

Université de Montréal

**Ciblage thérapeutique de la voie Hippo pour le traitement
des cancers mammaires chez la chienne**

par

SAMANTHA GUILLEMETTE

Département de pathologie et de microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences vétérinaires option pathologie

Mai 2017

© Samantha Guillemette, 2017

Résumé

Les tumeurs mammaires canines sont les néoplasmes les plus courants chez les chiennes intactes, dont 50% sont malignes. La résection est le traitement standard pour les tumeurs mammaires canines, mais dans les cas inopérables tels que les carcinomes inflammatoires et les tumeurs métastatiques avancées, aucun traitement chimiothérapeutique efficace n'est disponible. L'étude de la pathogenèse des tumeurs mammaires canines aide à découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques et des médicaments capables d'agir sur ces cibles pour traiter ce cancer. Des études récentes sur le dérèglement de la voie Hippo et de son rôle dans la tumorigenèse du cancer du sein, ainsi que les niveaux élevés de ces composants principaux dans les tumeurs mammaires canines, ont conduit à notre recherche sur la validation de cette voie comme cible pharmacologique pour le traitement des tumeurs des glandes mammaires canines. Six lignées de cellules tumorales mammaires canines ont été évaluées pour leur expression basale des effecteurs YAP et TAZ de la voie Hippo et pour leur sensibilité à la verteporfin, un inhibiteur de la co-activation transcriptionnelle engendrée par YAP. Quatre lignées cellulaires, qui ont des niveaux basaux détectables de YAP (CMT-9, -12, -28, -47), se sont révélées très sensibles au traitement à la verteporfin, qui a tué les cellules par induction d'apoptose avec des valeurs de ED50 de 14 à 79 nM. À l'inverse, deux lignées cellulaires qui n'exprimaient pas YAP (CF-35, CMT-84) étaient représentées par un ordre de grandeur plus résistant à la verteporfin. La verteporfin a supprimé l'expression des gènes cibles de YAP et TAZ, en particulier *CYR61* et *CTGF*, qui jouent un rôle important dans le développement du cancer du sein. La verteporfin a également pu inhiber la migration cellulaire et la croissance indépendante de l'ancrage. De même, la verteporfin supprime efficacement le potentiel invasif des cellules tumorales dans les lignées CMT-28 et -47, mais pas dans les cellules CF-35. Ensemble, nos résultats fournissent une preuve de principe selon lequel le ciblage pharmacologique de la voie Hippo compromet la viabilité et atténue le comportement malin des cellules tumorales mammaires canines. Ces résultats serviront de base au développement de nouvelles approches chimiothérapeutiques pour les tumeurs mammaires canines qui pourraient être utilisées en médecine humaine.

Mots-clés : Tumeurs de la glande mammaire, chien, voie Hippo, verteporfin, chimiothérapie ciblée.

Abstract

Canine mammary tumors are the most common neoplasms in intact female dogs with 50% of them being malignant tumours. Resection is the standard treatment for canine mammary tumours, but in inoperable cases such as inflammatory carcinomas and advanced metastatic tumours, no efficient chemotherapeutic treatment is available. Studying canine mammary tumour pathogenesis helps with the discovery of novel therapeutic targets and of drugs able to act on these targets to treat the cancer. Recent insight on the Hippo pathway deregulation and the role it plays in breast cancer tumorigenesis, as well as its presence in canine mammary tumours, has lead to our research for the validation of this pathway as a pharmacological target for the treatment of canine mammary gland tumors. Six canine mammary tumour cell lines were assessed for their basal expression of the Hippo pathway effectors YAP and TAZ, and for their sensitivity to verteporfin, an inhibitor of YAP-mediated transcriptional coactivation. Four cell lines that had detectable baseline levels of YAP (CMT-9, -12, -28, -47) were found to be very sensitive to verteporfin treatment, which killed the cells through induction of apoptosis with ED50 values of 14-79 nM. Conversely, two cell lines that did not have detectable levels of YAP (CF-35, CMT-84) were an order of magnitude more resistant to verteporfin. Verteporfin suppressed the expression of YAP and TAZ target genes, particularly *CYR61* and *CTGF*, which play important roles in breast cancer development. Verteporfin was also able to inhibit cell migration and anchorage-independent growth. Likewise, verteporfin efficiently suppressed tumor cell invasiveness in the CMT-28 and -47 lines, but not in CF-35 cells. Together, our findings provide proof of principle that pharmacological targeting of the Hippo pathway compromises the viability and attenuates the malignant behavior of canine mammary tumour cells. These results will serve as the basis for the development of novel chemotherapeutic approaches for canine mammary tumors that could translate to human medicine.

