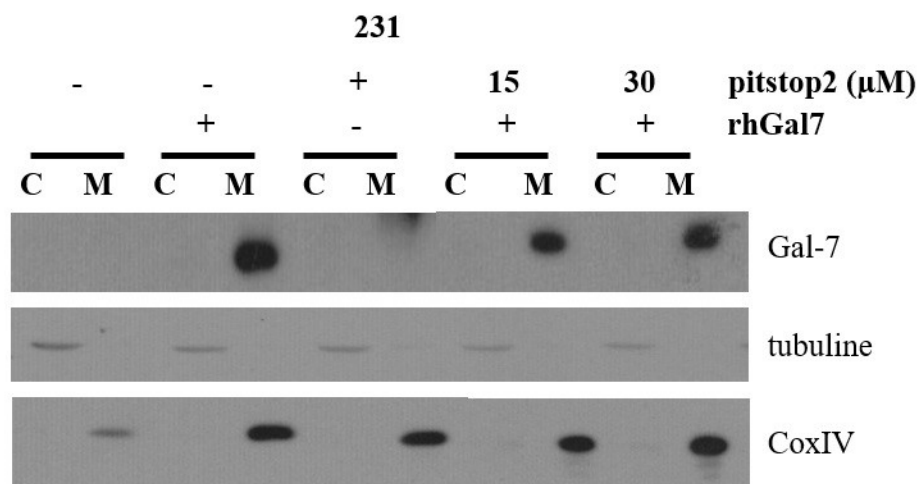


Fig.4

A



B



C

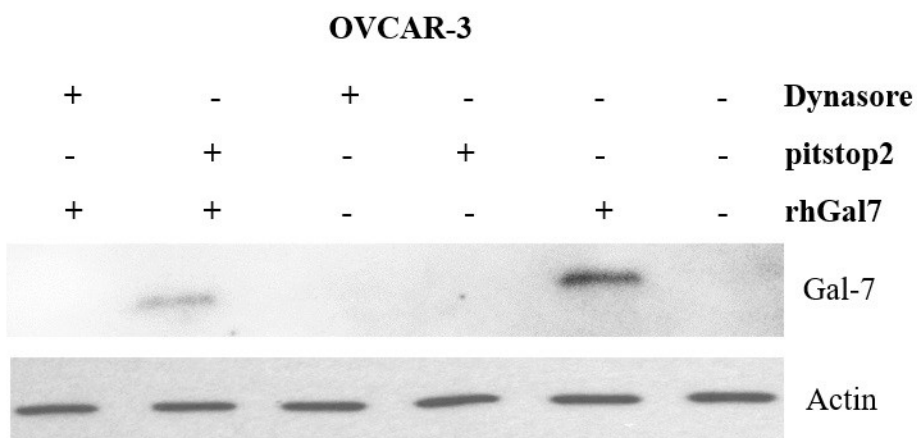
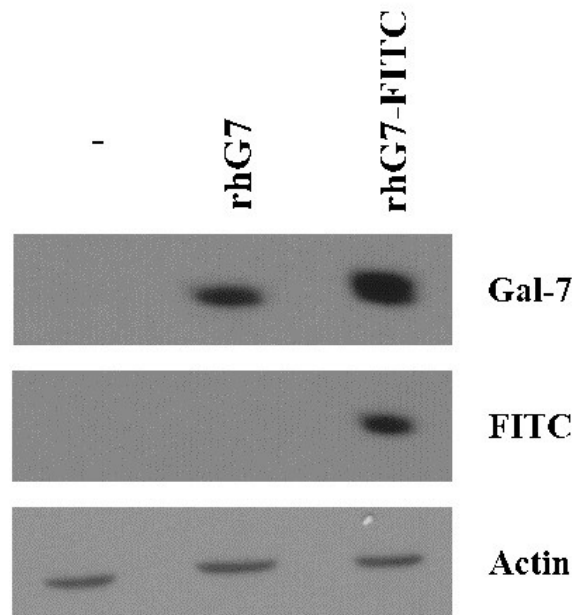


Fig.5

A



B

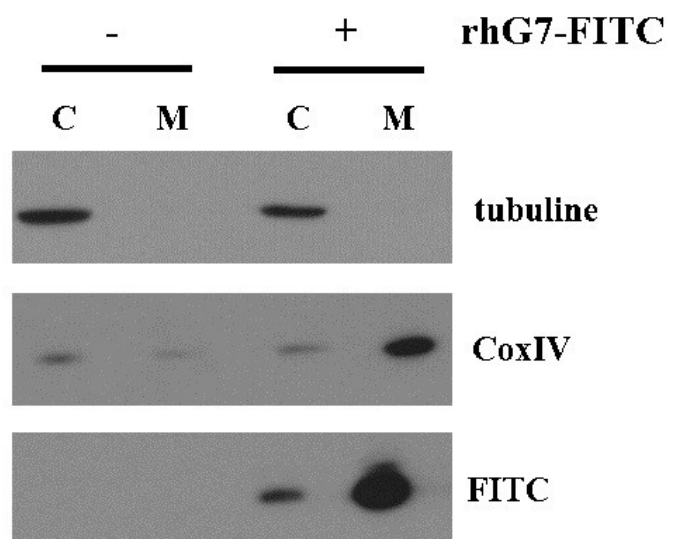
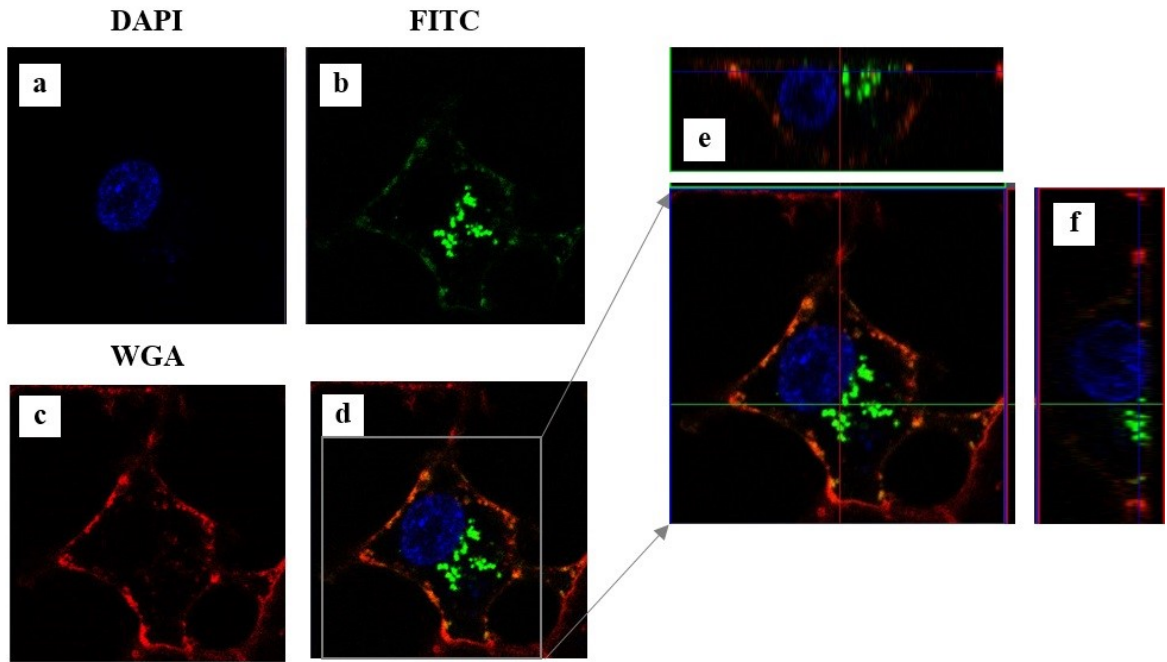
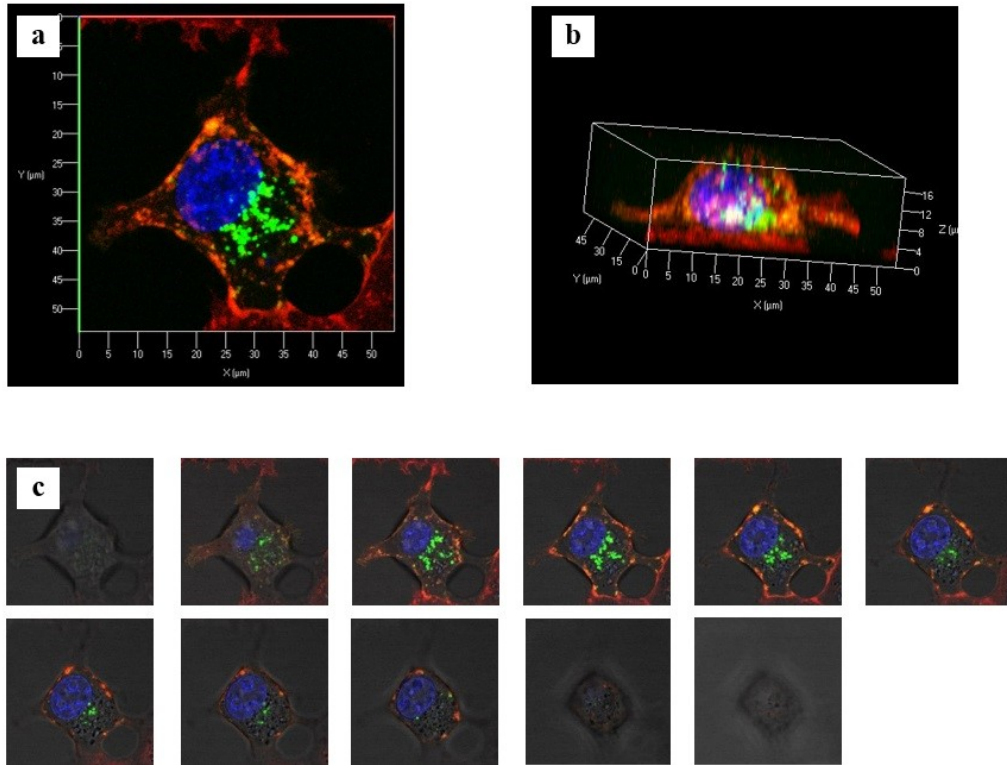


Fig.6

A



B



C

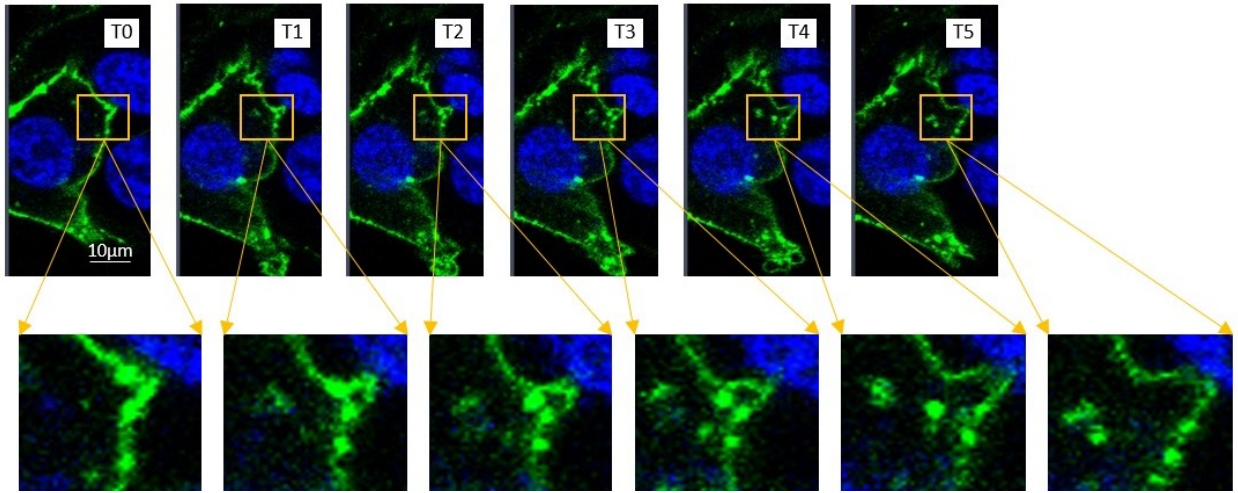
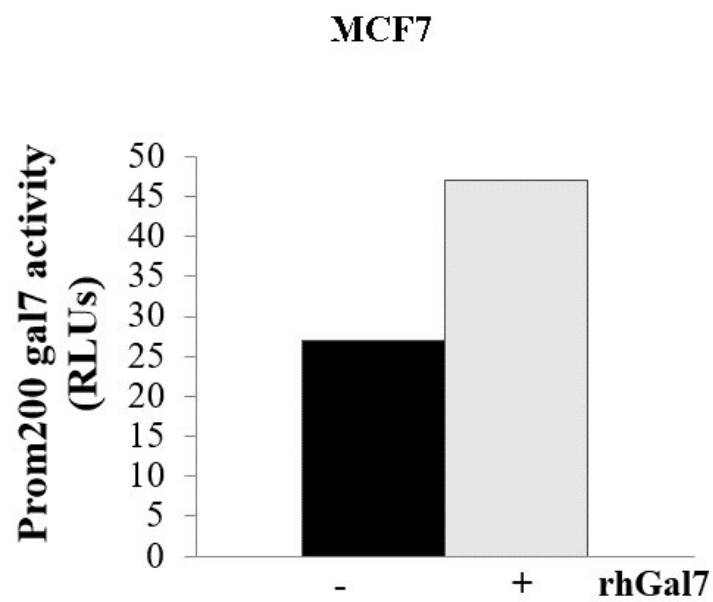
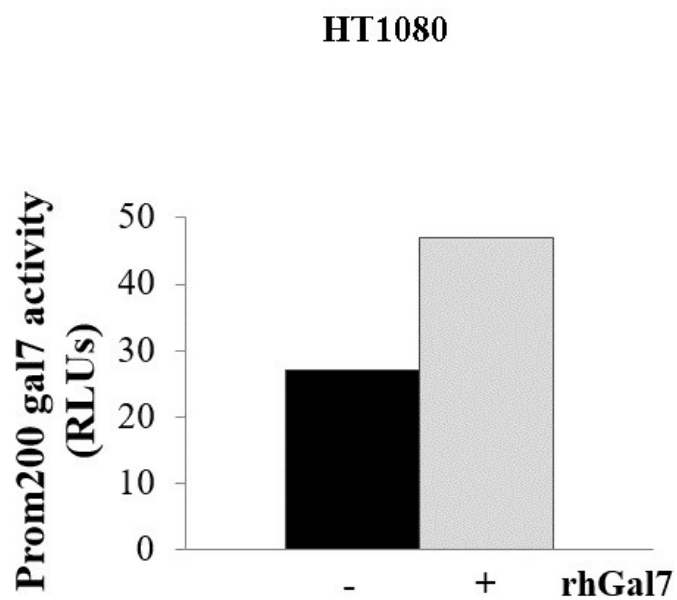


Figure S1

A



B



CHAPITRE 4 :

Discussion générale

Le développement tumoral ne se limite pas à une simple multiplication anarchique et incontrôlée de cellules malignes, mais dépend également de nombreuses interactions cellules-cellules et cellules-matrice. Ces interactions sont non seulement nécessaires à l'invasion des cellules néoplasiques, mais aussi à leur prolifération ainsi qu'à toutes les étapes de la tumorigenèse, dont l'enclenchement de l'angiogenèse qui favorise la croissance tumorale et correspond également à la porte d'entrée vers la dissémination métastatique. Il est donc évident que les modifications de la MEC et du profil de glycosylation des cellules malignes jouent un rôle central dans la progression néoplasique. Aujourd'hui, de nombreuses études démontrent l'importance des gènes pro-métastatiques *mmp-9* et *lgals-7* tout au long de la progression tumorale (Farina *et al.*, 2014, Kaur *et al.*, 2016).

Plusieurs dizaines de milliers d'articles scientifiques ont été consacrés aux multiples rôles physiologiques et pathologiques de MMP-9 dans les processus biologiques. Initialement reconnue pour son implication dans la dégradation et la restructuration de la MEC, et plus particulièrement dans l'hydrolyse du collagène de type IV de la membrane basale, MMP-9 a rapidement été associée à l'invasion tumorale. Toutefois, les études ont démontré que son rôle dans la progression tumorale est plus complexe que celui de seulement dégrader les composants de la MEC. Aujourd'hui, la grande majorité des études portant sur la MMP-9 focalisent sur ses aptitudes pro-tumorales et plus particulièrement pro-métastatiques. Bien que les voies inductrices de la MMP-9 soient relativement bien documentées, les mécanismes moléculaires responsables de son inhibition restent encore peu connus. Or, il est clair que le contrôle spécifique de son expression est une avenue thérapeutique à ne pas négliger. Encore récemment, une recherche témoigne de l'effet anti-tumoral de son inhibition dans le cancer du pancréas qui est l'un des plus mortel (N. Yang *et al.*, 2016).

Bien que la découverte de la galectine-7 soit beaucoup plus récente que celle de MMP-9, son expression spécifique aux épithéliums stratifiés ainsi que son rôle dans les interactions cellules-cellules et cellules-matrice ont rapidement suscité un intérêt particulier pour son implication dans les cancers d'origine épithéliale. Seulement une centaine d'articles porte actuellement sur la galectine-7, malgré tout, les études démontrent d'importantes altérations de son expression dans de nombreux cancers notamment dans les formes agressives de cancer du sein et des ovaires, dans les cancers de la thyroïde, du pancréas ou bien encore dans les lymphomes (Demers *et al.*, 2007, Demers *et al.*, 2010, Labrie *et al.*, 2014, Moisan *et al.*, 2003, Takata *et al.*, 2012). Ces

quelques recherches ont également mis en évidence la dichotomie fonctionnelle intra et extra cellulaire de la galectine-7 qui peut, comme toutes les galectines, lui conférer des actions pro- ou anti-tumorales. Dans l'objectif de nouveaux traitements thérapeutiques mettant à profit ses fonctions anti-tumorales ou ciblant ses fonctions pro-tumorales, il est crucial de mieux déterminer les mécanismes qui régulent sa distribution dans les compartiments intra- et extracellulaires.