Keywords: Mammary gland tumors, dog, Hippo pathway, verteporfin, targeted chemotherapy.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures.....	vi
Liste des sigles et des abréviations.....	vii
Remerciements.....	xi
Introduction.....	1
Recension de la littérature.....	3
1 Glande mammaire du chien.....	3
1.1 Développement embryonnaire.....	3
1.2 Développement post-natal prépubère.....	3
1.3 Développement post-natal pubère.....	5
1.3.1 Anatomie macroscopique.....	5
1.3.2 Anatomie microscopique.....	5
1.3.2.1 Le mamelon.....	5
1.3.2.2 Le sinus.....	5
1.3.2.3 Les alvéoles.....	6
1.3.2.4 Stroma mammaire.....	7
1.3.3 Cycle œstral.....	7
1.3.3.1 Le proestrus.....	7
1.3.3.2 L'œstrus.....	8
1.3.3.3 Le diestrus précoce.....	9
1.3.3.4 Le diestrus tardif.....	9
1.3.3.5 L'anœstrus précoce.....	9
1.3.3.6 L'anœstrus tardif.....	10
1.3.4 Gestation.....	10
1.3.5 Lactation.....	10
1.4 Vaisseaux sanguins et lymphatiques.....	11

1.4.1	Artères.....	11
1.4.2	Veines	12
1.4.3	Drainage lymphatique.....	13
2	Tumeurs mammaires canines.....	15
2.1	Généralités	15
2.1.1	Hyperplasie et dysplasie	15
2.1.2	Tumeurs bénignes	15
2.1.3	Tumeurs malignes.....	15
2.2	Incidence	16
2.3	Facteurs de risque	16
2.3.1	Hormones stéroïdiennes.....	16
2.3.2	Autres.....	18
2.4	Étiologie.....	18
2.5	Traitements	21
2.5.1	Chirurgie	21
2.5.2	Chimiothérapie.....	22
3	La voie Hippo	25
3.1	Voie canonique	25
3.1.1	Signaux en amont.....	25
3.1.2	Cascade de kinases.....	27
3.1.3	Co-activateurs transcriptionnels.....	27
3.1.4	Rétention cytoplasmique.....	27
3.1.5	Translocation au noyau.....	28
3.2	La voie Hippo dans le développement normal de la glande mammaire	28
3.2.1	SAV1.....	28
3.2.2	LATS1.....	29
3.2.3	YAP.....	29
3.2.4	TAZ.....	29
3.3	Rôle dans la tumorigenèse mammaire	30
3.3.1	Cancer du sein.....	30
3.3.1.1	YAP et TAZ.....	30

3.3.1.2	Mécanismes de tumorigenèse	31
3.3.2	Chez le chien et le chat	31
3.3.3	Molécules modulatrices	32
4	Ciblage thérapeutique	32
4.1	La verteporfin.....	32
4.1.1	Propriétés photodynamiques.....	32
4.1.2	Propriétés non photodynamiques.....	33
	Hypothèse et objectifs.....	36
	Article en tant que première auteure.....	37
	Abstract.....	38
	Introduction.....	39
	Materials and Methods.....	41
	Results.....	44
	Discussion.....	46
	Acknowledgements.....	48
	Funding.....	48
	Conflict of interest	48
	References.....	51
	Figure Legends.....	57
	Discussion.....	66
	Conclusion	73
	Bibliographie.....	74