1. Identification d'un mécanisme moléculaire impliqué dans l'inhibition de MMP-9 via EGF/EGR-1.

Notre laboratoire a précédemment démontré par des techniques de co-cultures que l'expression anormalement élevée du facteur de croissance EGF par les cellules de lymphome T induit chez les cellules stromales une augmentation du facteur de transcription à réponse précoce/immédiate EGR-1, lui-même responsable de l'inhibition de l'expression de *mmp-9*. De même, des expériences *in vivo* chez des souris injectées de lymphome génétiquement modifiés pour surexprimer EGF ont permis d'observer une diminution de la croissance des lymphomes thymiques ainsi qu'une diminution de l'activité MMP-9 dans les cellules hôtes (Bouchard *et al.*, 2010). Toutefois, les intermédiaires moléculaires impliqués dans le contrôle de l'inhibition de MMP-9 par EGR-1 et EGF restent encore à être identifiés. Une revue de littérature nous avaient permis d'identifier plusieurs molécules susceptibles d'intervenir. Initialement, nous avons envisagé l'intervention de *Kiss-1*, un gène suppresseur de métastases et capable d'inhiber l'expression de MMP-9 dans le cancer de l'estomac (K. H. Lee *et al.*, 2009). Cependant, l'induction d'EGF ne nous a pas permis d'observer une quelconque augmentation transcriptionnelle de *Kiss-1* (*résultats non publiés*). Notre attention s'est alors dirigée vers la protéine BMP-4, un membre de la superfamille TGF β et dont l'interaction avec ses récepteurs hétérodimériques de type sérine/thréonine kinase active la voie classique de signalisation Smad1/5/8. Cette cytokine fut initialement reconnue pour son implication dans la croissance osseuse, la formation du mésoderme ainsi que dans la morphogenèse de la plaque neurale (Salazar *et al.*, 2016). Une fois sécrétée, celle-ci peut induire la prolifération et différenciation cellulaire, l'apoptose ou l'angiogenèse dépendamment du type cellulaire et de sa concentration dans le milieu (Hogan, 1996). Durant les dernières années, les recherches ont permis d'associer la régulation anormale de la BMP-4 à divers cancers, notamment en favorisant le cancer colorectal (J. Li *et al.*, 2012). La majorité des études démontrent que la BMP-4 favorise la migration, l'invasion et la transition épithélio mésenchymateuse. D'autres études avaient cependant

démontré qu'elle peut avoir des actions anti-tumorales en inhibant la croissance cellulaire (Kallioniemi, 2012). Récemment, une étude a mis en évidence sa capacité à inhiber la MMP-9 dans un contexte de maladies rétinienne (J. Xu *et al.*, 2012). Nous avons donc porté une attention particulière à BMP-4 et cherché à démontrer si effectivement ses propriétés anti-tumorales pourraient être reliées à son pouvoir inhibiteur de MMP-9. Dans notre étude, nous avons pu démontrer que l'induction d'EGF/EGR-1 module à la hausse l'expression de BMP-4 dans diverses lignées cellulaires et semble nécessaire à l'inhibition de la MMP-9 ainsi qu'au potentiel invasif des cellules. L'utilisation de gremlin, un inhibiteur naturel de BMP-4, nous a permis d'appuyer nos résultats. Aussi, l'observation d'une augmentation transcriptionnelle de MMP-9 en présence de gremlin seul, pourrait s'expliquer par l'inhibition du niveau endogène de BMP-4 ou encore par l'activation d'une voie de signalisation inductrice de MMP-9. Il a déjà été démontré qu'une induction de gremlin favorise l'expression de MMP-2 dans les cellules rétinienne humaines ART-19 (H. Lee *et al.*, 2007) et s'accompagne d'un gain d'expression de la protéine α -SRA (α -smooth muscle actin) ainsi que de la perte de la protéine de jonction ZO-1 (zonula occludens-1) qui sont deux marqueurs protéiques caractéristiques de la EMT. La MMP-2 comme la MMP-9 sont reconnues pour leurs implications dans la EMT, entre autres pour leur aptitude à dégrader ZO-1 (Feng *et al.*, 2011, M. P. Kim *et al.*, 2015). Selon nos résultats, l'inhibition du niveau basal de BMP-4 par gremlin pourrait aussi expliquer l'EMT et la perte de ZO-1 par une augmentation de l'expression de MMP-9.

Nos résultats suggèrent également une régulation transcriptionnelle de MMP-9 par BMP-4. Nf- κ B est l'un des facteurs transcriptionnels clés dans l'induction de la MMP-9 via une variété de cytokines pro-inflammatoires (Watari *et al.*, 1999). Toutefois, la stimulation BMP-4 des cellules HT1080 exprimant le vecteur rapporteur luciférase Nf- κ B ne semble pas moduler son activité, ce qui suggère que l'inhibition par BMP-4 est indépendante de Nf- κ B (**Annexe 1**). D'autres études seront néanmoins nécessaires afin de déterminer avec exactitude si l'inhibition EGF/BMP-4 nécessite une modulation du facteur transcriptionnel Nf- κ B. Entre autres, Ogawa et son équipe ont pu démontrer que Nf- κ B peut aussi intervenir dans la répression de MMP-9 par la TGF β (Ogawa *et al.*, 2004). Des expériences par des essais de rétention sur gel (EMSA) visant à vérifier si BMP-4 module la fixation de Nf- κ B sur le promoteur de *mmp-9* pourraient être envisagées.

Étonnamment, nous avons observé que l'inhibition de MMP-9 par BMP-4 corrèle avec une augmentation de l'activité AP-1 (**Annexe 2**). Bien que le facteur de transcription AP-1 soit principalement considéré comme un régulateur positif de l'expression de MMP-9, Mittelstadt et ses collaborateurs ont démontré que la répression de l'expression de MMP-9 par l'interféron β (IFN β) est dépendante d'un site consensus d'AP-1 impliqué dans le recrutement de HDAC1 (histone déacétylase 1) sur le promoteur *mmp-9*. L'interaction entre le facteur de transcription AP-1 et HDAC conduit alors à la désacétylation des histones ainsi qu'à un recrutement moindre des activateurs Nf- κ B, SP-1 et p300 menant à une inhibition de l'activité transcriptionnelle de MMP-9 (Mittelstadt *et al.*, 2012). Ce mécanisme d'inhibition de MMP-9 par AP-1 pourrait expliquer l'effet répressif de BMP-4 sur MMP-9. Encore une fois, des études par EMSA ou par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) du promoteur *mmp-9* pourraient aider à résoudre ce mécanisme et nous permettre d'identifier précisément les divers acteurs transcriptionnels en cause.

Toutefois, nous avons pu déterminer par expression ectopique de Smad-6, que la voie de signalisation Smad1/5/8 participe, du moins en partie, à l'inhibition de MMP-9 par BMP-4. Dans une perspective à long terme, il serait important d'identifier les voies de signalisation empruntées pour la modulation de l'expression de MMP-9 par BMP-4. Ces informations seraient pertinentes pour l'utilisation de modulateurs pharmacologiques pour l'inhibition de MMP-9 dans une perspective thérapeutique. Entre autres, les stimulations BMPs peuvent aussi impliquer des voies signalétiques tels que TAK1/TAB1 (TGF β Activated Kinase-1/ TAK1 Binding Protein 1) ou encore PKA (Protein Kinase-A) (S. He *et al.*, 2014, Shim *et al.*, 2009). De manière intéressante, la signalisation TAK1/TAB1 est reconnue pour contribuer à l'activation d'effecteurs clés tels que Nf- κ B et JNK (Jun N-terminal Kinase) deux activateurs reconnus de *mmp-9* (M. Tang *et al.*, 2008). Qui plus est, il a été démontré *in vivo* que l'activation de TAK1 est nécessaire à la cascade signalétique de Smad1/5/8 lors de la morphogenèse du cartilage (Shim *et al.*, 2009). L'utilisation d'inhibiteurs tels que le (5z)-7-oxozeaenol permettrait d'identifier si TAK1 contribue aussi à la répression MMP-9 par BMP-4. Si tel est le cas, nous pourrions également déterminer si cet effet est parallèle ou bien en amont de la voie des Smads. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques et de siRNA à l'encontre des différents intermédiaires potentiels de ces voies signalétiques permettrait

d'identifier avec précision les différents acteurs ainsi que leur chronologie d'action et ouvrirait des portes sur de possibles cibles thérapeutiques lors de cancers.

Bien que nous ayons démontré *in vitro* que BMP-4 est nécessaire à l'inhibition de MMP-9 par EGF/EGR-1, notre étude ne nous permet pas jusqu'à présent de confirmer un rôle suppresseur de BMP-4 dans la croissance tumorale *in vivo*. Malheureusement, les souris déficientes en BMP-4 ne sont pas viables dû à une mortalité embryonnaire rapide (Hogan, 1996). Toutefois, une mutagenèse dirigée de BMP-4 sous le contrôle Loxp/CRE pourrait sans doute aider à établir si BMP-4 exprimée par les cellules stromales joue un réel rôle physiologique dans la diminution de la croissance des lymphomes thymiques suite à une injection de lymphomes T surexprimant EGF. Alternativement, nous pourrions envisager l'utilisation de transfectants stables qui surexpriment BMP-4 et mesurer si cette surexpression diminue non seulement l'expression de MMP-9 dans l'environnement tumoral, mais aussi sur la croissance de la tumeur. Notre modèle de lymphome thymique que nous avons employé pour nos travaux antérieurs sur EGF/EGR-1 serait un modèle de choix pour ces études.

2. Identification des mécanismes régulant l'expression de la galectine-7

Étant donné la capacité de gal-7 à induire MMP-9 dans divers types de cancers, il est clair que la suppression de gal-7 représente une alternative valable pour contrer l'expression de MMP-9 lors de la progression tumorale. De précédentes études ont clairement démontré une forte expression intracellulaire constitutive de la galectine-7, notamment dans les cancers les plus agressifs du sein et des ovaires (Grosset *et al.*, 2014, Labrie *et al.*, 2014). Toutefois, les mécanismes moléculaires responsables d'une telle expression ne sont pas encore très bien connus. À présent, nous savons que l'action de certains facteurs de transcription peut moduler son expression. Par exemple, les formes mutantes de p53 peuvent induire gal-7 via un gain-de-fonctions impliquant Nf- κ B (Campion *et al.*, 2013). Il en est de même pour l'isoforme C/EBP2 qui provoque le déplacement de la forme transcriptionnellement inactive de Nf- κ B p50 du promoteur galectine-7 (Campion *et al.*, 2014). Depuis quelques années, il a été démontré que les galectines extracellulaires peuvent également pénétrer dans les cellules par endocytose, notamment pour la galectine-3 et -1 (Lepur *et al.*, 2012, Quinta *et al.*, 2016). Or, si nous voulons inhiber l'activité de galectine-7, il est essentiel de déterminer la relation entre les pools de gal-7 intra et extracellulaires. Or, dans notre

étude, nous avons pu démontrer que la présence extracellulaire de la galectine-7 est responsable de la modulation de son expression intracellulaire via deux mécanismes distincts : le premier via une activation transcriptionnelle autocrine et le second via une endocytose rapide de la forme extracellulaire. À notre connaissance, ces résultats démontrent pour la première fois qu'une galectine peut avoir un effet autocrine transcriptionnel. Cette induction transcriptionnelle semble spécifique puisque nous n'avons pas observé de modulation du niveau d'ARNm de la galectines-8 et 3, bien que nous ayons observé de façon anecdotique une légère modulation à la hausse des galectines-1 et 9 (**Annexe 3**). De plus, la présence extracellulaire de la galectine-1 n'a pas d'effet sur la transcription de la galectine-7 (**Annexe 4**). Puisque plusieurs galectines peuvent être exprimées dans un même tissu, la modulation transcriptionnelle d'une galectine pourrait donc influencer sa propre expression. La transcription de *nov* de *lgals7* pourrait expliquer, du moins en partie, l'expression constitutive intracellulaire de la protéine dans certains cancers. D'autre part, il est logique de croire qu'une partie du pool intracellulaire de gal-7 est générée par l'endocytose de gal-7 extracellulaire. Ce mécanisme n'est pas unique à gal-7 mais partagé par plusieurs autres galectines. Par exemple, l'internalisation de la galectine-3 par endocytose a été décrite par Schneider et ses collaborateurs, ils ont démontré qu'elle participe à une boucle de recyclage des récepteurs membranaires via des compartiments vésiculaires non cytosoliques (Schneider *et al.*, 2010). Deux ans plus tard, une étude révéla que l'endocytose de la galectine-3 pouvait se faire de manière CRD-dépendante ou indépendante selon le type cellulaire (Lepur *et al.*, 2012). Plus précisément, l'utilisation du mutant CRD R186S, la compétition avec du lactose et l'utilisation d'inhibiteur de la galectine-3 leurs permirent d'observer et d'analyser l'endocytose de la galectine-3 par microscopie fluorescente et cytométrie en flux. Ils conclurent que l'endocytose chez les macrophages M1 est CRD-dépendante alors que son internalisation par les macrophages M2, les cellules SKBR3 de cancer du sein et les fibroblastes HFL1 est indépendante de son CRD. Dans le cas de gal-7, nous avons pu déterminer que la galectine-7 extracellulaire peut être internalisée par plusieurs lignées cellulaires via une endocytose rapide (5 min) et ceci de manière dépendante du CRD. En premier lieu, nous avons confirmé l'endocytose en bloquant les mouvements membranaires cellulaires par une incubation à 0°C comparativement à des conditions classiques à 37°C. L'utilisation d'inhibiteurs de l'endocytose Pitstop2 et Dynasore ont ensuite consolidé nos précédents résultats par une nette diminution de la présence intracellulaire de la galectine-7. Aussi, l'utilisation de la recombinante mutante du CRD R74S

(un mutant similaire à la mutation R186S de galectine-3) ainsi que la saturation du CRD au lactose (**Annexe 5**) nous ont permis de caractériser l'endocytose de la galectine-7 comme étant CRD dépendante dans divers types cellulaires. Il serait néanmoins intéressant de vérifier si l'internalisation de la galectine-7 par les SKBR3 est CRD-dépendante, ce qui démontrerait une internalisation différente de la galectine-3 et -7 dans cette même lignée cellulaire.

L'importance physiologique de l'endocytose de galectine-7 reste à établir. Des études avec d'autres membres des galectines permettent toutefois de soulever quelques hypothèses. Par exemple, des études sur la galectine-4 ont démontré que la liaison de celle-ci sur les récepteurs glycosylés peut induire leur internalisation, contribuant ainsi au recyclage apical des récepteurs transferrine des cellules épithéliales polarisées (Perez Bay *et al.*, 2014). Lepur et ses collègues ont quant à eux démontré que la galectine-3 endocytosée dans les macrophages migre vers des compartiments endosomaux et quelle pouvait y rester de façon stable pendant au moins 24 h (Lepur *et al.*, 2012). Dans le cas de nos études, nous avons mis en évidence une distribution cytosolique et mitochondriale dans nos cellules épithéliales. Cette distribution laisse présager la possibilité que la galectine-7 endocytosée puisse interagir avec Bcl-2, un ligand intracellulaire de la galectine-7 (Villeneuve *et al.*, 2011). Des expériences de co-localisation et de co-immunoprécipitation pourront permettre de confirmer si effectivement les deux protéines se retrouvent dans des complexes communs et si elles interagissent physiquement. Des études structures-fonctions devront toutefois être réalisées pour identifier les acides aminés de la galectine-7 et Bcl-2 impliqués dans leur interaction. Ce qui facilitera la génération de transfectants stables exprimant des formes mutantes de ces protéines afin de déterminer si effectivement la galectine-7 endocytosée peut moduler la voie Bcl-2 et de déterminer si la galectine-7 synthétisée *de novo* participe aussi à cette interaction. Nous devons également déterminer quelles sont les contributions de la galectine-7 endocytosée et celle synthétisée *de novo* dans le pool intracellulaire. L'utilisation de la recombinante galectine-7 marquée en microscopie confocale offre de multiples opportunités, entre autres, la perméabilisation des cellules combinée à l'utilisation d'anticorps spécifiques anti-Tag versus les anti-galectin-7, devrait nous permettre de les différencier. Cette différenciation est cruciale puisque les galectines sont reconnues pour leur ambivalence fonctionnelle pro ou anti-tumorale dépendamment de leur compartimentation. L'information obtenue sera également cruciale pour déterminer si des

inhibiteurs de galectine-7 extracellulaires peuvent être efficaces à réduire le pool de galectine-7 intracellulaire et sa fonction possible via Bcl-2. De plus, il est crucial de prendre en considération les possibles effets combinatoires des multiples galectines qui sont présentes dans le MET. Entre autres, certains de nos résultats préliminaires semblent démontrer que la stimulation extracellulaire des cellules A2780 par une combinaison de la galectine-7 et galectine-9 augmente considérablement l'induction transcriptionnelle de la galectine-7, alors que cet effet n'est pas observable pour la combinaison avec la galectine-1 (**Annexe 6**). Aussi, une étude récente de notre laboratoire et pu démontrer que certaines galectines peuvent avoir une dominance phénotypique sur d'autres. Entre autres, l'expression de la galectine-8 nucléaire chez les patients atteints d'un cancer du sein triple négatif corrèle avec un meilleur taux de survie et domine sur la co-expression nucléaire de la galectine-1 qui normalement, en absence de galectine-8, est plutôt un marqueur de faible taux de survie (Grosset *et al.*, 2016). Il est donc crucial d'identifier les divers effets combinatoires des galectines sur leur propre transcription et expression cytoplasmique selon le type de cancer, leur localisation et le galectinome du MET.

3. Implication de l'ensemble de ces résultats sur la progression tumorale

Étonnamment, nous avons pu constater la répression de la MMP-9 par BMP-4 dans chacune des lignées cellulaires dont les fibrosarcomes HT1080 et diverses lignées de cancer du sein (MDA-MB-231, MDA-MB-468, MCF-7). Aussi, nous avons été surpris de constater que la répression transcriptionnelle de MMP-9 par BMP-4 semble corrélérer avec une inhibition transcriptionnelle de la galectine-7 dans les cellules MDA-MB-468 (**Annexe 7**). Il est donc logique de supposer que la répression de la galectine-7 par BMP-4 est nécessaire à la répression subséquente de la MMP-9 chez les MDA-MB-468. Alternativement, il est possible que la BMP-4 agisse distinctement sur la répression des deux gènes pro-métastatiques ? Il est néanmoins clair que la répression de MMP-9 par BMP-4 peut se réaliser sans galectine-7 puisque nous avons observé cette inhibition dans plusieurs lignées cellulaires galectine-7-négatives. Nonobstant ces possibilités, il apparaît intéressant de poursuivre les études sur le potentiel de BMP-4 et des inhibiteurs de galectine-7 afin de freiner la progression tumorale. Les études récentes de notre groupe sur le développement de nouveaux inhibiteurs de galectine-7 pourraient être utiles pour évaluer cette stratégie. Il sera également intéressant de poursuivre les études sur des relations fonctionnelles entre BMP-4 et les autres membres de la famille des galectines. Dans la littérature, peu d'études soulèvent une

relation entre la BMP-4 et l'une des galectines. Toutefois, Calvier et son équipe ont pu démontrer que les souris déficientes en galectine-3 présentent une nette augmentation transcriptionnelle de BMP-4 (Calvier *et al.*, 2013). De même, Tanikawa et ses collaborateurs ont rapporté que la galectine-9 permet l'activation des Smad1/5/8 et la translocation de Smad4 au noyau en absence de stimulation BMP (Tanikawa *et al.*, 2010). Ces rares observations combinées à nos résultats préliminaires nous laissent entrevoir une possible relation fonctionnelle entre la BMP-4 et certaines galectines, de bien plus amples investigations devront être effectuées.

Conclusion générale

Ces résultats apportent de nouvelles informations sur la régulation répressive de la MMP-9. Nous avons pu démontrer que l'inhibition de son expression par EGF nécessite l'expression de la protéine BMP-4 et l'activation de la voie des Smad1/5/8. Ainsi, un modèle de contrôle négatif de l'expression du gène pro-métastatique *mmp-9* peut être envisagé à la suite de ces recherches (**Figure 17**). De plus, nous avons pu observer une corrélation entre une diminution d'expression de la MMP-9 et une diminution transcriptionnelle du gène *lgals-7* dans les cellules MDA-MB-468. Ces résultats nous suggèrent une relation potentiellement plus étroite entre les familles des BMPs et des galectines.

Parallèlement, nous avons pour la première fois pu démontrer que la présence extracellulaire de la galectine-7 conduit à son induction transcriptionnelle autocrine. De manière distincte et complémentaire, la présence extracellulaire de la galectine-7 mène aussi rapidement à son internalisation cytosolique par endocytose, ceci de manière CRD dépendante (**Figure 17**). Ces deux mécanismes pourraient, du moins en partie, expliquer la surexpression de la galectine-7 dans certains types de cancers agressifs. Qui plus est, la localisation mitochondriale rapide de la galectine-7 endocytosée, nous laisse présager la possibilité d'une interaction avec la protéine anti-apoptotique Bcl-2 déjà reconnue pour être l'un de ses partenaires d'interaction.

Il semble donc prometteur de poursuivre des recherches sur le potentiel inhibiteur de BMP-4 auprès des deux gènes pro-métastatiques *mmp-9* et *lgals-7*. Entre autres, l'identification des divers acteurs moléculaires impliqués dans leurs inhibitions étant chacun autant de cibles thérapeutiques potentielles lors de cancers. Aussi, il apparaît clairement que de futures investigations sur les interactions possibles de la galectine-7 endocytosée, sa localisation ainsi que sur ses fonctions comparativement à son expression de *novo* et en fonction du galectinome, permettraient de mieux comprendre ses contributions dans la progression tumorale. De telles recherches pourraient, apporter des explications sur son ambiguïté fonctionnelle pro ou anti-tumorale.

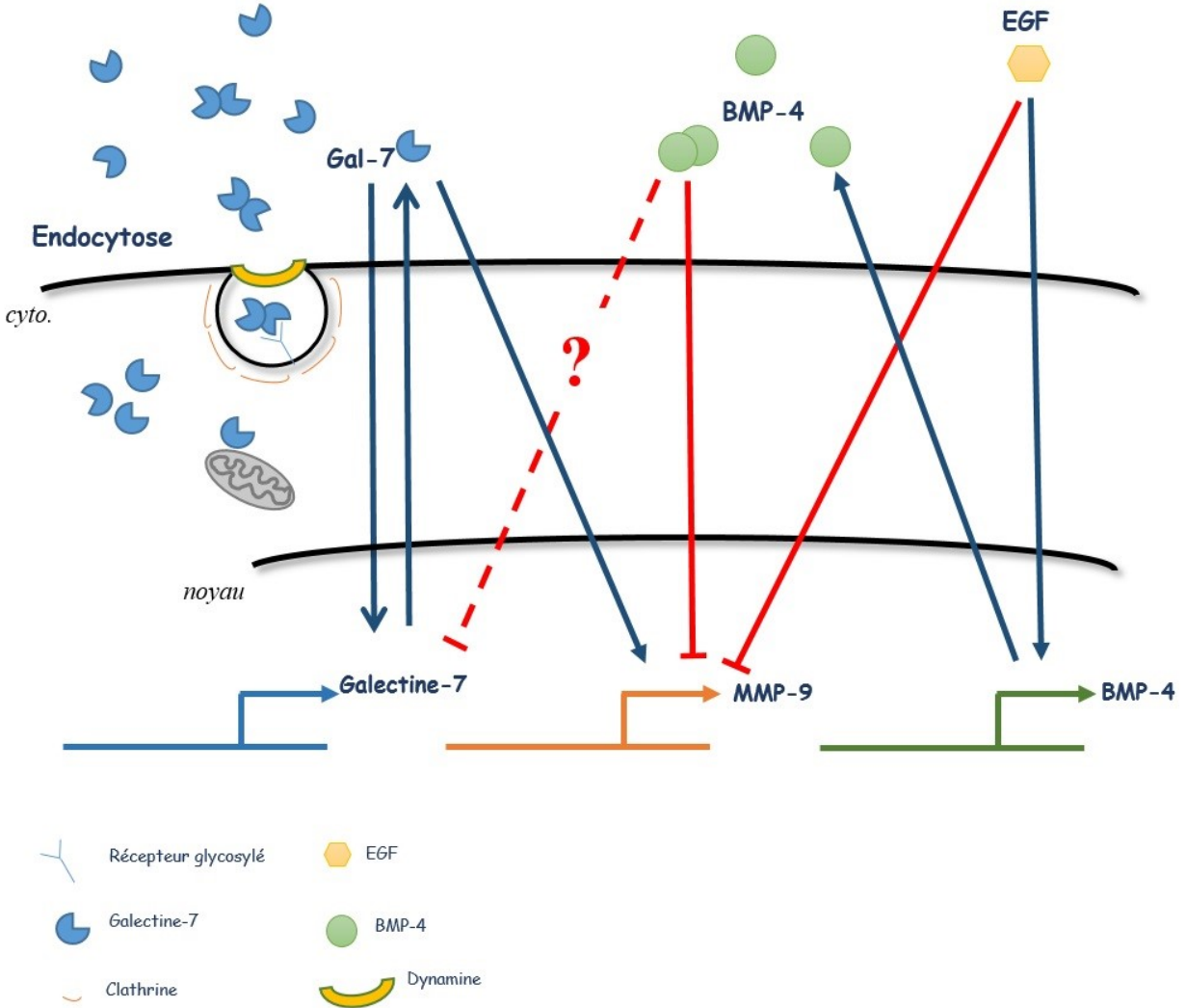
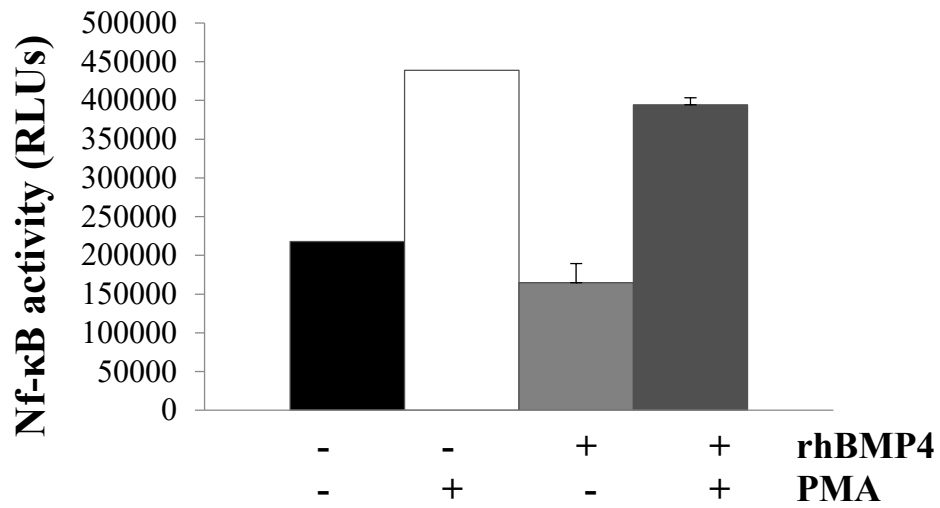
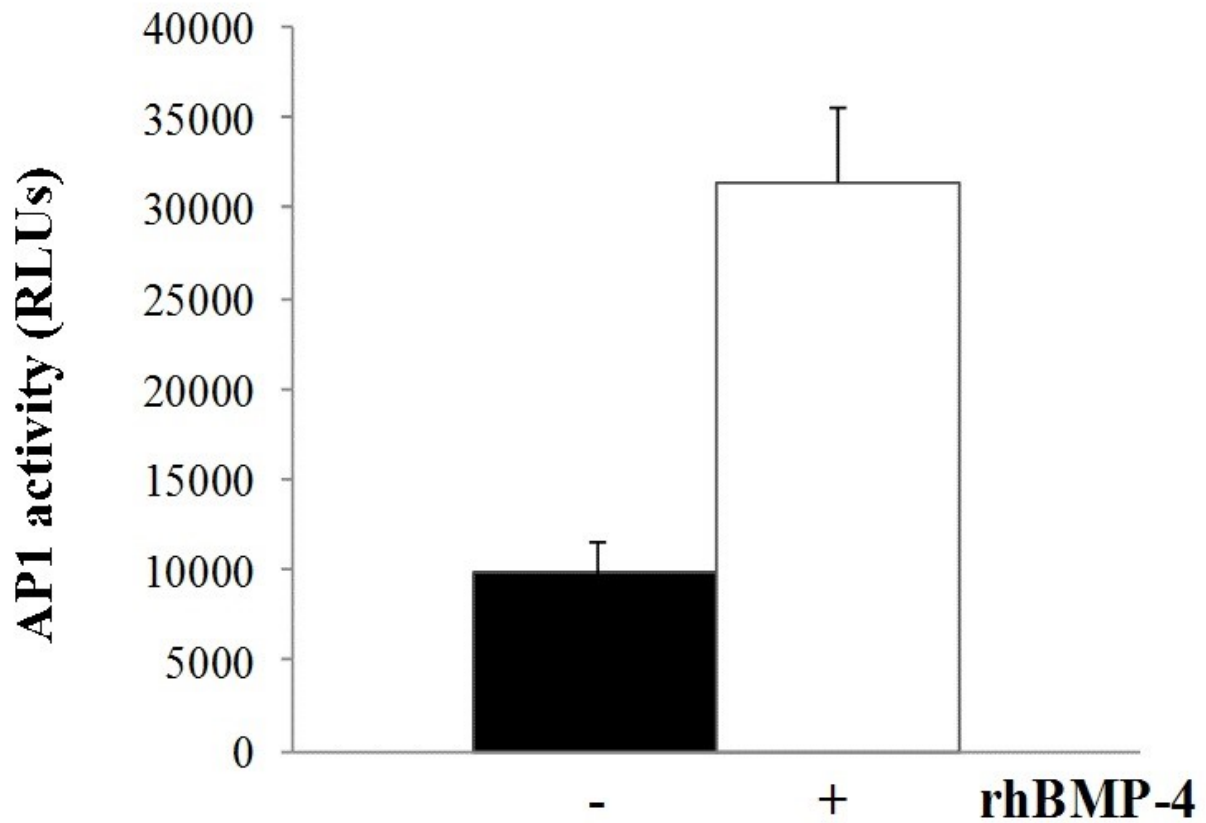


Figure 14: Schéma récapitulatif des résultats. La surexpression d'EGF favorise l'expression de BMP-4 dans les cellules HT1080 qui est nécessaire à l'inhibition d'expression de MMP-9. De plus, BMP-4 semble permettre une inhibition transcriptionnelle du gène *Igals-7* dans les cellules MDA-MB-468. Aussi, la galectine-7 est reconnue pour permettre l'induction du gène *mmp-9* dans diverses lignées cellulaires. L'expression extracellulaire de la galectine-7 permet une augmentation autocrine transcriptionnelle, ainsi que son endocytose rapide clathrine et CRD dépendant. La galectine-7 endocytosée est alors observable au cytosol et plus particulièrement au niveau des mitochondries.

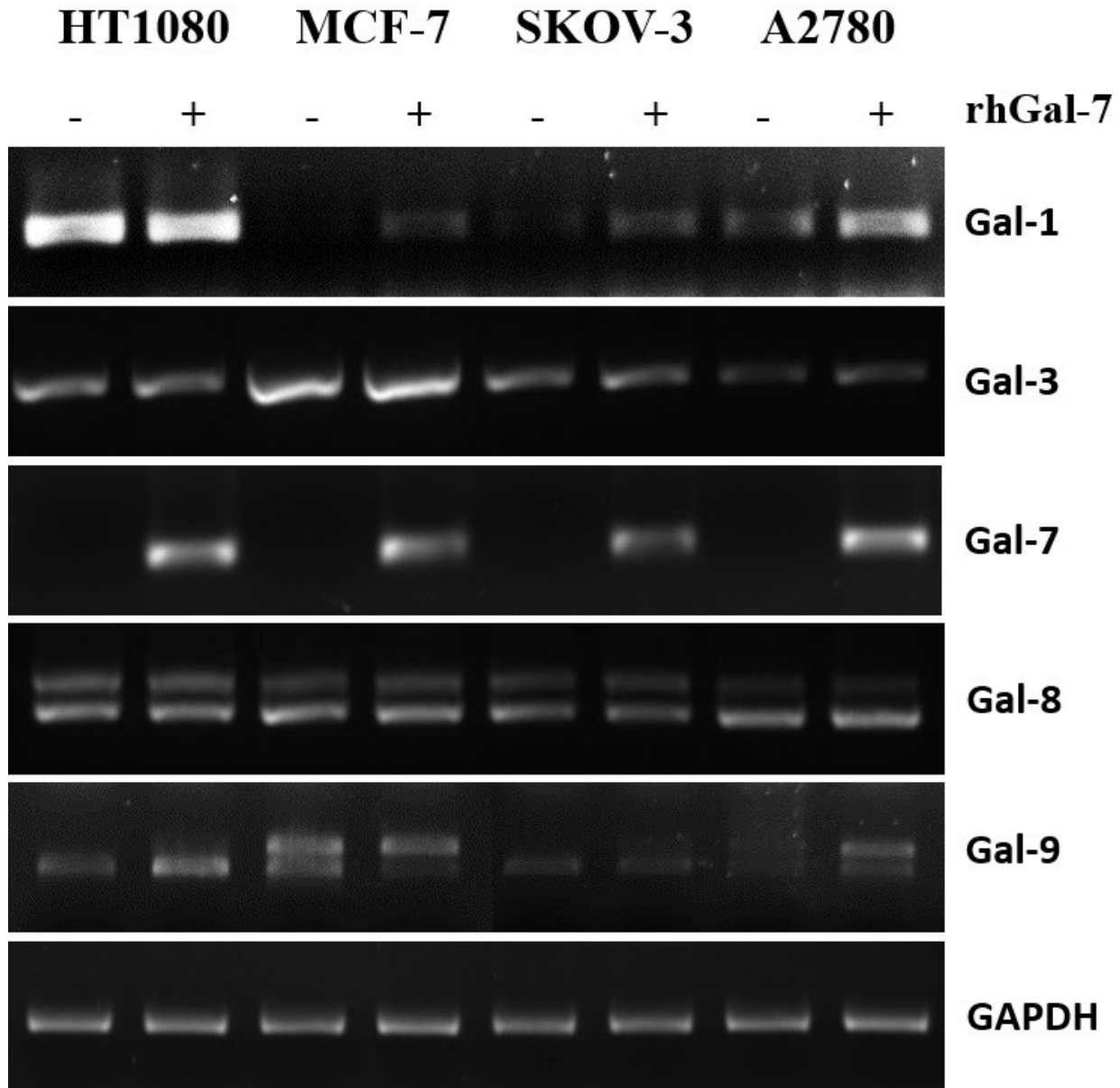
ANNEXES



Annexe 1 : Activité du promoteur Nf-κB suite à la stimulation par la recombinante BMP-4. Transfection des cellules HT1080 avec le vecteur rapporteur Nf-κB luciférase avec ou sans traitement BMP-4 recombinante (50ng/ml) et/ou PMA (20ng/ml). L'expression luciférase a été normalisée selon le niveau d'expression de la β-galactosidase.

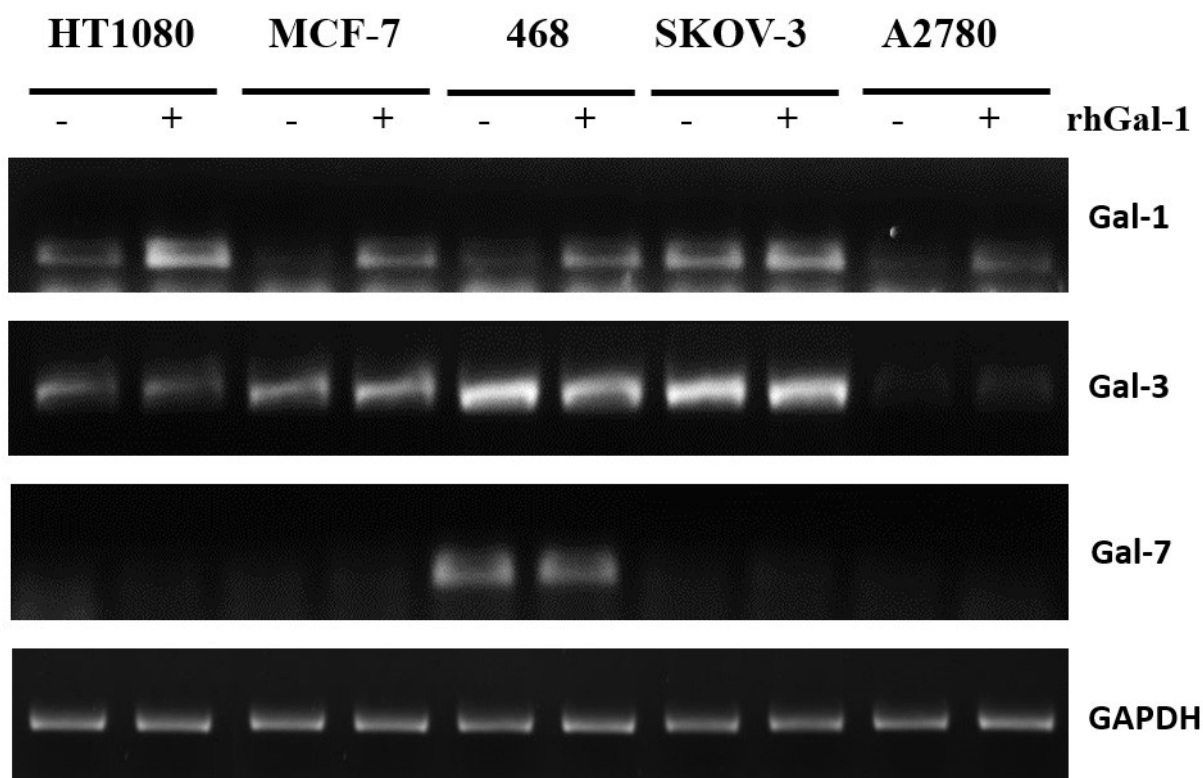


Annexe 2: Activité du promoteur AP1 suite à la stimulation par la recombinante BMP-4. Transfection des cellules HT1080 avec le vecteur rapporteur AP-1 luciférase avec ou sans traitement BMP-4 recombinante (50ng/ml). L'expression luciférase a été normalisée selon le niveau d'expression de la β -galactosidase.

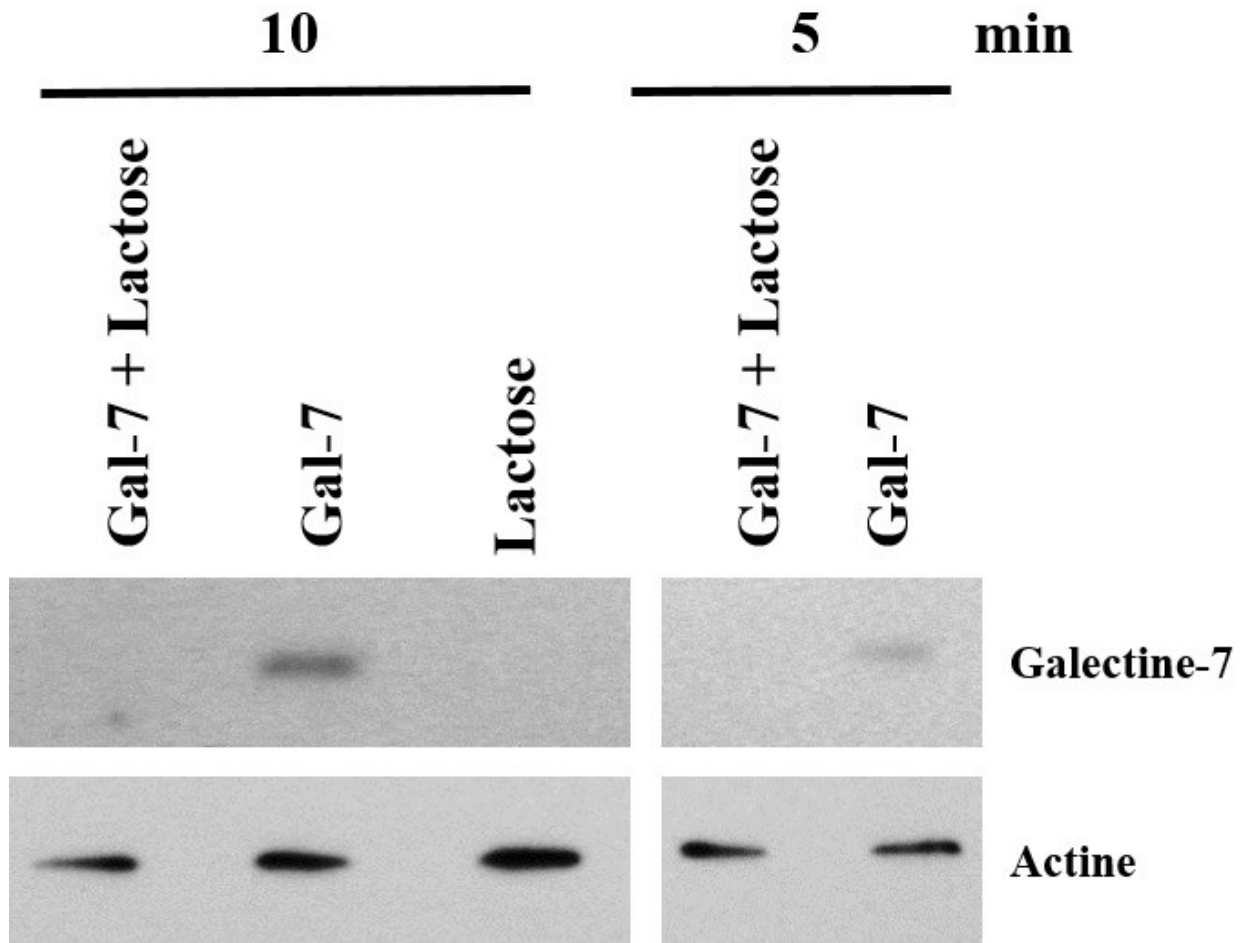


Annexe 3: Modulation de l'expression transcriptionnelle des gènes galectines -1, -3, -7, -8 et -9 suite à la stimulation extracellulaire galectine-7. Stimulation extracellulaire des différentes lignées cellulaires par la recombinante humaine galectine-7 (5 μ M) durant 16 heures. Évaluation du niveau transcriptionnel des différents gènes par RT-PCR, le GAPDH a été utilisé comme contrôle