Liste des tableaux

Recension de littérature

Tableau 1 : Étiologie moléculaire des tumeurs mammaires canines.	19
Tableau 2. Agents chimiothérapeutiques pour les chiens atteints de tumeurs mammaires	22

Article

Table 1. Oligonucleotide primer sequences	49
Table 2. Cell cycle analyses.....	50

Liste des figures

Recension de littérature

Figure 1. Histologie de la glande mammaire durant le cycle œstral.....	4
Figure 2. Schéma d'une alvéole de la glande mammaire	6
Figure 3. Schéma des changements endocriniens d'un cycle ovarien chez les chiennes non gestantes.....	8
Figure 4. Schéma du réseau artériel des glandes mammaires.....	12
Figure 5. Schéma du drainage lymphatique des glandes mammaires	14
Figure 6. Facteurs de risque	17
Figure 7. La voie de signalisation Hippo	26
Figure 8. Effet de la verteporfin sur la voie Hippo	35

Article

Figure 1. Expression of YAP and TAZ in mammary gland tumor cell lines	59
Figure 2. Viability experiment.....	60
Figure 3. TUNEL assays.....	61
Figure 4. Effects of verteporfin on Hippo pathway target gene expression in CMT cell lines	62
Figure 5. CMT cell migration assays.....	63
Figure 6. CMT invasion assays.....	64
Figure 7. Anchorage-independent growth assays	65

Liste des sigles et des abréviations

ABR:	Actif BCR-lié - <i>Active BCR-Related</i>
ACTB:	β -Actine
AgNOR:	Régions organisatrices des nucléolins argyrophiles - <i>Argyrophilic Nucleolar Organiser Regions</i>
ANKRD1:	Domaine 1 ankyrine répétée - <i>Ankyrin Repeat Domain 1</i>
ANOVA:	Analyse de la variance - <i>Analysis of Variance</i>
AREG:	Amphireguline - <i>Amphiregulin</i>
AXL:	Récepteurs à activité tyrosine kinase AXL - <i>AXL Receptor Tyrosine Kinase</i>
BAX:	Protéine Bcl-2–associated X - <i>BCL2-Associated X protein</i>
Bcl-xL:	Lymphome à cellules B – extra large - <i>B-cell lymphoma-extra large</i>
Bcl-2:	Lymphome à cellules B 2 - <i>B-cell lymphoma 2</i>
BIRC5:	Répétition Baculoviral IAP contenant la protéine 5 - <i>Baculoviral IAP Repeat Containing Protein 5</i>
BRCA-2:	Gène de susceptibilité au cancer du sein 2 - <i>Breast Cancer Susceptibility Gene 2</i>
CAPN9:	Calpain 9
CK1:	Caséine kinase 1 - <i>Casein Kinase 1</i>
CMT:	Tumeur mammaire canine - <i>Canine Mammary Tumour</i>
Col8a1:	Collagène Type VIII Chaîne Alpha 1 - <i>Collagen type VIII alpha 1</i>
CRB:	Complexe homologue crumbs - <i>Crumbs Homolog Complex</i>
CTGF:	Facteur de croissance du tissu conjonctif - <i>Connective Tissue Growth Factor</i>
CYR61:	Inducteur angiogène riche en cysteine 61 - <i>Cysteine-Rich Angiogenic Inducer 61</i>
DCAF1:	Facteur 1 associé à Ddb1-cullin4 - <i>Ddb1-Cullin4-Cssociated-Factor1</i>
DMSO:	Diméthylsulfoxyde
DRO:	Dérivé réactif de l'oxygène