A

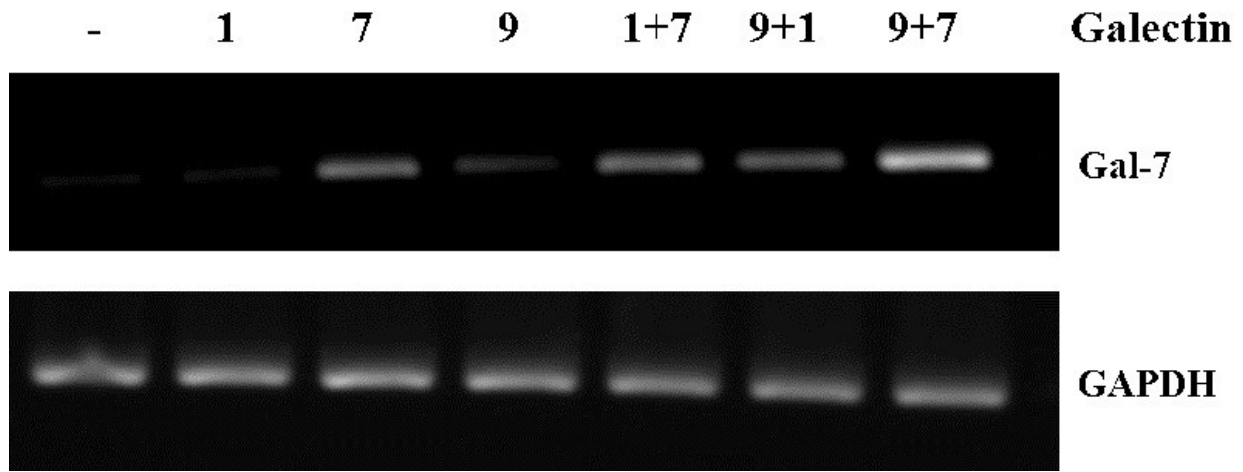


Annexe 4: Modulation de l'expression transcriptionnelle des gènes galectines -1, -3 et -7 suite au traitement extracellulaire galectine-1. Stimulation extracellulaire des différentes lignées cellulaires par la recombinante humaine galectine-1 (5 μ M) durant 16 heures. Évaluation du niveau transcriptionnel des différents gènes par RT-PCR, le GAPDH a été utilisé comme contrôle



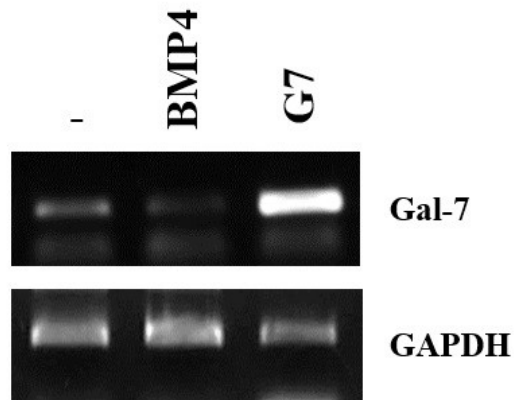
Annexe 5: L'endocytose de la galectine-7 dans les cellules MDA-MB-231 est dépendante du CRD. Expression cytosolique de la galectine-7 après 5 et 10 minutes de stimulation extracellulaire par la recombinante humaine galectine-7 (5 μ M) avec ou sans lactose (100mM) (pré-incubation de 2). L'actine a été utilisée comme contrôle.

A2780

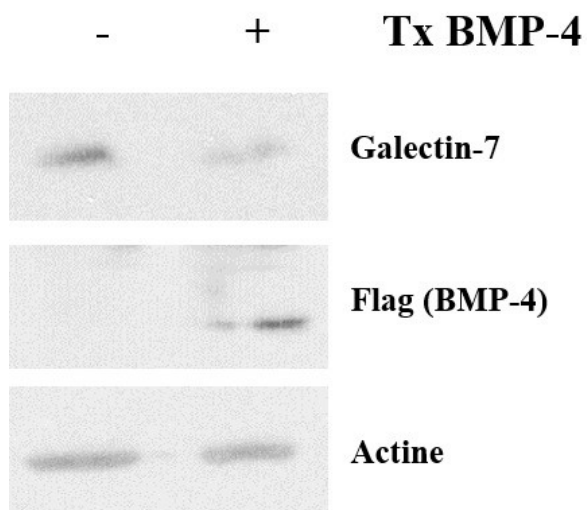


Annexe 6: Effets combinés des galectines-1, -7 et -9 sur le niveau transcriptionnel de la galectine-7. Stimulation des cellules A2780 par les recombinantes humaines galectines-1, -7 et -9 (10 μ M) durant 16 heures. Évaluation du niveau transcriptionnel de galectine-7 par RT-PCR, le GAPDH a été utilisé comme contrôle

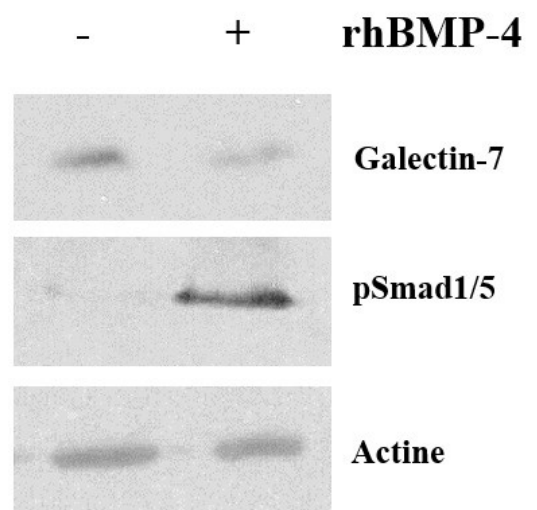
A



B



C



Annexe 7: BMP-4 diminue l'expression de la galectine-7 dans les cellules MDA-MB-468. (A) Expression transcriptionnelle (A) ou protéique (C) de la galectine-7 suite à la stimulation avec la recombinante BMP-4 (50ng/ml). (B) Expression transcriptionnelle de la galectine-7 suite à l'expression ectopique de la BMP-4.

Références

- Abedin MJ, Kashio Y, Seki M, Nakamura K & Hirashima M (2003) Potential roles of galectins in myeloid differentiation into three different lineages. *Journal of leukocyte biology* 73(5):650-656.
- Akahani S, Nangia-Makker P, Inohara H, Kim HR & Raz A (1997) Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family. *Cancer research* 57(23):5272-5276.
- Akool el S, Kleinert H, Hamada FM, Abdelwahab MH, Forstermann U, Pfeilschifter J & Eberhardt W (2003) Nitric oxide increases the decay of matrix metalloproteinase 9 mRNA by inhibiting the expression of mRNA-stabilizing factor HuR. *Molecular and cellular biology* 23(14):4901-4916.
- Alexander CM, Hansell EJ, Behrendtsen O, Flannery ML, Kishnani NS, Hawkes SP & Werb Z (1996) Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation. *Development* 122(6):1723-1736.
- Almkvist J, Dahlgren C, Leffler H & Karlsson A (2002) Activation of the neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase by galectin-1. *J Immunol* 168(8):4034-4041.
- Amano M, Galvan M, He J & Baum LG (2003) The ST6Gal I sialyltransferase selectively modifies N-glycans on CD45 to negatively regulate galectin-1-induced CD45 clustering, phosphatase modulation, and T cell death. *The Journal of biological chemistry* 278(9):7469-7475.
- American Cancer Society (2012) *Global Cancer Facts and Figures, 3rd Edition*. American Cancer Society (Atlanta), <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/document/acspc-044738.pdf> (Consulté le 16 août 2016)
- Angel P, Imagawa M, Chiu R, Stein B, Imbra RJ, Rahmsdorf HJ, Jonat C, Herrlich P & Karin M (1987) Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* 49(6):729-739.
- Anonyme (1989) International symposium. Critical determinants in cancer progression and metastasis. A centennial celebration of Dr. Stephen Paget's 'seed and soil' hypothesis. March 6-10, 1989, Houston, Texas. Abstracts. *Cancer metastasis reviews* 8(2):93-197.
- Ball SL, Mann DA, Wilson JA & Fisher AJ (2016) The Role of the Fibroblast in Inflammatory Upper Airway Conditions. *The American journal of pathology* 186(2):225-233.
- Ballard-Barbash R, Friedenreich CM, Courneya KS, Siddiqi SM, McTiernan A & Alfano CM (2012) Physical activity, biomarkers, and disease outcomes in cancer survivors: a systematic review. *Journal of the National Cancer Institute* 104(11):815-840.
- Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, Gitt MA, Hirabayashi J, Hughes C, Kasai K & et al. (1994) Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell* 76(4):597-598.
- Barrientos G, Freitag N, Tirado-Gonzalez I, Unverdorben L, Jeschke U, Thijssen VL & Blois SM (2014) Involvement of galectin-1 in reproduction: past, present and future. *Human reproduction update* 20(2):175-193.
- Bartlett JD & Smith CE (2013) Modulation of cell-cell junctional complexes by matrix metalloproteinases. *Journal of dental research* 92(1):10-17.
- Basset P, Okada A, Chenard MP, Kannan R, Stoll I, Anglard P, Bellocq JP & Rio MC (1997) Matrix metalloproteinases as stromal effectors of human carcinoma progression: therapeutic implications. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 15(8-9):535-541.
- Bauvois B (2014) Editorial: pro-matrix metalloproteinase-9 in tumor B lymphocytes: balancing migration and homing. *Journal of leukocyte biology* 96(2):164-166.

- Benbow U & Brinckerhoff CE (1997) The AP-1 site and MMP gene regulation: what is all the fuss about? *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 15(8-9):519-526.
- Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Podes D & Keshet E (1999) Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *The Journal of clinical investigation* 103(2):159-165.
- Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z & Hanahan D (2000) Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nature cell biology* 2(10):737-744.
- Bernerd F, Sarasin A & Magnaldo T (1999) Galectin-7 overexpression is associated with the apoptotic process in UVB-induced sunburn keratinocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(20):11329-11334.
- Besingi W & Johansson A (2014) Smoke-related DNA methylation changes in the etiology of human disease. *Human molecular genetics* 23(9):2290-2297.
- Bhat R, Belardi B, Mori H, Kuo P, Tam A, Hines WC, Le QT, Bertozzi CR & Bissell MJ (2016) Nuclear repartitioning of galectin-1 by an extracellular glycan switch regulates mammary morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(33):E4820-4827.
- Bi S, Earl LA, Jacobs L & Baum LG (2008) Structural features of galectin-9 and galectin-1 that determine distinct T cell death pathways. *The Journal of biological chemistry* 283(18):12248-12258.
- Bidon-Wagner N & Le Pennec JP (2004) Human galectin-8 isoforms and cancer. *Glycoconjugate journal* 19(7-9):557-563.
- Bigg HF, Shi YE, Liu YE, Steffensen B & Overall CM (1997) Specific, high affinity binding of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) to the COOH-terminal hemopexin-like domain of human gelatinase A. TIMP-4 binds progelatinase A and the COOH-terminal domain in a similar manner to TIMP-2. *The Journal of biological chemistry* 272(24):15496-15500.
- Binder M, Roberts C, Spencer N, Antoine D & Cartwright C (2014) On the Antiquity of Cancer: Evidence for Metastatic Carcinoma in a Young Man from Ancient Nubia (c. 1200BC). *PloS one* 9(3).
- Blois SM, Conrad ML, Freitag N & Barrientos G (2015) Galectins in angiogenesis: consequences for gestation. *Journal of reproductive immunology* 108:33-41.
- Bode W, Gomis-Ruth FX & Stockler W (1993) Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS letters* 331(1-2):134-140.
- Bode W, Reinemer P, Huber R, Kleine T, Schnierer S & Tschesche H (1994) The X-ray crystal structure of the catalytic domain of human neutrophil collagenase inhibited by a substrate analogue reveals the essentials for catalysis and specificity. *The EMBO journal* 13(6):1263-1269.
- Boffetta P (2006) Human cancer from environmental pollutants: the epidemiological evidence. *Mutation research* 608(2):157-162.
- Bonnans C, Chou J & Werb Z (2014) Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature reviews. Molecular cell biology* 15(12):786-801.
- Boscher C, Dennis JW & Nabi IR (2011) Glycosylation, galectins and cellular signaling. *Current opinion in cell biology* 23(4):383-392.
- Boscher C, Zheng YZ, Lakshminarayan R, Johannes L, Dennis JW, Foster LJ & Nabi IR (2012) Galectin-3 protein regulates mobility of N-cadherin and GM1 ganglioside at cell-cell junctions of mammary carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry* 287(39):32940-32952.
- Bouchard F, Belanger SD, Biron-Pain K & St-Pierre Y (2010) EGR-1 activation by EGF inhibits MMP-9 expression and lymphoma growth. *Blood* 116(5):759-766.

- Boudreau N, Werb Z & Bissell MJ (1996) Suppression of apoptosis by basement membrane requires three-dimensional tissue organization and withdrawal from the cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(8):3509-3513.
- Bouloumie A, Sengenès C, Portolan G, Galitzky J & Lafontan M (2001) Adipocyte produces matrix metalloproteinases 2 and 9: involvement in adipose differentiation. *Diabetes* 50(9):2080-2086.
- Boyd D (1996) Invasion and metastasis. *Cancer metastasis reviews* 15(1):77-89.
- Boyle P & Maisonneuve P (1995) Lung cancer and tobacco smoking. *Lung Cancer* 12(3):167-181.
- Bozic I, Antal T, Ohtsuki H, Carter H, Kim D, Chen S, Karchin R, Kinzler KW, Vogelstein B & Nowak MA (2010) Accumulation of driver and passenger mutations during tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(43):18545-18550.
- Brew K, Dinakarandian D & Nagase H (2000) Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochimica et biophysica acta* 1477(1-2):267-283.
- Bromer JG, Wu J, Zhou Y & Taylor HS (2009) Hypermethylation of homeobox A10 by in utero diethylstilbestrol exposure: an epigenetic mechanism for altered developmental programming. *Endocrinology* 150(7):3376-3382.
- Buckley JJ & Jessen JR (2015) Matrix metalloproteinase function in non-mammalian model organisms. *Front Biosci (Schol Ed)* 7:168-183.
- Cairns RA, Harris IS & Mak TW (2011) Regulation of cancer cell metabolism. *Nature reviews. Cancer* 11(2):85-95.
- Calvier L, Miana M, Reboul P, Cachofeiro V, Martinez-Martinez E, de Boer RA, Poirier F, Lacolley P, Zannad F, Rossignol P & Lopez-Andres N (2013) Galectin-3 mediates aldosterone-induced vascular fibrosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 33(1):67-75.
- 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, Said N, Amin S, Wu HK, Bruce A, Garate M, Hsu DK, Kuwabara I, Liu FT & Panjwani N (2002) Galectins-3 and -7, but not galectin-1, play a role in re-epithelialization of wounds. *The Journal of biological chemistry* 277(44):42299-42305.
- Cao Z, Said N, Wu HK, Kuwabara I, Liu FT & Panjwani N (2003) Galectin-7 as a potential mediator of corneal epithelial cell migration. *Archives of ophthalmology* 121(1):82-86.
- Cao Z, Saravanan C, Chen WS & Panjwani N (2015) Examination of the role of galectins in cell migration and re-epithelialization of wounds. *Methods Mol Biol* 1207:317-326.
- Capasso LL (2005) Antiquity of cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 113(1):2-13.
- Carmeliet P & Jain RK (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407(6801):249-257.
- Carmeliet P & Jain RK (2011) Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nature reviews. Drug discovery* 10(6):417-427.
- Carvalho RS, Fernandes VC, Nepomuceno TC, Rodrigues DC, Woods NT, Suarez-Kurtz G, Chammas R, Monteiro AN & Carvalho MA (2014) Characterization of LGALS3 (galectin-3) as a player in DNA damage response. *Cancer biology & therapy* 15(7):840-850.
- Chang C & Werb Z (2001) The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends in cell biology* 11(11):S37-43.
- Chen HL, Chiang PC, Lo CH, Lo YH, Hsu DK, Chen HY & Liu FT (2016) Galectin-7 Regulates Keratinocyte Proliferation and Differentiation through JNK-miR-203-p63 Signaling. *The Journal of investigative dermatology* 136(1):182-191.

- Chen HY, Weng IC, Hong MH & Liu FT (2014) Galectins as bacterial sensors in the host innate response. *Current opinion in microbiology* 17:75-81.
- Chen IJ, Chen HL & Demetriou M (2007) Lateral compartmentalization of T cell receptor versus CD45 by galectin-N-glycan binding and microfilaments coordinate basal and activation signaling. *The Journal of biological chemistry* 282(48):35361-35372.
- Chen JJ, Sun Y & Nabel GJ (1998) Regulation of the proinflammatory effects of Fas ligand (CD95L). *Science* 282(5394):1714-1717.
- Chenais B (2013) Transposable elements and human cancer: a causal relationship? *Biochimica et biophysica acta* 1835(1):28-35.
- Chetty C, Lakka SS, Bhoopathi P & Rao JS (2010) MMP-2 alters VEGF expression via alphaVbeta3 integrin-mediated PI3K/AKT signaling in A549 lung cancer cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 127(5):1081-1095.
- Chicoine E, Esteve PO, Robledo O, Van Themsche C, Potworowski EF & St-Pierre Y (2002) Evidence for the role of promoter methylation in the regulation of MMP-9 gene expression. *Biochemical and biophysical research communications* 297(4):765-772.
- Cho A, Graves J & Reidy MA (2000) Mitogen-activated protein kinases mediate matrix metalloproteinase-9 expression in vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 20(12):2527-2532.
- Christensen BC, Houseman EA, Marsit CJ, Zheng SC, Wrensch MR, Wiemels JL, Nelson HH, Karagas MR, Padbury JF, Bueno R, Sugarbaker DJ, Yeh RF, Wiencke JK & Kelsey KT (2009) Aging and Environmental Exposures Alter Tissue-Specific DNA Methylation Dependent upon CpG Island Context. *Plos Genet* 5(8).
- Clausse N, van den Brule F, Waltregny D, Garnier F & Castronovo V (1999) Galectin-1 expression in prostate tumor-associated capillary endothelial cells is increased by prostate carcinoma cells and modulates heterotypic cell-cell adhesion. *Angiogenesis* 3(4):317-325.
- Collen A, Hanemaaijer R, Lupu F, Quax PH, van Lent N, Grimbergen J, Peters E, Koolwijk P & van Hinsbergh VW (2003) Membrane-type matrix metalloproteinase-mediated angiogenesis in a fibrin-collagen matrix. *Blood* 101(5):1810-1817.
- Comité consultatif de la Société Canadienne du Cancer (2015) *Statistiques Canadiennes sur le Cancer 2015*. Société Canadienne du Cancer,, Toronto (Ontario). 160 p
<https://www.cancer.ca/~media/cancer.ca/CW/cancer%20information/cancer%20101/Canadian%20cancer%20statistics/Canadian-Cancer-Statistics-2015-FR.pdf> (Consulté e Date Accessed)
- Compagno D, Jaworski FM, Gentilini L, Contrufo G, Gonzalez Perez I, Elola MT, Pregi N, Rabinovich GA & Laderach DJ (2014) Galectins: major signaling modulators inside and outside the cell. *Current molecular medicine* 14(5):630-651.
- Compagno D, Laderach DJ, Gentilini L, Jaworski FM & Rabinovich GA (2013) Delineating the "galectin signature" of the tumor microenvironment. *Oncoimmunology* 2(4):e23565.
- Cooper D, Norling LV & Perretti M (2008) Novel insights into the inhibitory effects of Galectin-1 on neutrophil recruitment under flow. *Journal of leukocyte biology* 83(6):1459-1466.
- Cooper DN, Boulianne RP, Charlton S, Farrell EM, Sucher A & Lu BC (1997) Fungal galectins, sequence and specificity of two isolectins from *Coprinus cinereus*. *The Journal of biological chemistry* 272(3):1514-1521.
- Corney DC, Flesken-Nikitin A, Choi J & Nikitin AY (2008) Role of p53 and Rb in ovarian cancer. *Advances in experimental medicine and biology* 622:99-117.
- Costache MI, Ioana M, Iordache S, Ene D, Costache CA & Saftoiu A (2015) VEGF Expression in Pancreatic Cancer and Other Malignancies: A Review of the Literature. *Romanian journal of internal medicine = Revue roumaine de medecine interne* 53(3):199-208.

- Couillard J, Demers M, Lavoie G & St-Pierre Y (2006) The role of DNA hypomethylation in the control of stromelysin gene expression. *Biochemical and biophysical research communications* 342(4):1233-1239.
- Coulouarn C, Corlu A, Glaise D, Guenon I, Thorgeirsson SS & Clement B (2012) Hepatocyte-stellate cell cross-talk in the liver engenders a permissive inflammatory microenvironment that drives progression in hepatocellular carcinoma. *Cancer research* 72(10):2533-2542.
- Coussens LM, Fingleton B & Matrisian LM (2002) Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* 295(5564):2387-2392.
- Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D & Werb Z (2000) MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* 103(3):481-490.
- Covington MD, Bayless KJ, Burghardt RC, Davis GE & Parrish AR (2005) Ischemia-induced cleavage of cadherins in NRK cells: evidence for a role of metalloproteinases. *American journal of physiology. Renal physiology* 289(2):F280-288.
- Cowan KN, Jones PL & Rabinovitch M (2000) Elastase and matrix metalloproteinase inhibitors induce regression, and tenascin-C antisense prevents progression, of vascular disease. *The Journal of clinical investigation* 105(1):21-34.
- Crawford HC, Fingleton BM, Rudolph-Owen LA, Goss KJ, Rubinfeld B, Polakis P & Matrisian LM (1999) The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene* 18(18):2883-2891.
- Croci DO, Cerliani JP, Dalotto-Moreno T, Mendez-Huergo SP, Mascanfroni ID, Dergan-Dylon S, Toscano MA, Caramelo JJ, Garcia-Vallejo JJ, Ouyang J, Mesri EA, Junttila MR, Bais C, Shipp MA, Salatino M & Rabinovich GA (2014) Glycosylation-dependent lectin-receptor interactions preserve angiogenesis in anti-VEGF refractory tumors. *Cell* 156(4):744-758.
- Cumpstey I, Carlsson S, Leffler H & Nilsson UJ (2005) Synthesis of a phenyl thio-beta-D-galactopyranoside library from 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene: discovery of efficient and selective monosaccharide inhibitors of galectin-7. *Organic & biomolecular chemistry* 3(10):1922-1932.
- Curry TE, Jr. & Osteen KG (2003) The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endocrine reviews* 24(4):428-465.
- De Bont R & van Larebeke N (2004) Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis* 19(3):169-185.
- de Haan JJ, Smeets MB, Pasterkamp G & Arslan F (2013) Danger signals in the initiation of the inflammatory response after myocardial infarction. *Mediators of inflammation* 2013:206039.
- Demers M, Biron-Pain K, Hebert J, Lamarre A, Magnaldo T & St-Pierre Y (2007) Galectin-7 in lymphoma: elevated expression in human lymphoid malignancies and decreased lymphoma dissemination by antisense strategies in experimental model. *Cancer research* 67(6):2824-2829.
- Demers M, Couillard J, Giglia-Mari G, Magnaldo T & St-Pierre Y (2009) Increased galectin-7 gene expression in lymphoma cells is under the control of DNA methylation. *Biochemical and biophysical research communications* 387(3):425-429.
- Demers M, Magnaldo T & St-Pierre Y (2005) A novel function for galectin-7: promoting tumorigenesis by up-regulating MMP-9 gene expression. *Cancer research* 65(12):5205-5210.
- Demers M, Rose AA, Grosset AA, Biron-Pain K, Gaboury L, Siegel PM & St-Pierre Y (2010) Overexpression of galectin-7, a myoepithelial cell marker, enhances spontaneous metastasis of breast cancer cells. *The American journal of pathology* 176(6):3023-3031.
- Demetriou M, Granovsky M, Quaggin S & Dennis JW (2001) Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature* 409(6821):733-739.
- Derynck R, Akhurst RJ & Balmain A (2001) TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression (vol 29, pg 117, 2001). *Nature genetics* 29(3):351-351.

- Deryugina EI & Quigley JP (2006) Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer metastasis reviews* 25(1):9-34.
- Deryugina EI & Quigley JP (2015) Tumor angiogenesis: MMP-mediated induction of intravasation- and metastasis-sustaining neovasculature. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 44-46:94-112.
- Deryugina EI, Soroceanu L & Strongin AY (2002) Up-regulation of vascular endothelial growth factor by membrane-type 1 matrix metalloproteinase stimulates human glioma xenograft growth and angiogenesis. *Cancer research* 62(2):580-588.
- 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.
- Dias-Baruffi M, Zhu H, Cho M, Karmakar S, McEver RP & Cummings RD (2003) Dimeric galectin-1 induces surface exposure of phosphatidylserine and phagocytic recognition of leukocytes without inducing apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 278(42):41282-41293.
- Doherty JR & Cleveland JL (2013) Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics. *The Journal of clinical investigation* 123(9):3685-3692.
- Dong H, Lei J, Ding L, Wen Y, Ju H & Zhang X (2013) MicroRNA: function, detection, and bioanalysis. *Chemical reviews* 113(8):6207-6233.
- Dong Z, Kumar R, Yang X & Fidler IJ (1997) Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma. *Cell* 88(6):801-810.
- Downward J (2003) Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature reviews. Cancer* 3(1):11-22.
- Drickamer K & Taylor ME (1993) Biology of animal lectins. *Annual review of cell biology* 9:237-264.
- Duesberg P, Rasnick D, Li RH, Winters L, Rausch C & Hehlmann R (1999) How aneuploidy may cause cancer and genetic instability. *Anticancer Res* 19(6a):4887-4906.
- Dutertre S, Descamps S & Prigent C (2002) On the role of aurora-A in centrosome function. *Oncogene* 21(40):6175-6183.
- Eck SM, Cote AL, Winkelman WD & Brinckerhoff CE (2009) CXCR4 and matrix metalloproteinase-1 are elevated in breast carcinoma-associated fibroblasts and in normal mammary fibroblasts exposed to factors secreted by breast cancer cells. *Molecular cancer research : MCR* 7(7):1033-1044.
- Egeblad M & Werb Z (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature reviews. Cancer* 2(3):161-174.
- Eissa S, Ali-Labib R, Swellam M, Bassiony M, Tash F & El-Zayat TM (2007) Noninvasive diagnosis of bladder cancer by detection of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) and their inhibitor (TIMP-2) in urine. *European urology* 52(5):1388-1396.
- Elad-Sfadia G, Haklai R, Balan E & Kloog Y (2004) Galectin-3 augments K-Ras activation and triggers a Ras signal that attenuates ERK but not phosphoinositide 3-kinase activity. *The Journal of biological chemistry* 279(33):34922-34930.
- Elad-Sfadia G, Haklai R, Ballan E, Gabius HJ & Kloog Y (2002) Galectin-1 augments Ras activation and diverts Ras signals to Raf-1 at the expense of phosphoinositide 3-kinase. *The Journal of biological chemistry* 277(40):37169-37175.
- Ellerhorst JA, Stephens LC, Nguyen T & Xu XC (2002) Effects of galectin-3 expression on growth and tumorigenicity of the prostate cancer cell line LNCaP. *The Prostate* 50(1):64-70.
- Elola MT, Blidner AG, Ferragut F, Bracalente C & Rabinovich GA (2015) Assembly, organization and regulation of cell-surface receptors by lectin-glycan complexes. *The Biochemical journal* 469(1):1-16.
- Evan GI & Vousden KH (2001) Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411(6835):342-348.

- Facciabene A, Motz GT & Coukos G (2012) T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. *Cancer research* 72(9):2162-2171.
- Fajka-Boja R, Blasko A, Kovacs-Solyom F, Szebeni GJ, Toth GK & Monostori E (2008) Co-localization of galectin-1 with GM1 ganglioside in the course of its clathrin- and raft-dependent endocytosis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65(16):2586-2593.
- Farina AR & Mackay AR (2014) Gelatinase B/MMP-9 in Tumour Pathogenesis and Progression. *Cancers* 6(1):240-296.
- Feinberg AP, Ohlsson R & Henikoff S (2006) The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nature Reviews Genetics* 7(1):21-33.
- Feinberg AP & Tycko B (2004) The history of cancer epigenetics. *Nature reviews. Cancer* 4(2):143-153.
- Feng S, Cen J, Huang Y, Shen H, Yao L, Wang Y & Chen Z (2011) Matrix metalloproteinase-2 and -9 secreted by leukemic cells increase the permeability of blood-brain barrier by disrupting tight junction proteins. *PloS one* 6(8):e20599.
- Fermino ML, Polli CD, Toledo KA, Liu FT, Hsu DK, Roque-Barreira MC, Pereira-da-Silva G, Bernardes ES & Halbwachs-Mecarelli L (2011) LPS-induced galectin-3 oligomerization results in enhancement of neutrophil activation. *PloS one* 6(10):e26004.
- Fernandez-Catalan C, Bode W, Huber R, Turk D, Calvete JJ, Lichte A, Tschesche H & Maskos K (1998) Crystal structure of the complex formed by the membrane type 1-matrix metalloproteinase with the tissue inhibitor of metalloproteinases-2, the soluble progelatinase A receptor. *The EMBO journal* 17(17):5238-5248.
- Finkel T, Serrano M & Blasco MA (2007) The common biology of cancer and ageing. *Nature* 448(7155):767-774.
- Fiore E, Fusco C, Romero P & Stamenkovic I (2002) Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9/gelatinase B) proteolytically cleaves ICAM-1 and participates in tumor cell resistance to natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Oncogene* 21(34):5213-5223.
- Fischer C, Sanchez-Ruderisch H, Welzel M, Wiedenmann B, Sakai T, Andre S, Gabius HJ, Khachigian L, Detjen KM & Rosewicz S (2005) Galectin-1 interacts with the alpha 5 beta 1 fibronectin receptor to restrict carcinoma cell growth via induction of p21 and p27. *Journal of Biological Chemistry* 280(44):37266-37277.
- Folgueras AR, Pendas AM, Sanchez LM & Lopez-Otin C (2004) Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *The International journal of developmental biology* 48(5-6):411-424.
- Fred Brewer C (2002) Binding and cross-linking properties of galectins. *Biochimica et biophysica acta* 1572(2-3):255-262.
- Friedrichs J, Manninen A, Muller DJ & Helenius J (2008) Galectin-3 regulates integrin alpha2beta1-mediated adhesion to collagen-I and -IV. *The Journal of biological chemistry* 283(47):32264-32272.
- Fujii A, Shearer TR & Azuma M (2015) Galectin-3 enhances extracellular matrix associations and wound healing in monkey corneal epithelium. *Experimental eye research* 137:71-78.
- Fukumori T, Takenaka Y, Oka N, Yoshii T, Hogan V, Inohara H, Kanayama HO, Kim HR & Raz A (2004) Endogenous galectin-3 determines the routing of CD95 apoptotic signaling pathways. *Cancer research* 64(10):3376-3379.
- Fukumori T, Takenaka Y, Yoshii T, Kim HR, Hogan V, Inohara H, Kagawa S & Raz A (2003) CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. *Cancer research* 63(23):8302-8311.
- Furtado MB, Nim HT, Boyd SE & Rosenthal NA (2016) View from the heart: cardiac fibroblasts in development, scarring and regeneration. *Development* 143(3):387-397.
- Furtak V, Hatcher F & Ochieng J (2001) Galectin-3 mediates the endocytosis of beta-1 integrins by breast carcinoma cells. *Biochemical and biophysical research communications* 289(4):845-850.

- Fuster MM & Esko JD (2005) The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nature reviews. Cancer* 5(7):526-542.
- Gaire M, Magbanua Z, McDonnell S, McNeil L, Lovett DH & Matrisian LM (1994) Structure and expression of the human gene for the matrix metalloproteinase matrilysin. *The Journal of biological chemistry* 269(3):2032-2040.
- Gaudin JC, Mehul B & Hughes RC (2000) Nuclear localisation of wild type and mutant galectin-3 in transfected cells. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 92(1):49-58.
- Gauthier L, Rossi B, Roux F, Termine E & Schiff C (2002) Galectin-1 is a stromal cell ligand of the pre-B cell receptor (BCR) implicated in synapse formation between pre-B and stromal cells and in pre-BCR triggering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(20):13014-13019.
- Gendronneau G, Sani S, Dang T, Deshayes F, Delacour D, Pichard E, Advedissian T, Sidhu SS, Viguier M, Magnaldo T & Poirier F (2015) Overexpression of galectin-7 in mouse epidermis leads to loss of cell junctions and defective skin repair. *PLoS one* 10(3):e0119031.
- Gharaee-Kermani M, Denholm EM & Phan SH (1996) Costimulation of fibroblast collagen and transforming growth factor beta1 gene expression by monocyte chemoattractant protein-1 via specific receptors. *The Journal of biological chemistry* 271(30):17779-17784.
- Giannelli G, Falk-Marzillier J, Schiraldi O, Stetler-Stevenson WG & Quaranta V (1997) Induction of cell migration by matrix metalloproteinase-2 cleavage of laminin-5. *Science* 277(5323):225-228.
- Gilles C, Polette M, Seiki M, Birembaut P & Thompson EW (1997) Implication of collagen type I-induced membrane-type 1-matrix metalloproteinase expression and matrix metalloproteinase-2 activation in the metastatic progression of breast carcinoma. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 76(5):651-660.
- Giudicelli V, Lutowski D, Levi-Strauss M, Bladier D, Joubert-Caron R & Caron M (1997) Is human galectin-1 activity modulated by monomer/dimer equilibrium? *Glycobiology* 7(3):viii-x.
- Goffin F, Munaut C, Frankenne F, Perrier D'Hauterive S, Beliard A, Fridman V, Nervo P, Colige A & Foidart JM (2003) Expression pattern of metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix-metalloproteinases in cycling human endometrium. *Biology of reproduction* 69(3):976-984.
- Gomis-Ruth FX, Maskos K, Betz M, Bergner A, Huber R, Suzuki K, Yoshida N, Nagase H, Brew K, Bourenkov GP, Bartunik H & Bode W (1997) Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature* 389(6646):77-81.
- Gonzalez-Avila G, Iturria C, Vadillo F, Teran L, Selman M & Perez-Tamayo R (1998) 72-kD (MMP-2) and 92-kD (MMP-9) type IV collagenase production and activity in different histologic types of lung cancer cells. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology* 66(1):5-16.
- Goto T, Endo T, Henmi H, Kitajima Y, Kiya T, Nishikawa A, Manase K, Sato H & Kudo R (1999) Gonadotropin-releasing hormone agonist has the ability to induce increased matrix metalloproteinase (MMP)-2 and membrane type 1-MMP expression in corpora lutea, and structural luteolysis in rats. *The Journal of endocrinology* 161(3):393-402.
- Govindan R, Ding L, Griffith M, Subramanian J, Dees ND, Kanchi KL, Maher CA, Fulton R, Fulton L, Wallis J, Chen K, Walker J, McDonald S, Bose R, Ornitz D, Xiong D, You M, Dooling DJ, Watson M, Mardis ER & Wilson RK (2012) Genomic landscape of non-small cell lung cancer in smokers and never-smokers. *Cell* 150(6):1121-1134.
- Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G, Davies H, Teague J, Butler A, Stevens C, Edkins S, O'Meara S, Vastrik I, Schmidt EE, Avis T, Barthorpe S, Bhamra G, Buck G, Choudhury B, Clements J, Cole J, Dicks E, Forbes S, Gray K, Halliday K, Harrison R, Hills K, Hinton J, Jenkinson A, Jones D, Menzies A, Mironenko T, Perry J, Raine K, Richardson D, Shepherd R, Small A, Tofts C,

- Varian J, Webb T, West S, Widaa S, Yates A, Cahill DP, Louis DN, Goldstraw P, Nicholson AG, Brasseur F, Looijenga L, Weber BL, Chiew YE, DeFazio A, Greaves MF, Green AR, Campbell P, Birney E, Easton DF, Chenevix-Trench G, Tan MH, Khoo SK, Teh BT, Yuen ST, Leung SY, Wooster R, Futreal PA & Stratton MR (2007) Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 446(7132):153-158.
- Griffioen AW & Thijssen VL (2014) Galectins in tumor angiogenesis. *Annals of translational medicine* 2(9):90.
- Grigorian A, Torossian S & Demetriou M (2009) T-cell growth, cell surface organization, and the galectin-glycoprotein lattice. *Immunological reviews* 230(1):232-246.
- Gross J & Lapiere CM (1962) Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 48:1014-1022.
- Grosset AA, Labrie M, Gagne D, Vladioiu MC, Gaboury L, Doucet N & St-Pierre Y (2014) Cytosolic galectin-7 impairs p53 functions and induces chemoresistance in breast cancer cells. *BMC cancer* 14:801.
- Grosset AA, Labrie M, Vladioiu MC, Yousef EM, Gaboury L & St-Pierre Y (2016) Galectin signatures contribute to the heterogeneity of breast cancer and provide new prognostic information and therapeutic targets. *Oncotarget* 7(14):18183-18203.
- Gupta GP & Massague J (2006) Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 127(4):679-695.
- Hamano Y, Zeisberg M, Sugimoto H, Lively JC, Maeshima Y, Yang C, Hynes RO, Werb Z, Sudhakar A & Kalluri R (2003) Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin. *Cancer cell* 3(6):589-601.
- Hanahan D & Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5):646-674.
- Haque S, Akhter N, Lohani M, Ali A & Mandal RK (2015) Matrix metalloproteinase-2 -1306 C>T gene polymorphism is associated with reduced risk of cancer: a meta-analysis. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 16(3):889-896.
- Harazono Y, Kho DH, Balan V, Nakajima K, Zhang T, Hogan V & Raz A (2014) Galectin-3 leads to attenuation of apoptosis through Bax heterodimerization in human thyroid carcinoma cells. *Oncotarget* 5(20):9992-10001.
- Hardy PA & Zachary H (2005) Reappraisal of the Hansemann-Boveri hypothesis on the origin of tumors. *Cell Biol Int* 29(12):983-992.
- Hashizume K (2007) Analysis of uteroplacental-specific molecules and their functions during implantation and placentation in the bovine. *The Journal of reproduction and development* 53(1):1-11.
- Hata AN, Engelman JA & Faber AC (2015) The BCL2 Family: Key Mediators of the Apoptotic Response to Targeted Anticancer Therapeutics. *Cancer discovery* 5(5):475-487.
- Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM & Shapiro SD (1997) Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science* 277(5334):2002-2004.
- He J & Baum LG (2004) Presentation of galectin-1 by extracellular matrix triggers T cell death. *The Journal of biological chemistry* 279(6):4705-4712.
- He S, Choi YH, Choi JK, Yeo CY, Chun C & Lee KY (2014) Protein kinase A regulates the osteogenic activity of Osterix. *Journal of cellular biochemistry* 115(10):1808-1815.
- Henderson NC & Sethi T (2009) The regulation of inflammation by galectin-3. *Immunological reviews* 230(1):160-171.
- Herceg Z & Vaissiere T (2011) Epigenetic mechanisms and cancer: an interface between the environment and the genome. *Epigenetics* 6(7):804-819.
- Hibbs MS, Hoidal JR & Kang AH (1987) Expression of a metalloproteinase that degrades native type V collagen and denatured collagens by cultured human alveolar macrophages. *The Journal of clinical investigation* 80(6):1644-1650.