ED50:	Dose effective dans 50% de la population testée - <i>Effective Dose in 50% of the population tested</i>
EGFR:	Récepteur de facteur de croissance épidermique - <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ERα:	Récepteur d'œstrogène alpha - <i>Estrogen Receptor Alpha</i>
FACS:	Tri de cellules activées par fluorescence - <i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
FasR:	Membre de la superfamille du récepteur du TNF 6 - <i>TNF Receptor Superfamily Member 6</i>
FAT4:	Homologue 4 suppresseur de tumeur FAT- <i>FAT Tumor Suppressor Homolog 4</i>
FDA:	Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux - <i>US Food and Drug Administration</i>
FOXM1:	Protéine <i>Forkhead box M1</i> - <i>Forkhead Box Protein M1</i>
FSH:	Hormone folliculo-stimulante - <i>Follicle-Stimulating Hormone</i>
GH:	Hormone de croissance - <i>Growth Hormone</i>
GHR:	Récepteur d'hormone de croissance - <i>Growth Hormone Receptor</i>
GPER:	Récepteur 1 d'œstrogène couplé aux protéines G - <i>G Protein-Coupled Estrogen Receptor 1</i>
GRM4:	Récepteur de glutamate métabotrope 4 - glutamate receptor metabotropic 4
Gα q-11:	Protéine de liaison aux nucléotides de guanine (protéine G), alpha 11 (classe Gq) - <i>Guanine Nucleotide Binding Protein (G Protein), Alpha 11 (Gq Class)</i>
Hsp70:	Protéines de choc thermique de 70 kilodaltons - <i>70 Kilodalton Heat Shock Proteins</i>
Hsp90:	Protéines de choc thermique de 90 kilodaltons - <i>90 Kilodalton Heat Shock Proteins</i>
InhA:	Enoyl- [ACP] réductase dépendant du NADH - <i>NADH-dependent Enoyl-[ACP] Reductase</i>

LATS1/2:	Grand homologue suppresseur de tumeur 1 et 2 - <i>Large Tumour Suppressor Homolog 1 and 2</i>
LH:	Hormone lutéinisante - <i>Luteinizing hormone</i>
MCT2 :	Transporteur monocarboxylate 2 - <i>Monocarboxylate Transporter 2</i>
MEM alpha 1X:	Milieu minimum essentiel alpha 1X - <i>Minimum Essential Medium Alpha 1X</i>
MMTV-Cre:	Virus de la tumeur mammaire de la souris - recombinaison cré - <i>Mouse Mammary Tumor Virus-Cre recombinase</i>
MOB1:	Activateur MOB kinase 1A et B - <i>MOB Kinase Activator 1A and B</i>
MST1/2:	Protéine mammifère kinase STE20 1 et 2 - <i>Mammalian STE20 like Protein Kinase 1 and 2</i>
PBS:	Tampon phosphate salin - <i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCNA:	Antigène nucléaire cellulaire proliférant - <i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PKC:	Protéines kinase C - <i>Protein Kinase C</i>
PLCβ:	Phosphoinositide phospholipase C, isozyme β3 - <i>Phosphoinositide Phospholipase C, β3 Isozyme</i>
PTEN:	Protéine homologue de phosphatase et tensine - <i>Phosphatase and Tensin Homolog Protein</i>
PTPN:	Protéine tyrosine phosphatase non-récepteur type 14 - <i>Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 14</i>
PVDF:	Polyfluorure de vinylidène - <i>Polyvinylidene Difluoride</i>
Rho:	Famille de gènes homologues Ras - <i>Ras Homolog Gene Family</i>
ROCK:	Protéine kinase Rho-associée - <i>Rho-Associated Protein Kinase</i>
RPL19:	Protéine ribosomale L19 - <i>Ribosomal Protein L19</i>
RT-qPCR:	Réaction en chaîne par polymérase en temps réel - <i>Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
SAV1:	Homologue Salvador 1 - <i>Salvador Homolog 1</i>
SEM:	Erreur type - <i>Standard Error of Mean</i>
TAZ:	Co-activateur transcriptionnel avec motif de liaison PDZ - <i>Transcriptional Co-activator with PDZ-binding Motif</i>