- Hirabayashi J, Hashidate T, Arata Y, Nishi N, Nakamura T, Hirashima M, Urashima T, Oka T, Futai M, Muller WE, Yagi F & Kasai K (2002) Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochimica et biophysica acta* 1572(2-3):232-254.
- Hirabayashi J, Ubukata T & Kasai K (1996) Purification and molecular characterization of a novel 16-kDa galectin from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of biological chemistry* 271(5):2497-2505.
- Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, Murakami M, Itoh T, Kijima H, Shipley JM, Senior RM & Shibuya M (2002) MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer cell* 2(4):289-300.
- Hogan BL (1996) Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes & development* 10(13):1580-1594.
- Holmbeck K, Bianco P, Caterina J, Yamada S, Kromer M, Kuznetsov SA, Mankani M, Robey PG, Poole AR, Pidoux I, Ward JM & Birkedal-Hansen H (1999) MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell* 99(1):81-92.
- Honjo Y, Nangia-Makker P, Inohara H & Raz A (2001) Down-regulation of galectin-3 suppresses tumorigenicity of human breast carcinoma cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 7(3):661-668.
- Horiguchi N, Arimoto K, Mizutani A, Endo-Ichikawa Y, Nakada H & Taketani S (2003) Galectin-1 induces cell adhesion to the extracellular matrix and apoptosis of non-adherent human colon cancer Colo201 cells. *Journal of biochemistry* 134(6):869-874.
- Hou L, Zhang X, Wang D & Baccarelli A (2012) Environmental chemical exposures and human epigenetics. *International journal of epidemiology* 41(1):79-105.
- Houzelstein D, Goncalves IR, Fadden AJ, Sidhu SS, Cooper DN, Drickamer K, Leffler H & Poirier F (2004) Phylogenetic analysis of the vertebrate galectin family. *Molecular biology and evolution* 21(7):1177-1187.
- Hsieh SH, Ying NW, Wu MH, Chiang WF, Hsu CL, Wong TY, Jin YT, Hong TM & Chen YL (2008) Galectin-1, a novel ligand of neuropilin-1, activates VEGFR-2 signaling and modulates the migration of vascular endothelial cells. *Oncogene* 27(26):3746-3753.
- Hsu DK & Liu FT (2004) Regulation of cellular homeostasis by galectins. *Glycoconjugate journal* 19(7-9):507-515.
- Hu J, Van den Steen PE, Sang QX & Opdenakker G (2007) Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. *Nature reviews. Drug discovery* 6(6):480-498.
- Hughes RC (2001) Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie* 83(7):667-676.
- Hulboy DL, Rudolph LA & Matrisian LM (1997) Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Molecular human reproduction* 3(1):27-45.
- Hurst NG, Stocken DD, Wilson S, Keh C, Wakelam MJ & Ismail T (2007) Elevated serum matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) concentration predicts the presence of colorectal neoplasia in symptomatic patients. *Br J Cancer* 97(7):971-977.
- Huwiler A, Akool el S, Aschrafi A, Hamada FM, Pfeilschifter J & Eberhardt W (2003) ATP potentiates interleukin-1 beta-induced MMP-9 expression in mesangial cells via recruitment of the ELAV protein HuR. *The Journal of biological chemistry* 278(51):51758-51769.
- IARC (2016) *Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012*. IARC, (Lyon, France), <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx> (Consulté le 3 août 2016)
- Inohara H & Raz A (1995) Functional evidence that cell surface galectin-3 mediates homotypic cell adhesion. *Cancer research* 55(15):3267-3271.

- Iqbal AJ, Sampaio AL, Maione F, Greco KV, Niki T, Hirashima M, Perretti M & Cooper D (2011) Endogenous galectin-1 and acute inflammation: emerging notion of a galectin-9 pro-resolving effect. *The American journal of pathology* 178(3):1201-1209.
- Ito TK, Ishii G, Saito S, Yano K, Hoshino A, Suzuki T & Ochiai A (2009) Degradation of soluble VEGF receptor-1 by MMP-7 allows VEGF access to endothelial cells. *Blood* 113(10):2363-2369.
- Itoh T, Tanioka M, Yoshida H, Yoshioka T, Nishimoto H & Itohara S (1998) Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer research* 58(5):1048-1051.
- Jones PA & Baylin SB (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature reviews. Genetics* 3(6):415-428.
- Joyce JA & Pollard JW (2009) Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature reviews. Cancer* 9(4):239-252.
- Kalan M, Witczak A, Mosiewicz J & Donica H (2015) [The involvement of galectin-3 in heart failure]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 69:1107-1113.
- Kallioniemi A (2012) Bone morphogenetic protein 4-a fascinating regulator of cancer cell behavior. *Cancer genetics* 205(6):267-277.
- Kaplan RN, Rafii S & Lyden D (2006) Preparing the "soil": the premetastatic niche. *Cancer research* 66(23):11089-11093.
- Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, MacDonald DD, Jin DK, Shido K, Kerns SA, Zhu Z, Hicklin D, Wu Y, Port JL, Altorki N, Port ER, Ruggero D, Shmelkov SV, Jensen KK, Rafii S & Lyden D (2005) VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 438(7069):820-827.
- Kaur M, Kaur T, Kamboj SS & Singh J (2016) Roles of Galectin-7 in Cancer. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 17(2):455-461.
- Kerr LD, Miller DB & Matrisian LM (1990) TGF-beta 1 inhibition of transin/stromelysin gene expression is mediated through a Fos binding sequence. *Cell* 61(2):267-278.
- Kessenbrock K, Plaks V & Werb Z (2010) Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 141(1):52-67.
- Key TJ, Spencer EA & Reeves GK (2010) Symposium 1: Overnutrition: consequences and solutions. Obesity and cancer risk. *The Proceedings of the Nutrition Society* 69(1):86-90.
- Khong HT, Yang JC, Topalian SL, Sherry RM, Mavroukakis SA, White DE & Rosenberg SA (2004) Immunization of HLA-A*0201 and/or HLA-DPbeta1*04 patients with metastatic melanoma using epitopes from the NY-ESO-1 antigen. *J Immunother* 27(6):472-477.
- Kim DW, Kim KH, Yoo BC, Hong SH, Lim YC, Shin YK & Park JG (2008) Identification of mitochondrial F(1)F(0)-ATP synthase interacting with galectin-3 in colon cancer cells. *Cancer science* 99(10):1884-1891.
- Kim HJ, Jeon HK, Lee JK, Sung CO, Do IG, Choi CH, Kim TJ, Kim BG, Bae DS & Lee JW (2013a) Clinical significance of galectin-7 in epithelial ovarian cancer. *Anticancer research* 33(4):1555-1561.
- Kim HR, Lin HM, Biliran H & Raz A (1999) Cell cycle arrest and inhibition of anoikis by galectin-3 in human breast epithelial cells. *Cancer research* 59(16):4148-4154.
- Kim MP, Zhang Y & Lozano G (2015) Mutant p53: Multiple Mechanisms Define Biologic Activity in Cancer. *Frontiers in oncology* 5:249.
- Kim SJ, Hwang JA, Ro JY, Lee YS & Chun KH (2013b) Galectin-7 is epigenetically-regulated tumor suppressor in gastric cancer. *Oncotarget* 4(9):1461-1471.
- Klune JR, Dhupar R, Cardinal J, Billiar TR & Tsung A (2008) HMGB1: endogenous danger signaling. *Mol Med* 14(7-8):476-484.
- Konstantinopoulos PA, Karamouzis MV, Papatsoris AG & Papavassiliou AG (2008) Matrix metalloproteinase inhibitors as anticancer agents. *Int J Biochem Cell Biol* 40(6-7):1156-1168.

- Kopitz J, Andre S, von Reitzenstein C, Versluis K, Kaltner H, Pieters RJ, Wasano K, Kuwabara I, Liu FT, Cantz M, Heck AJ & Gabius HJ (2003) Homodimeric galectin-7 (p53-induced gene 1) is a negative growth regulator for human neuroblastoma cells. *Oncogene* 22(40):6277-6288.
- Koshikawa N, Giannelli G, Cirulli V, Miyazaki K & Quaranta V (2000) Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5. *The Journal of cell biology* 148(3):615-624.
- Kusumi A, Fujiwara TK, Morone N, Yoshida KJ, Chadda R, Xie M, Kasai RS & Suzuki KG (2012) Membrane mechanisms for signal transduction: the coupling of the meso-scale raft domains to membrane-skeleton-induced compartments and dynamic protein complexes. *Seminars in cell & developmental biology* 23(2):126-144.
- Kuwabara I, Kuwabara Y, Yang RY, Schuler M, Green DR, Zuraw BL, Hsu DK & Liu FT (2002) Galectin-7 (PIG1) exhibits pro-apoptotic function through JNK activation and mitochondrial cytochrome c release. *The Journal of biological chemistry* 277(5):3487-3497.
- Kuwabara I & Liu FT (1996) Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. *J Immunol* 156(10):3939-3944.
- Kwan JA, Schulze CJ, Wang W, Leon H, Sariahmetoglu M, Sung M, Sawicka J, Sims DE, Sawicki G & Schulz R (2004) Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is present in the nucleus of cardiac myocytes and is capable of cleaving poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in vitro. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18(6):690-692.
- Labrie M, Vladoiu M, Leclerc BG, Grosset AA, Gaboury L, Stagg J & St-Pierre Y (2015) A Mutation in the Carbohydrate Recognition Domain Drives a Phenotypic Switch in the Role of Galectin-7 in Prostate Cancer. *PloS one* 10(7):e0131307.
- Labrie M, Vladoiu MC, Grosset AA, Gaboury L & St-Pierre Y (2014) Expression and functions of galectin-7 in ovarian cancer. *Oncotarget* 5(17):7705-7721.
- Lachenmeier DW, Przybylski MC & Rehm J (2012) Comparative risk assessment of carcinogens in alcoholic beverages using the margin of exposure approach. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 131(6):E995-1003.
- Laderach DJ, Gentilini L, Jaworski FM & Compagno D (2013) Galectins as new prognostic markers and potential therapeutic targets for advanced prostate cancers. *Prostate cancer* 2013:519436.
- Lajoie P, Goetz JG, Dennis JW & Nabi IR (2009) Lattices, rafts, and scaffolds: domain regulation of receptor signaling at the plasma membrane. *The Journal of cell biology* 185(3):381-385.
- Landau M & Fagien S (2015) Science of Hyaluronic Acid Beyond Filling: Fibroblasts and Their Response to the Extracellular Matrix. *Plastic and reconstructive surgery* 136(5 Suppl):188S-195S.
- Lau KS, Partridge EA, Grigorian A, Silvescu CI, Reinhold VN, Demetriou M & Dennis JW (2007) Complex N-glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation. *Cell* 129(1):123-134.
- Lee H, O'Meara SJ, O'Brien C & Kane R (2007) The role of gremlin, a BMP antagonist, and epithelial-to-mesenchymal transition in proliferative vitreoretinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science* 48(9):4291-4299.
- Lee KH & Kim JR (2009) Kiss-1 suppresses MMP-9 expression by activating p38 MAP kinase in human stomach cancer. *Oncology research* 18(2-3):107-116.
- Lee LY, Wu CM, Wang CC, Yu JS, Liang Y, Huang KH, Lo CH & Hwang TL (2008) Expression of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in gastric cancer and their relation to claudin-4 expression. *Histology and histopathology* 23(5):515-521.
- Lee MH, Rapti M, Knauper V & Murphy G (2004) Threonine 98, the pivotal residue of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 in metalloproteinase recognition. *The Journal of biological chemistry* 279(17):17562-17569.
- Leffler H, Carlsson S, Hedlund M, Qian Y & Poirier F (2004) Introduction to galectins. *Glycoconjugate journal* 19(7-9):433-440.

- Lemaitre V & D'Armiento J (2006) Matrix metalloproteinases in development and disease. *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews* 78(1):1-10.
- 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, Domic J, Nilsson UJ & Leffler H (2012) Galectin-3 endocytosis by carbohydrate independent and dependent pathways in different macrophage like cell types. *Biochimica et biophysica acta* 1820(7):804-818.
- Li D, de Glas NA & Hurria A (2016) Cancer and Aging: General Principles, Biology, and Geriatric Assessment. *Clinics in geriatric medicine* 32(1):1-15.
- Li H, Zhang K, Liu LH, Ouyang Y, Bu J, Guo HB & Xiao T (2014) A systematic review of matrix metalloproteinase 9 as a biomarker of survival in patients with osteosarcoma. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 35(6):5487-5491.
- Li J, Sun C, Yuan Y, Liu L, Xiong G & Wu J (2012) Bone morphogenetic protein-4 polymorphism and colorectal cancer risk: a meta analysis. *Molecular biology reports* 39(5):5239-5251.
- Li SL, Zhao JR, Ren XY, Xie JP, Ma QZ & Rong QH (2013) Increased expression of matrix metalloproteinase-9 associated with gastric ulcer recurrence. *World journal of gastroenterology* 19(28):4590-4595.
- Liao D & Johnson RS (2007) Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer metastasis reviews* 26(2):281-290.
- Lim MJ, Ahn J, Yi JY, Kim MH, Son AR, Lee SL, Lim DS, Kim SS, Kang MA, Han Y & Song JY (2014) Induction of galectin-1 by TGF-beta1 accelerates fibrosis through enhancing nuclear retention of Smad2. *Experimental cell research* 326(1):125-135.
- Lin HM, Pestell RG, Raz A & Kim HR (2002) Galectin-3 enhances cyclin D(1) promoter activity through SP1 and a cAMP-responsive element in human breast epithelial cells. *Oncogene* 21(52):8001-8010.
- Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM & Shafie S (1980) Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 284(5751):67-68.
- Littlepage LE, Sternlicht MD, Rougier N, Phillips J, Gallo E, Yu Y, Williams K, Brenot A, Gordon JI & Werb Z (2010) Matrix metalloproteinases contribute distinct roles in neuroendocrine prostate carcinogenesis, metastasis, and angiogenesis progression. *Cancer research* 70(6):2224-2234.
- Liu FT, Patterson RJ & Wang JL (2002) Intracellular functions of galectins. *Biochimica et biophysica acta* 1572(2-3):263-273.
- Liu FT & Rabinovich GA (2005) Galectins as modulators of tumour progression. *Nature reviews. Cancer* 5(1):29-41.
- Liu L, Sakai T, Sano N & Fukui K (2004) Nucling mediates apoptosis by inhibiting expression of galectin-3 through interference with nuclear factor kappaB signalling. *The Biochemical journal* 380(Pt 1):31-41.
- Loaiza N & Demaria M (2016) Cellular senescence and tumor promotion: Is aging the key? *Biochimica et biophysica acta* 1865(2):155-167.
- Lochter A, Galosy S, Muschler J, Freedman N, Werb Z & Bissell MJ (1997) Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *The Journal of cell biology* 139(7):1861-1872.
- Loeb LA, Loeb KR & Anderson JP (2003) Multiple mutations and cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(3):776-781.
- Lotan R, Belloni PN, Tressler RJ, Lotan D, Xu XC & Nicolson GL (1994) Expression of galectins on microvessel endothelial cells and their involvement in tumour cell adhesion. *Glycoconjugate journal* 11(5):462-468.

- Luo Z, Ji Y, Zhou H, Huang X, Fang J, Guo H, Pan T & Chen ZK (2013) Galectin-7 in cardiac allografts in mice: increased expression compared with isografts and localization in infiltrating lymphocytes and vascular endothelial cells. *Transplantation proceedings* 45(2):630-634.
- Machiels JP & Schmitz S (2015) Epidermal Growth Factor Receptor Inhibition in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Hematology/oncology clinics of North America* 29(6):1011-1032.
- Macia E, Ehrlich M, Massol R, Boucrot E, Brunner C & Kirchhausen T (2006) Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Developmental cell* 10(6):839-850.
- Madar S, Goldstein I & Rotter V (2013) 'Cancer associated fibroblasts'--more than meets the eye. *Trends in molecular medicine* 19(8):447-453.
- Madsen P, Rasmussen HH, Flint T, Gromov P, Kruse TA, Honore B, Vorum H & Celis JE (1995) Cloning, expression, and chromosome mapping of human galectin-7. *The Journal of biological chemistry* 270(11):5823-5829.
- Magnaldo T, Fowles D & Darmon M (1998) Galectin-7, a marker of all types of stratified epithelia. *Differentiation; research in biological diversity* 63(3):159-168.
- Mancini A & Di Battista JA (2006) Transcriptional regulation of matrix metalloprotease gene expression in health and disease. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 11:423-446.
- Mandair DS, Rossi RE, Pericleous M, Whyand T & Caplin M (2014) The impact of diet and nutrition in the prevention and progression of hepatocellular carcinoma. *Expert review of gastroenterology & hepatology* 8(4):369-382.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A & Locati M (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology* 25(12):677-686.
- Markowska AI, Jefferies KC & Panjwani N (2011) Galectin-3 protein modulates cell surface expression and activation of vascular endothelial growth factor receptor 2 in human endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 286(34):29913-29921.
- Markowska AI, Liu FT & Panjwani N (2010) Galectin-3 is an important mediator of VEGF- and bFGF-mediated angiogenic response. *The Journal of experimental medicine* 207(9):1981-1993.
- Marth JD & Grewal PK (2008) Mammalian glycosylation in immunity. *Nature reviews. Immunology* 8(11):874-887.
- Martin DC, Fowlkes JL, Babic B & Khokha R (1999) Insulin-like growth factor II signaling in neoplastic proliferation is blocked by transgenic expression of the metalloproteinase inhibitor TIMP-1. *The Journal of cell biology* 146(4):881-892.
- Massague J (2008) TGFbeta in Cancer. *Cell* 134(2):215-230.
- Massova I, Kotra LP, Fridman R & Mobashery S (1998) Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 12(12):1075-1095.
- Matarrese P, Fusco O, Tinari N, Natoli C, Liu FT, Semeraro ML, Malorni W & Iacobelli S (2000) Galectin-3 overexpression protects from apoptosis by improving cell adhesion properties. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 85(4):545-554.
- Mauris J, Woodward AM, Cao Z, Panjwani N & Argueso P (2014) Molecular basis for MMP9 induction and disruption of epithelial cell-cell contacts by galectin-3. *Journal of cell science* 127(Pt 14):3141-3148.
- McCullough PA, Olobatoke A & Vanhecke TE (2011) Galectin-3: a novel blood test for the evaluation and management of patients with heart failure. *Reviews in cardiovascular medicine* 12(4):200-210.
- McMahon HT & Boucrot E (2011) Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nature reviews. Molecular cell biology* 12(8):517-533.

- Mejean A & Leuret T (2008) [The metastatic cascade: angiogenesis and new concepts]. *Progres en urologie : journal de l'Association francaise d'urologie et de la Societe francaise d'urologie* 18 Suppl 7:S156-166.
- Merlin J, Stechly L, de Beauce S, Monte D, Leteurtre E, van Seuning I, Huet G & Pigny P (2011) Galectin-3 regulates MUC1 and EGFR cellular distribution and EGFR downstream pathways in pancreatic cancer cells. *Oncogene* 30(22):2514-2525.
- Mishra BB, Li Q, Steichen AL, Binstock BJ, Metzger DW, Teale JM & Sharma J (2013a) Galectin-3 Functions as an Alarmin: Pathogenic Role for Sepsis Development in Murine Respiratory Tularemia. *PLoS one* 8(3).
- Mishra BB, Li Q, Steichen AL, Binstock BJ, Metzger DW, Teale JM & Sharma J (2013b) Galectin-3 functions as an alarmin: pathogenic role for sepsis development in murine respiratory tularemia. *PLoS one* 8(3):e59616.
- Mitsiades N, Yu WH, Poulaki V, Tsokos M & Stamenkovic I (2001) Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity. *Cancer research* 61(2):577-581.
- Mittelstadt ML & Patel RC (2012) AP-1 mediated transcriptional repression of matrix metalloproteinase-9 by recruitment of histone deacetylase 1 in response to interferon beta. *PLoS one* 7(8):e42152.
- Moisan S, Demers M, Mercier J, Magnaldo T, Potworowski EF & St-Pierre Y (2003) Upregulation of galectin-7 in murine lymphoma cells is associated with progression toward an aggressive phenotype. *Leukemia* 17(4):751-759.
- Moremen KW, Tiemeyer M & Nairn AV (2012) Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nature reviews. Molecular cell biology* 13(7):448-462.
- Moriyama K, Kukita A, Li YJ, Uehara N, Zhang JQ, Takahashi I & Kukita T (2014) Regulation of osteoclastogenesis through Tim-3: possible involvement of the Tim-3/galectin-9 system in the modulation of inflammatory bone destruction. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 94(11):1200-1211.
- Morris S, Ahmad N, Andre S, Kaltner H, Gabius HJ, Brenowitz M & Brewer F (2004) Quaternary solution structures of galectins-1, -3, and -7. *Glycobiology* 14(3):293-300.
- Moutsatsos IK, Wade M, Schindler M & Wang JL (1987) Endogenous lectins from cultured cells: nuclear localization of carbohydrate-binding protein 35 in proliferating 3T3 fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84(18):6452-6456.
- Muenst S, Laubli H, Soysal SD, Zippelius A, Tzankov A & Hoeller S (2016) The immune system and cancer evasion strategies: therapeutic concepts. *Journal of internal medicine* 10.1111/joim.12470.
- Murphy G (2011) Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome biology* 12(11):233.
- Musial K & Zwolinska D (2011) Matrix metalloproteinases and soluble Fas/FasL system as novel regulators of apoptosis in children and young adults on chronic dialysis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 16(7):653-659.
- Nabeshima K, Lane WS & Biswas C (1991) Partial sequencing and characterization of the tumor cell-derived collagenase stimulatory factor. *Archives of biochemistry and biophysics* 285(1):90-96.
- Nabi IR, Shankar J & Dennis JW (2015) The galectin lattice at a glance. *Journal of cell science* 128(13):2213-2219.
- Nagase H, Visse R & Murphy G (2006) Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular research* 69(3):562-573.
- Nakajima K, Kho DH, Yanagawa T, Harazono Y, Hogan V, Chen W, Ali-Fehmi R, Mehra R & Raz A (2016) Galectin-3 Cleavage Alters Bone Remodeling: Different Outcomes in Breast and Prostate Cancer Skeletal Metastasis. *Cancer research* 76(6):1391-1402.

- Nangia-Makker P, Wang Y, Raz T, Tait L, Balan V, Hogan V & Raz A (2010) Cleavage of galectin-3 by matrix metalloproteases induces angiogenesis in breast cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 127(11):2530-2541.
- Newell KJ, Witty JP, Rodgers WH & Matrisian LM (1994) Expression and localization of matrix-degrading metalloproteinases during colorectal tumorigenesis. *Molecular carcinogenesis* 10(4):199-206.
- Nguyen M, Folkman J & Bischoff J (1992) 1-Deoxymannojirimycin inhibits capillary tube formation in vitro. Analysis of N-linked oligosaccharides in bovine capillary endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 267(36):26157-26165.
- Nickel W (2003) The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes. *European journal of biochemistry / FEBS* 270(10):2109-2119.
- Nieminen J, St-Pierre C & Sato S (2005) Galectin-3 interacts with naive and primed neutrophils, inducing innate immune responses. *Journal of leukocyte biology* 78(5):1127-1135.
- Ochieng J, Fridman R, Nangia-Makker P, Kleiner DE, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG & Raz A (1994) Galectin-3 is a novel substrate for human matrix metalloproteinases-2 and -9. *Biochemistry* 33(47):14109-14114.
- Ochieng J, Leite-Browning ML & Warfield P (1998) Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3. *Biochemical and biophysical research communications* 246(3):788-791.
- Ogawa K, Chen FF, Kuang CZ & Chen Y (2004) Suppression of matrix metalloproteinase-9 transcription by transforming growth factor-beta is mediated by a nuclear factor-kappa B site. *Biochemical Journal* 381:413-422.
- Oka N, Nakahara S, Takenaka Y, Fukumori T, Hogan V, Kanayama HO, Yanagawa T & Raz A (2005) Galectin-3 inhibits tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by activating Akt in human bladder carcinoma cells. *Cancer research* 65(17):7546-7553.
- Okamoto T, Akaike T, Sawa T, Miyamoto Y, van der Vliet A & Maeda H (2001) Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite-induced protein S-glutathiolation via disulfide S-oxide formation. *The Journal of biological chemistry* 276(31):29596-29602.
- Opdenakker G & Van Damme J (1994) Cytokine-regulated proteases in autoimmune diseases. *Immunology today* 15(3):103-107.
- Ose R, Oharaa O & Nagase T (2012) Galectin-1 and Galectin-3 Mediate Protocadherin-24-Dependent Membrane Localization of beta-catenin in Colon Cancer Cell Line HCT116. *Current chemical genomics* 6:18-26.
- Ostergaard M, Rasmussen HH, Nielsen HV, Vorum H, Orntoft TF, Wolf H & Celis JE (1997) Proteome profiling of bladder squamous cell carcinomas: identification of markers that define their degree of differentiation. *Cancer research* 57(18):4111-4117.
- Paemen L, Olsson T, Soderstrom M, van Damme J & Opdenakker G (1994) Evaluation of gelatinases and IL-6 in the cerebrospinal fluid of patients with optic neuritis, multiple sclerosis and other inflammatory neurological diseases. *European journal of neurology* 1(1):55-63.
- Page-McCaw A, Ewald AJ & Werb Z (2007) Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8(3):221-233.
- Panjwani N (2014) Role of galectins in re-epithelialization of wounds. *Annals of translational medicine* 2(9):89.
- Park HJ, Partridge E, Cheung P, Pawling J, Donovan R, Wrana JL & Dennis JW (2006) Chemical enhancers of cytokine signaling that suppress microfilament turnover and tumor cell growth. *Cancer research* 66(7):3558-3566.
- Park JE, Chang WY & Cho M (2009) Induction of matrix metalloproteinase-9 by galectin-7 through p38 MAPK signaling in HeLa human cervical epithelial adenocarcinoma cells. *Oncology reports* 22(6):1373-1379.

- Park JW, Voss PG, Grabski S, Wang JL & Patterson RJ (2001) Association of galectin-1 and galectin-3 with Gemin4 in complexes containing the SMN protein. *Nucleic acids research* 29(17):3595-3602.
- Park MJ, Park IC, Hur JH, Kim MS, Lee HC, Woo SH, Lee KH, Rhee CH, Hong SI & Lee SH (2002) Modulation of phorbol ester-induced regulation of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases by SB203580, a specific inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase. *Journal of neurosurgery* 97(1):112-118.
- Parks WC, Wilson CL & Lopez-Boado YS (2004) Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nature reviews. Immunology* 4(8):617-629.
- Paron I, Scaloni A, Pines A, Bachi A, Liu FT, Puppini C, Pandolfi M, Ledda L, Di Loreto C, Damante G & Tell G (2003) Nuclear localization of Galectin-3 in transformed thyroid cells: a role in transcriptional regulation. *Biochemical and biophysical research communications* 302(3):545-553.
- Parsons-Wingerter P, Chandrasekharan UM, McKay TL, Radhakrishnan K, DiCorleto PE, Albarran B & Farr AG (2006) A VEGF165-induced phenotypic switch from increased vessel density to increased vessel diameter and increased endothelial NOS activity. *Microvascular research* 72(3):91-100.
- Parvanescu V, Georgescu M, Georgescu I, Surlin V, Patrascu S, Picleanu AM & Georgescu E (2015) The Role of Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) as a Prognostic Factor in Epithelial and Lymphatic Neoplasia. *Chirurgia (Bucur)* 110(6):506-510.
- Patnaik SK, Potvin B, Carlsson S, Sturm D, Leffler H & Stanley P (2006) Complex N-glycans are the major ligands for galectin-1, -3, and -8 on Chinese hamster ovary cells. *Glycobiology* 16(4):305-317.
- 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.
- Peltomaki P (1997) DNA mismatch repair gene mutations in human cancer. *Environmental health perspectives* 105 Suppl 4:775-780.
- Perez Bay AE, Schreiner R, Benedicto I & Rodriguez-Boulan EJ (2014) Galectin-4-mediated transcytosis of transferrin receptor. *Journal of cell science* 127(Pt 20):4457-4469.
- Peters DG, Kassam A, St Jean PL, Yonas H & Ferrell RE (1999) Functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-9 promoter as a potential risk factor for intracranial aneurysm. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 30(12):2612-2616.
- Petrie RJ, Doyle AD & Yamada KM (2009) Random versus directionally persistent cell migration. *Nature reviews. Molecular cell biology* 10(8):538-549.
- Philip S, Bulbule A & Kundu GC (2004) Matrix metalloproteinase-2: mechanism and regulation of NF-kappaB-mediated activation and its role in cell motility and ECM-invasion. *Glycoconjugate journal* 21(8-9):429-441.
- Pilcher BK, Dumin JA, Sudbeck BD, Krane SM, Welgus HG & Parks WC (1997) The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. *The Journal of cell biology* 137(6):1445-1457.
- Pilka R, Kudela M & Prochazka M (2003) [Matrix metalloproteinases, embryo implantation and tumor invasion]. *Ceska gynekologie / Ceska lekarska spolecnost J. Ev. Purkyne* 68(3):179-185.
- Polakis P (1999) The oncogenic activation of beta-catenin. *Current opinion in genetics & development* 9(1):15-21.
- Pollard JW (2008) Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer. *Journal of leukocyte biology* 84(3):623-630.
- Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW & Vogelstein B (1997) A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 389(6648):300-305.
- Pon JR & Marra MA (2015) Driver and passenger mutations in cancer. *Annual review of pathology* 10:25-50.

- Powell WC, Fingleton B, Wilson CL, Boothby M & Matrisian LM (1999) The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. *Current biology : CB* 9(24):1441-1447.
- Pucino V, De Rosa V, Procaccini C & Matarese G (2014) Regulatory T cells, leptin and angiogenesis. *Chemical immunology and allergy* 99:155-169.
- Puthenedam M, Wu F, Shetye A, Michaels A, Rhee KJ & Kwon JH (2011) Matrilysin-1 (MMP7) cleaves galectin-3 and inhibits wound healing in intestinal epithelial cells. *Inflammatory bowel diseases* 17(1):260-267.
- Qian BZ & Pollard JW (2010) Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141(1):39-51.
- Quinta HR, Wilson C, Blidner AG, Gonzalez-Billault C, Pasquini LA, Rabinovich GA & Pasquini JM (2016) Ligand-mediated Galectin-1 endocytosis prevents intraneural H₂O₂ production promoting F-actin dynamics reactivation and axonal re-growth. *Experimental neurology* 283(Pt A):165-178.
- Ra HJ & Parks WC (2007) Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 26(8):587-596.
- Rabinovich GA (2005) Galectin-1 as a potential cancer target. *Br J Cancer* 92(7):1188-1192.
- Rabinovich GA & Toscano MA (2009) Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nature reviews. Immunology* 9(5):338-352.
- Rabinovich GA, Toscano MA, Jackson SS & Vasta GR (2007) Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. *Current opinion in structural biology* 17(5):513-520.
- Raffetto JD & Khalil RA (2008) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol* 75(2):346-359.
- Rapoport EM, Kurmyshkina OV & Bovin NV (2008) Mammalian galectins: structure, carbohydrate specificity, and functions. *Biochemistry. Biokhimiia* 73(4):393-405.
- Ravanti L, Hakkinen L, Larjava H, Saarialho-Kere U, Foschi M, Han J & Kahari VM (1999) Transforming growth factor-beta induces collagenase-3 expression by human gingival fibroblasts via p38 mitogen-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry* 274(52):37292-37300.
- Raz A & Lotan R (1987) Endogenous galactoside-binding lectins: a new class of functional tumor cell surface molecules related to metastasis. *Cancer metastasis reviews* 6(3):433-452.
- Rehman AG, Tyson M, Egger M, Heller RF & Zwahlen M (2008) Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* 371(9612):569-578.
- Rohani MG & Parks WC (2015) Matrix remodeling by MMPs during wound repair. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 44-46:113-121.
- Rorive S, Eddafali B, Fernandez S, Decaestecker C, Andre S, Kaltner H, Kuwabara I, Liu FT, Gabius HJ, Kiss R & Salmon I (2002) Changes in galectin-7 and cytokeratin-19 expression during the progression of malignancy in thyroid tumors: diagnostic and biological implications. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 15(12):1294-1301.
- Rubinstein N, Alvarez M, Zwirner NW, Toscano MA, Ilarregui JM, Bravo A, Mordoh J, Fainboim L, Podhajcer OL & Rabinovich GA (2004) Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer cell* 5(3):241-251.
- Rudin CM, Durinck S, Stawiski EW, Poirier JT, Modrusan Z, Shames DS, Bergbower EA, Guan Y, Shin J, Guillory J, Rivers CS, Foo CK, Bhatt D, Stinson J, Gnad F, Haverty PM, Gentleman R, Chaudhuri S, Janakiraman V, Jaiswal BS, Parikh C, Yuan W, Zhang Z, Koeppen H, Wu TD, Stern HM, Yauch RL, Huffman KE, Paskulin DD, Illei PB, Varella-Garcia M, Gazdar AF, de Sauvage FJ, Bourgon R, Minna JD, Brock MV & Seshagiri S (2012) Comprehensive genomic analysis identifies SOX2 as a frequently amplified gene in small-cell lung cancer. *Nature genetics* 44(10):1111-1116.

- Rydziel S, Delany AM & Canalis E (2004) AU-rich elements in the collagenase 3 mRNA mediate stabilization of the transcript by cortisol in osteoblasts. *The Journal of biological chemistry* 279(7):5397-5404.
- Salazar VS, Gamer LW & Rosen V (2016) BMP signalling in skeletal development, disease and repair. *Nature reviews. Endocrinology* 12(4):203-221.
- Sanjuan X, Fernandez PL, Castells A, Castronovo V, van den Brule F, Liu FT, Cardesa A & Campo E (1997) Differential expression of galectin 3 and galectin 1 in colorectal cancer progression. *Gastroenterology* 113(6):1906-1915.
- Saravanan C, Liu FT, Gipson IK & Panjwani N (2009) Galectin-3 promotes lamellipodia formation in epithelial cells by interacting with complex N-glycans on alpha3beta1 integrin. *Journal of cell science* 122(Pt 20):3684-3693.
- Saussez S, Decaestecker C, Lorfèvre F, Chevalier D, Mortuaire G, Kaltner H, Andre S, Toubreau G, Gabius HJ & Leroy X (2008) Increased expression and altered intracellular distribution of adhesion/growth-regulatory lectins galectins-1 and -7 during tumour progression in hypopharyngeal and laryngeal squamous cell carcinomas. *Histopathology* 52(4):483-493.
- Saussez S & Kiss R (2006) Galectin-7. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 63(6):686-697.
- Sceney J, Smyth MJ & Moller A (2013) The pre-metastatic niche: finding common ground. *Cancer Metast Rev* 32(3-4):449-464.
- Schneider D, Greb C, Koch A, Straube T, Elli A, Delacour D & Jacob R (2010) Trafficking of galectin-3 through endosomal organelles of polarized and non-polarized cells. *European journal of cell biology* 89(11):788-798.
- Seetharaman J, Kanigsberg A, Slaaby R, Leffler H, Barondes SH & Rini JM (1998) X-ray crystal structure of the human galectin-3 carbohydrate recognition domain at 2.1-Å resolution. *The Journal of biological chemistry* 273(21):13047-13052.
- Seiki M (2003) Membrane-type 1 matrix metalloproteinase: a key enzyme for tumor invasion. *Cancer letters* 194(1):1-11.
- Seropian IM, Cerliani JP, Toldo S, Van Tassell BW, Ilarregui JM, Gonzalez GE, Matoso M, Salloum FN, Melchior R, Gelpi RJ, Stupirski JC, Benatar A, Gomez KA, Morales C, Abbate A & Rabinovich GA (2013) Galectin-1 controls cardiac inflammation and ventricular remodeling during acute myocardial infarction. *The American journal of pathology* 182(1):29-40.
- Shah SP, Roth A, Goya R, Oloumi A, Ha G, Zhao Y, Turashvili G, Ding J, Tse K, Haffari G, Bashashati A, Prentice LM, Khattra J, Burleigh A, Yap D, Bernard V, McPherson A, Shumansky K, Crisan A, Giuliany R, Heravi-Moussavi A, Rosner J, Lai D, Birol I, Varhol R, Tam A, Dhalla N, Zeng T, Ma K, Chan SK, Griffith M, Moradian A, Cheng SW, Morin GB, Watson P, Gelmon K, Chia S, Chin SF, Curtis C, Rueda OM, Pharoah PD, Damaraju S, Mackey J, Hoon K, Harkins T, Tadigotla V, Sigaroudinia M, Gascard P, Tlsty T, Costello JF, Meyer IM, Eaves CJ, Wasserman WW, Jones S, Huntsman D, Hirst M, Caldas C, Marra MA & Aparicio S (2012) The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature* 486(7403):395-399.
- Sharma S, Kelly TK & Jones PA (2010) Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 31(1):27-36.
- Sharma SV, Bell DW, Settleman J & Haber DA (2007) Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nature reviews. Cancer* 7(3):169-181.
- Sheu BC, Hsu SM, Ho HN, Lien HC, Huang SC & Lin RH (2001) A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression. *Cancer research* 61(1):237-242.
- Shiga K, Hara M, Nagasaki T, Sato T, Takahashi H & Takeyama H (2015) Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth. *Cancers* 7(4):2443-2458.
- Shim JH, Greenblatt MB, Xie M, Schneider MD, Zou W, Zhai B, Gygi S & Glimcher LH (2009) TAK1 is an essential regulator of BMP signalling in cartilage. *The EMBO journal* 28(14):2028-2041.

- Shimura T, Takenaka Y, Tsutsumi S, Hogan V, Kikuchi A & Raz A (2004) Galectin-3, a novel binding partner of beta-catenin. *Cancer research* 64(18):6363-6367.
- Shukla SA, Rooney MS, Rajasagi M, Tiao G, Dixon PM, Lawrence MS, Stevens J, Lane WJ, Dellagatta JL, Steelman S, Sougnez C, Cibulskis K, Kiezun A, Hacohen N, Brusic V, Wu CJ & Getz G (2015) Comprehensive analysis of cancer-associated somatic mutations in class I HLA genes. *Nature biotechnology* 33(11):1152-1158.
- Singh R, Kaur B, Kalina I, Popov TA, Georgieva T, Garte S, Binkova B, Sram RJ, Taioli E & Farmer PB (2007) Effects of environmental air pollution on endogenous oxidative DNA damage in humans. *Mutation research* 620(1-2):71-82.
- Soeberg M, Blakely T & Sarfati D (2015) Trends in ethnic and socioeconomic inequalities in cancer survival, New Zealand, 1991-2004. *Cancer epidemiology* 39(6):860-862.
- Somerville RP, Oblander SA & Apte SS (2003) Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome biology* 4(6):216.
- Sounni NE, Devy L, Hajitou A, Frankenne F, Munaut C, Gilles C, Deroanne C, Thompson EW, Foidart JM & Noel A (2002) MT1-MMP expression promotes tumor growth and angiogenesis through an up-regulation of vascular endothelial growth factor expression. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16(6):555-564.
- St-Pierre C, Many H, Ouellet M, Clark GF, Endo T, Tremblay MJ & Sato S (2011) Host-soluble galectin-1 promotes HIV-1 replication through a direct interaction with glycans of viral gp120 and host CD4. *Journal of virology* 85(22):11742-11751.
- St-Pierre Y, Champion CG & Grosset AA (2012) A distinctive role for galectin-7 in cancer ? *Front Biosci (Landmark Ed)* 17:438-450.
- Steichen AL, Simonson TJ, Salmon SL, Metzger DW, Mishra BB & Sharma J (2015) Alarmin function of galectin-9 in murine respiratory tularemia. *PLoS one* 10(4):e0123573.
- Stowell SR, Arthur CM, Mehta P, Slanina KA, Blixt O, Leffler H, Smith DF & Cummings RD (2008a) Galectin-1, -2, and -3 exhibit differential recognition of sialylated glycans and blood group antigens. *The Journal of biological chemistry* 283(15):10109-10123.
- Stowell SR, Ju T & Cummings RD (2015) Protein glycosylation in cancer. *Annual review of pathology* 10:473-510.
- Stowell SR, Qian Y, Karmakar S, Koyama NS, Dias-Baruffi M, Leffler H, McEver RP & Cummings RD (2008b) Differential roles of galectin-1 and galectin-3 in regulating leukocyte viability and cytokine secretion. *J Immunol* 180(5):3091-3102.
- Straube T, von Mach T, Honig 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.
- Sudarsanam S & Johnson DE (2010) Functional consequences of mTOR inhibition. *Current opinion in drug discovery & development* 13(1):31-40.
- Sun Y, Cheung JM, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Wenger L, Altman RD, Howell DS & Cheung HS (2000) Wild type and mutant p53 differentially regulate the gene expression of human collagenase-3 (hMMP-13). *The Journal of biological chemistry* 275(15):11327-11332.
- Sun Y, Sun Y, Wenger L, Rutter JL, Brinckerhoff CE & Cheung HS (1999) p53 down-regulates human matrix metalloproteinase-1 (Collagenase-1) gene expression. *The Journal of biological chemistry* 274(17):11535-11540.
- Susiarjo M, Sasson I, Mesaros C & Bartolomei MS (2013) Bisphenol a exposure disrupts genomic imprinting in the mouse. *Plos Genet* 9(4):e1003401.
- Svalina MN, Kikuchi K, Abraham J, Lal S, Davare MA, Settelmeyer TP, Young MC, Peckham JL, Cho YJ, Michalek JE, Hernandez BS, Berlow NE, Jackson M, Guillaume DJ, Selden NR, Bigner DD, Nazemi KJ, Green SC, Corless CL, Gultekin S, Mansoor A, Rubin BP, Woltjer R & Keller C (2016) IGF1R as a Key Target in High Risk, Metastatic Medulloblastoma. *Scientific reports* 6:27012.