TEAD:	Facteurs de transcription spécifiques à la séquence contenant le domaine TEA - <i>TEA Domain-Containing Sequence-Specific Transcription Factors</i>
TERT:	Téломérase transcriptase inverse - <i>Telomerase Reverse Transcriptase</i>
TMD1 :	Domaine TM2 contenant 1 - <i>TM2 domain containing 1</i>
TNF:	Facteur de nécrose tumorale - <i>Tumor Necrosis Factor</i>
TOPBP1:	Protéine 1 de liaison à la topoisomérase d'ADN - <i>DNA Topoisomerase 2-Binding Protein 1</i>
TUNEL:	Étiquetage de terminal par transférase désoxynucléotidyl dUTP - <i>Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling</i>
VEGF:	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire - <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WAP-Cre:	Protéine acide-cré recombinase du lactosérum de souris - <i>Mouse Whey Acidic Protein-Cre Recombinase</i>
Wwtr1:	Domaine WW contenant un régulateur de transcription 1 - <i>WW Domain Containing Transcription Regulator 1</i>
YAP:	Protéine Yes-associée - <i>Yes-Associated Protein</i>
β-TRCP:	Répétition bêta-transducine contenant la protéine ligase E3 ubiquitine - <i>β-Transducin Repeat-Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase</i>

Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, Dre Marilène Paquet, pour son soutien, son écoute, ses conseils et sa patience à mon égard. Elle m'a si gentiment accueillie dans son équipe et m'a donné tout le soutien nécessaire pour accomplir le merveilleux projet sur le cancer de la glande mammaire canine auquel elle m'a permis de participer. Grâce à elle, j'ai pu découvrir le merveilleux monde de la pathologie animale et j'ai grandement appris de cette belle collaboration. Ce fut véritablement un honneur et un réel bonheur de travailler avec Dre Marilène Paquet.

J'aimerais remercier mon co-directeur Dr Derek Boerboom, pour ses conseils judicieux et son aide pour l'article scientifique du projet.

Je suis aussi très reconnaissante envers Mme Meggie Girard et Dre Charlène Rico, sans qui je n'aurais pu accomplir tous les tests de laboratoire.

Je tiens également à remercier la superbe équipe du laboratoire de Dr Derek Boerboom : Dr Philippe Godin, Dr Gustavo Zamberlam, Dre Mayra Tsoi, et celle du laboratoire du Dr Alexandre Boyer : Adrien Levasseur. Merci pour tous ces beaux moments passés au laboratoire et pour votre aide; vous êtes une équipe formidable et sans vous je n'aurais jamais pu accomplir ce projet. Je remercie M. Guy Beauchamp pour son aide lors de l'analyse statistique de nos résultats.

Je souhaite par ailleurs remercier les membres de mon comité-conseil et les membres du jury qui ont gracieusement accepté de m'aider dans cette entreprise. De plus, je suis reconnaissante envers le Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies ainsi qu'envers la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal pour leurs bourses d'études. Je suis reconnaissante envers la « Morris Animal Foundation » pour son appui financier dans le cadre de ce projet.

Finalement, j'aimerais offrir mes remerciements à ma famille. Le soutien exceptionnel de mes proches m'a permis de réaliser ce fabuleux projet de carrière : ma copine, Ayesha Vording, mes parents, Patricia Kell et Mario Guillemette, mon frère, Nicolas Guillemette, et ma tante, Mary Ann Kell. Je leur suis infiniment reconnaissante.

Introduction

Les études épidémiologiques démontrent que les tumeurs mammaires sont très prévalentes chez la chienne intacte et qu'elles comptent pour 50% de tous les cancers chez cette espèce. Comme la femme, la chienne développe une panoplie de types tumoraux allant de la lésion préneoplasique à l'adénome simple jusqu'au carcinome invasif localement et à la formation de métastases à distance. L'influence hormonale joue un rôle de première ligne dans le développement des tumeurs mammaires. Les hormones sont des facteurs de croissance qui, au cours du développement et du cycle œstral, agissent sur la glande mammaire en favorisant la prolifération cellulaire et le développement glandulaire. Du même coup, l'hyperplasie glandulaire physiologique ouvre la porte à la genèse de lésions dysplasiques ou prètumorales. Pour cette raison, l'ovariohystérectomie avant la première chaleur diminue drastiquement les risques du développement des tumeurs mammaires.