- Swartz MA, Iida N, Roberts EW, Sangaletti S, Wong MH, Yull FE, Coussens LM & DeClerck YA (2012) Tumor microenvironment complexity: emerging roles in cancer therapy. *Cancer research* 72(10):2473-2480.
- Takano J, Morishita A, Fujihara S, Iwama H, Kokado F, Fujikawa K, Fujita K, Chiyo T, Tadokoro T, Sakamoto T, Nomura T, Tani J, Miyoshi H, Yoneyama H, Kobara H, Mori H, Niki T, Hirashima M & Masaki T (2016) Galectin-9 suppresses the proliferation of gastric cancer cells in vitro. *Oncology reports* 35(2):851-860.
- Takashima A & Faller DV (2013) Targeting the RAS oncogene. *Expert opinion on therapeutic targets* 17(5):507-531.
- Takata T, Ishigaki Y, Shimasaki T, Tsuchida H, Motoo Y, Hayashi A & Tomosugi N (2012) Characterization of proteins secreted by pancreatic cancer cells with anticancer drug treatment in vitro. *Oncology reports* 28(6):1968-1976.
- Takenaka Y, Fukumori T, Yoshii T, Oka N, Inohara H, Kim HR, Bresalier RS & Raz A (2004) Nuclear export of phosphorylated galectin-3 regulates its antiapoptotic activity in response to chemotherapeutic drugs. *Molecular and cellular biology* 24(10):4395-4406.
- Takenaka Y, Inohara H, Yoshii T, Oshima K, Nakahara S, Akahani S, Honjo Y, Yamamoto Y, Raz A & Kubo T (2003) Malignant transformation of thyroid follicular cells by galectin-3. *Cancer letters* 195(1):111-119.
- Tanaka M, Nakajima T, Sugano K, Yoshida T, Taniguchi H, Kanemitsu Y, Nagino M & Sekine S (2016) Mismatch repair deficiency in Lynch syndrome-associated colorectal adenomas is more prevalent in older patients. *Histopathology* 10.1111/his.12941.
- Tang D, Kang R, Livesey KM, Cheh CW, Farkas A, Loughran P, Hoppe G, Bianchi ME, Tracey KJ, Zeh HJ, 3rd & Lotze MT (2010) Endogenous HMGB1 regulates autophagy. *The Journal of cell biology* 190(5):881-892.
- Tang M, Wei X, Guo Y, Breslin P, Zhang S, Zhang S, Wei W, Xia Z, Diaz M, Akira S & Zhang J (2008) TAK1 is required for the survival of hematopoietic cells and hepatocytes in mice. *The Journal of experimental medicine* 205(7):1611-1619.
- Tanikawa R, Tanikawa T, Hirashima M, Yamauchi A & Tanaka Y (2010) Galectin-9 induces osteoblast differentiation through the CD44/Smad signaling pathway. *Biochemical and biophysical research communications* 394(2):317-322.
- Tanioka Y, Yoshida T, Yagawa T, Saiki Y, Takeo S, Harada T, Okazawa T, Yanai H & Okita K (2003) Matrix metalloproteinase-7 and matrix metalloproteinase-9 are associated with unfavourable prognosis in superficial oesophageal cancer. *Br J Cancer* 89(11):2116-2121.
- Than NG, Romero R, Balogh A, Karpati 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. *Journal of pathology and translational medicine* 49(3):181-208.
- Thomas KA (1987) Fibroblast growth factors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1(6):434-440.
- Thomas RK, Baker AC, DeBiasi RM, Winckler W, Laframboise T, Lin WM, Wang M, Feng W, Zander T, MacConaill L, Lee JC, Nicoletti R, Hatton C, Goyette M, Girard L, Majmudar K, Ziaugra L, Wong KK, Gabriel S, Beroukhim R, Peyton M, Barretina J, Dutt A, Emery C, Greulich H, Shah K, Sasaki H, Gazdar A, Minna J, Armstrong SA, Mellinghoff IK, Hodi FS, Dranoff G, Mischel PS, Cloughesy TF, Nelson SF, Liau LM, Mertz K, Rubin MA, Moch H, Loda M, Catalona W, Fletcher J, Signoretti S, Kaye F, Anderson KC, Demetri GD, Dummer R, Wagner S, Herlyn M, Sellers WR, Meyerson M & Garraway LA (2007) High-throughput oncogene mutation profiling in human cancer. *Nature genetics* 39(3):347-351.

- Toole BP (2003) Emmpirin (CD147), a cell surface regulator of matrix metalloproteinase production and function. *Current topics in developmental biology* 54:371-389.
- Topfer K, Kempe S, Muller N, Schmitz M, Bachmann M, Cartellieri M, Schackert G & Temme A (2011) Tumor evasion from T cell surveillance. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011:918471.
- Toscano MA, Bianco GA, Ilarregui JM, Croci DO, Correale J, Hernandez JD, Zwirner NW, Poirier F, Riley EM, Baum LG & Rabinovich GA (2007) Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nature immunology* 8(8):825-834.
- Tribulatti MV, Mucci J, Cattaneo V, Aguero F, Gilmartin T, Head SR & Campetella O (2007) Galectin-8 induces apoptosis in the CD4(high)CD8(high) thymocyte subpopulation. *Glycobiology* 17(12):1404-1412.
- Tyner SD, Venkatachalam S, Choi J, Jones S, Ghebranious N, Igelmann H, Lu XB, Soron G, Cooper B, Brayton C, Park SH, Thompson T, Karsenty G, Bradley A & Donehower LA (2002) p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* 415(6867):45-53.
- Ueda S, Kuwabara I & Liu FT (2004) Suppression of tumor growth by galectin-7 gene transfer. *Cancer research* 64(16):5672-5676.
- Uzui H, Lee JD, Shimizu H, Tsutani H & Ueda T (2000) The role of protein-tyrosine phosphorylation and gelatinase production in the migration and proliferation of smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 149(1):51-59.
- Vaisanen A, Tuominen H, Kallioinen M & Turpeenniemi-Hujanen T (1996) Matrix metalloproteinase-2 (72 kD type IV collagenase) expression occurs in the early stage of human melanocytic tumour progression and may have prognostic value. *The Journal of pathology* 180(3):283-289.
- Vaisar T, Kassim SY, Gomez IG, Green PS, Hargarten S, Gough PJ, Parks WC, Wilson CL, Raines EW & Heinecke JW (2009) MMP-9 sheds the beta2 integrin subunit (CD18) from macrophages. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 8(5):1044-1060.
- Valente IR, Cortez PC, Neto EC, Soares JM, de Albuquerque VH & Tavares JM (2015) Automatic 3D pulmonary nodule detection in CT images: A survey. *Computer methods and programs in biomedicine* 10.1016/j.cmpb.2015.10.006.
- van den Brule 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. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 83(3):377-386.
- van den Brule FA, Waltregny D, Liu FT & Castronovo V (2000) Alteration of the cytoplasmic/nuclear expression pattern of galectin-3 correlates with prostate carcinoma progression. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 89(4):361-367.
- Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Rudd PM, Dwek RA & Opdenakker G (2002) Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 37(6):375-536.
- van der Hoeven NW, Hollander MR, Yildirim C, Jansen MF, Teunissen PF, Horrevoets AJ, van der Pouw Kraan TC & van Royen N (2016) The emerging role of galectins in cardiovascular disease. *Vascular pharmacology* 10.1016/j.vph.2016.02.006.
- Van Wart HE & Birkedal-Hansen H (1990) The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(14):5578-5582.
- Vandenbrule F, Bellahcene A, Jackers P, Liu F, Sobel M & Castronovo V (1997) Antisense galectin-3 alters thymidine incorporation in human MDA-MB435 breast cancer cells. *International journal of oncology* 11(2):261-264.

- Vander Heiden MG, Cantley LC & Thompson CB (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324(5930):1029-1033.
- Vasta GR (2009) Roles of galectins in infection. *Nature reviews. Microbiology* 7(6):424-438.
- Vasta GR, Feng C, Bianchet MA, Bachvaroff TR & Tasumi S (2015) Structural, functional, and evolutionary aspects of galectins in aquatic mollusks: From a sweet tooth to the Trojan horse. *Fish & shellfish immunology* 46(1):94-106.
- Vilen ST, Salo T, Sorsa T & Nyberg P (2013) Fluctuating roles of matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinoma. *TheScientificWorldJournal* 2013:920595.
- Villeneuve C, Baricault L, Canelle L, Barboule N, Racca C, Monsarrat B, Magnaldo T & Larminat F (2011) Mitochondrial proteomic approach reveals galectin-7 as a novel BCL-2 binding protein in human cells. *Molecular biology of the cell* 22(7):999-1013.
- Visse R & Nagase H (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation research* 92(8):827-839.
- Vladoiu MC, Labrie M, Letourneau M, Egesborg P, Gagne D, Billard E, Grosset AA, Doucet N, Chatenet D & St-Pierre Y (2015) Design of a peptidic inhibitor that targets the dimer interface of a prototypic galectin. *Oncotarget* 6(38):40970-40980.
- Vladoiu MC, Labrie M & St-Pierre Y (2014) Intracellular galectins in cancer cells: potential new targets for therapy (Review). *International journal of oncology* 44(4):1001-1014.
- Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Jr. & Kinzler KW (2013) Cancer genome landscapes. *Science* 339(6127):1546-1558.
- von Kleist L, Stahlschmidt W, Bulut H, Gromova K, Puchkov D, Robertson MJ, MacGregor KA, Tomilin N, Pechstein A, Chau N, Chircop M, Sakoff J, von Kries JP, Saenger W, Krausslich HG, Shupliakov O, Robinson PJ, McCluskey A & Haucke V (2011) Role of the clathrin terminal domain in regulating coated pit dynamics revealed by small molecule inhibition. *Cell* 146(3):471-484.
- Vu TH & Werb Z (2000) Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes & development* 14(17):2123-2133.
- Vyakarnam A, Dagher SF, Wang JL & Patterson RJ (1997) Evidence for a role for galectin-1 in pre-mRNA splicing. *Molecular and cellular biology* 17(8):4730-4737.
- Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A & Tracey KJ (1999) HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 285(5425):248-251.
- Wang Z, Juttermann R & Soloway PD (2000) TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 in vivo. *The Journal of biological chemistry* 275(34):26411-26415.
- Warfield PR, Makker PN, Raz A & Ochieng J (1997) Adhesion of human breast carcinoma to extracellular matrix proteins is modulated by galectin-3. *Invasion & metastasis* 17(2):101-112.
- Watari M, Watari H, DiSanto ME, Chacko S, Shi GP & Strauss JF, 3rd (1999) Pro-inflammatory cytokines induce expression of matrix-metabolizing enzymes in human cervical smooth muscle cells. *The American journal of pathology* 154(6):1755-1762.
- Watson MMC, Berg M & Soreide K (2014) Prevalence and implications of elevated microsatellite alterations at selected tetranucleotides in cancer. *Brit J Cancer* 111(5):823-827.
- Weinberg RA (2007) The biology of cancer. *Maintenance of genomic Integrity and the Development of Cancer*, E Z (Édit.) Taylor & Francis Group, New York.
- Westermarck J & Kahari VM (1999) Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13(8):781-792.

- White LA, Mitchell TI & Brinckerhoff CE (2000) Transforming growth factor beta inhibitory element in the rabbit matrix metalloproteinase-1 (collagenase-1) gene functions as a repressor of constitutive transcription. *Bba-Gene Struct Expr* 1490(3):259-268.
- Whitelock JM, Murdoch AD, Iozzo RV & Underwood PA (1996) The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. *The Journal of biological chemistry* 271(17):10079-10086.
- Wilgus TA, Roy S & McDaniel JC (2013) Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions. *Advances in wound care* 2(7):379-388.
- Witz IP & Levy-Nissenbaum O (2006) The tumor microenvironment in the post-PAGET era. *Cancer letters* 242(1):1-10.
- Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjoblom T, Leary RJ, Shen D, Boca SM, Barber T, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Dezso Z, Ustyanksky V, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Karchin R, Wilson PA, Kaminker JS, Zhang Z, Croshaw R, Willis J, Dawson D, Shipitsin M, Willson JK, Sukumar S, Polyak K, Park BH, Pethiyagoda CL, Pant PV, Ballinger DG, Sparks AB, Hartigan J, Smith DR, Suh E, Papadopoulos N, Buckhaults P, Markowitz SD, Parmigiani G, Kinzler KW, Velculescu VE & Vogelstein B (2007) The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* 318(5853):1108-1113.
- Xu J, Jiang Y, Wang J, Shi X, Liu Q, Liu Z, Li Y, Scott MJ, Xiao G, Li S, Fan L, Billiar TR, Wilson MA & Fan J (2014) Macrophage endocytosis of high-mobility group box 1 triggers pyroptosis. *Cell death and differentiation* 21(8):1229-1239.
- Xu J, Zhu D, Sonoda S, He S, Spee C, Ryan SJ & Hinton DR (2012) Over-expression of BMP4 inhibits experimental choroidal neovascularization by modulating VEGF and MMP-9. *Angiogenesis* 15(2):213-227.
- Xu X, Mikhailova M, Chen Z, Pal S, Robichaud TK, Lafer EM, Baber S & Steffensen B (2011) Peptide from the C-terminal domain of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-2 (TIMP-2) inhibits membrane activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2). *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 30(7-8):404-412.
- Yachida S, White CM, Naito Y, Zhong Y, Brosnan JA, Macgregor-Das AM, Morgan RA, Saunders T, Laheru DA, Herman JM, Hruban RH, Klein AP, Jones S, Velculescu V, Wolfgang CL & Iacobuzio-Donahue CA (2012) Clinical significance of the genetic landscape of pancreatic cancer and implications for identification of potential long-term survivors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 18(22):6339-6347.
- Yamaguchi H & Sakai R (2015) Direct Interaction between Carcinoma Cells and Cancer Associated Fibroblasts for the Regulation of Cancer Invasion. *Cancers* 7(4):2054-2062.
- Yamaoka K, Mishima K, Nagashima Y, Asai A, Sanai Y & Kirino T (2000) Expression of galectin-1 mRNA correlates with the malignant potential of human gliomas and expression of antisense galectin-1 inhibits the growth of 9 glioma cells. *Journal of neuroscience research* 59(6):722-730.
- Yan C, Wang H, Toh Y & Boyd DD (2003) Repression of 92-kDa type IV collagenase expression by MTA1 is mediated through direct interactions with the promoter via a mechanism, which is both dependent on and independent of histone deacetylation. *The Journal of biological chemistry* 278(4):2309-2316.
- Yang N, Cui H, Han F, Zhang L, Huang T, Zhou Y & Zhou J (2016) Paeoniflorin inhibits human pancreatic cancer cell apoptosis via suppression of MMP-9 and ERK signaling. *Oncology letters* 12(2):1471-1476.
- Yang RY, Hsu DK & Liu FT (1996) Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(13):6737-6742.

- Yang RY, Hsu DK, Yu L, Ni J & Liu FT (2001) Cell cycle regulation by galectin-12, a new member of the galectin superfamily. *The Journal of biological chemistry* 276(23):20252-20260.
- Yang Y, Candelario-Jalil E, Thompson JF, Cuadrado E, Estrada EY, Rosell A, Montaner J & Rosenberg GA (2010) Increased intranuclear matrix metalloproteinase activity in neurons interferes with oxidative DNA repair in focal cerebral ischemia. *Journal of neurochemistry* 112(1):134-149.
- Yoshii T, Fukumori T, Honjo Y, Inohara H, Kim HR & Raz A (2002) Galectin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest. *The Journal of biological chemistry* 277(9):6852-6857.
- Yoshii T, Inohara H, Takenaka Y, Honjo Y, Akahani S, Nomura T, Raz A & Kubo T (2001) Galectin-3 maintains the transformed phenotype of thyroid papillary carcinoma cells. *International journal of oncology* 18(4):787-792.
- Yu F, Finley RL, Jr., Raz A & Kim HR (2002) Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation. *The Journal of biological chemistry* 277(18):15819-15827.
- Yuan W & Varga J (2001) Transforming growth factor-beta repression of matrix metalloproteinase-1 in dermal fibroblasts involves Smad3. *The Journal of biological chemistry* 276(42):38502-38510.
- Yun SP, Lee SJ, Jung YH & Han HJ (2014) Galectin-1 stimulates motility of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells by downregulation of smad2/3-dependent collagen 3/5 and upregulation of NF-kappaB-dependent fibronectin/laminin 5 expression. *Cell death & disease* 5:e1049.
- Zhang B, Ye S, Herrmann SM, Eriksson P, de Maat M, Evans A, Arveiler D, Luc G, Cambien F, Hamsten A, Watkins H & Henney AM (1999) Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation* 99(14):1788-1794.
- Zhang X, Shen YH & LeMaire SA (2009) Thoracic aortic dissection: are matrix metalloproteinases involved? *Vascular* 17(3):147-157.
- Zheng L, Xu C, Guan Z, Su X, Xu Z, Cao J & Teng L (2016) Galectin-1 mediates TGF-beta-induced transformation from normal fibroblasts into carcinoma-associated fibroblasts and promotes tumor progression in gastric cancer. *American journal of translational research* 8(4):1641-1658.
- Zhou W, Goodman SN, Galizia G, Lieto E, Ferraraccio F, Pignatelli C, Purdie CA, Piris J, Morris R, Harrison DJ, Paty PB, Culliford A, Romans KE, Montgomery EA, Choti MA, Kinzler KW & Vogelstein B (2002) Counting alleles to predict recurrence of early-stage colorectal cancers. *Lancet* 359(9302):219-225.
- Zhu G, Kang L, Wei Q, Cui X, Wang S, Chen Y & Jiang Y (2014) Expression and regulation of MMP1, MMP3, and MMP9 in the chicken ovary in response to gonadotropins, sex hormones, and TGFB1. *Biology of reproduction* 90(3):57.
- Zorina VN, Zorin NA, Lykova OF, Konysheva TV & Zorina RM (2007) [Alpha-2-macroglobulin ligands and their biotransport mechanisms]. *Biomeditsinskaja khimiia* 53(2):164-171.
- Zucker S, Drews M, Conner C, Foda HD, DeClerck YA, Langley KE, Bahou WF, Docherty AJ & Cao J (1998) Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) binds to the catalytic domain of the cell surface receptor, membrane type 1-matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP). *The Journal of biological chemistry* 273(2):1216-1222.