Le traitement standard des tumeurs mammaires canines est la résection chirurgicale du nodule ou de la chaîne mammaire. Par contre, dans les cas de carcinome métastatique et de carcinome inflammatoire, la chirurgie s'avère inutile, voire contre-indiquée. De plus, dans ces cas, peu de traitements chimiothérapeutiques sont considérés efficaces et la plupart présentent des effets secondaires importants. La recherche de nouvelles cibles pharmacologiques est donc de mise pour améliorer le traitement de cette maladie, le confort du patient et la survie à long terme. L'étude de nouvelles voies de signalisation peut permettre le développement de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement des cancers mammaires tout en diminuant les effets secondaires nocifs.

La voie Hippo, qui est hautement conservée dans l'évolution, s'avère très importante dans l'homéostasie des tissus et la régulation de la taille des organes via son contrôle de la prolifération et la survie cellulaire. Cette voie de signalisation est également impliquée dans le développement de la glande mammaire ainsi que dans le développement du processus tumoral de plusieurs organes. Des études récentes démontrent que la voie Hippo, et majoritairement ses deux principaux effecteurs YAP et TAZ, sont activés de façon aberrante dans le cancer du sein chez la femme et dans le cancer mammaire chez la chienne et la chatte. L'activation constitutive de la voie conduit à une panoplie de fonctions cellulaires dont la transition épithélio-

mésenchymateuse, la genèse de cellules souches cancéreuses, l'acquisition du pouvoir métastatique et la résistance chimiothérapeutique. La voie Hippo reçoit donc beaucoup d'attention en recherche et semble être une cible thérapeutique intéressante en oncologie vétérinaire. Une benzoporphyrine, la verteporfin, utilisée dans le traitement de la dégénérescence maculaire, démontre un pouvoir anticancéreux réel en interférant avec la liaison entre YAP et TEAD au niveau nucléaire, bloquant ainsi l'activité transcriptionnelle. La verteporfin est donc une molécule intéressante à étudier afin de cibler la voie Hippo pour le traitement des cancers mammaires chez la chienne.

Recension de la littérature

1 Glande mammaire du chien

1.1 Développement embryonnaire

La glande mammaire commence à se développer durant la période embryonnaire. Le développement commence au-dessus des régions spécialisées du mésoderme où apparaissent deux épaisissements ventro-linéaires d'ectoderme. Cet endroit donne lieu à des crêtes ou lignes de lait, qui partent de la région axillaire et s'étendent jusqu'à la région inguinale. Les cellules de ces ectodermes communiquent, par le biais de plusieurs voies de signalisation telles que la voie des Wnts par l'entremise de β -galactosidase sensible au Wnt, avec les cellules épithéliales et mésenchymateuses afin de migrer le long de ces crêtes pour venir former une placode qui se développera en glandes mammaires individuelles¹⁻².

La placode va ensuite donner lieu à un cordon solide de cellules épithéliales dans le mésenchyme sous-jacent. C'est à partir de ce cordon que les bourgeons mammaires vont se développer pour ensuite se ramifier et invaginer le mésoderme sous-jacent et former des prolongements cylindriques dilatés à leur extrémité. Les prolongements se composent alors d'une lumière, formée par une cavitation de celle-ci, qui est reliée à la gaine du mamelon composée d'un épithélium spécialisé. C'est cette gaine qui se développe en mamelon à l'âge adulte et qui permet une communication avec l'extérieur.²

1.2 Développement post-natal prépubère

En raison de la faible concentration d'hormones stéroïdiennes durant le proestrus prépubère, les structures des glandes mammaires sont moins développées (Figure 1)³⁻⁴. Durant la période prépubère, l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH) ont des patrons de sécrétion pulsatile, ressemblant à la période d'anœstrus des chiennes adultes. Les glandes sont composées de gros canaux interlobulaires bordés d'une couche de cellules myoépithéliales et deux couches de cellules épithéliales supportées par un stroma de tissu conjonctif dense. Latérales à ces canaux se trouvent des structures épithéliales bulbeuses ayant

des bordures cellulaires indéfinies et possédant de grands noyaux. La glande dans son ensemble continuera de croître jusqu'à la puberté lorsque des changements anatomiques majeurs se produiront grâce à l'augmentation de l'œstrogène plasmatique démarquant le début du proœstrus^{2-3,5}.

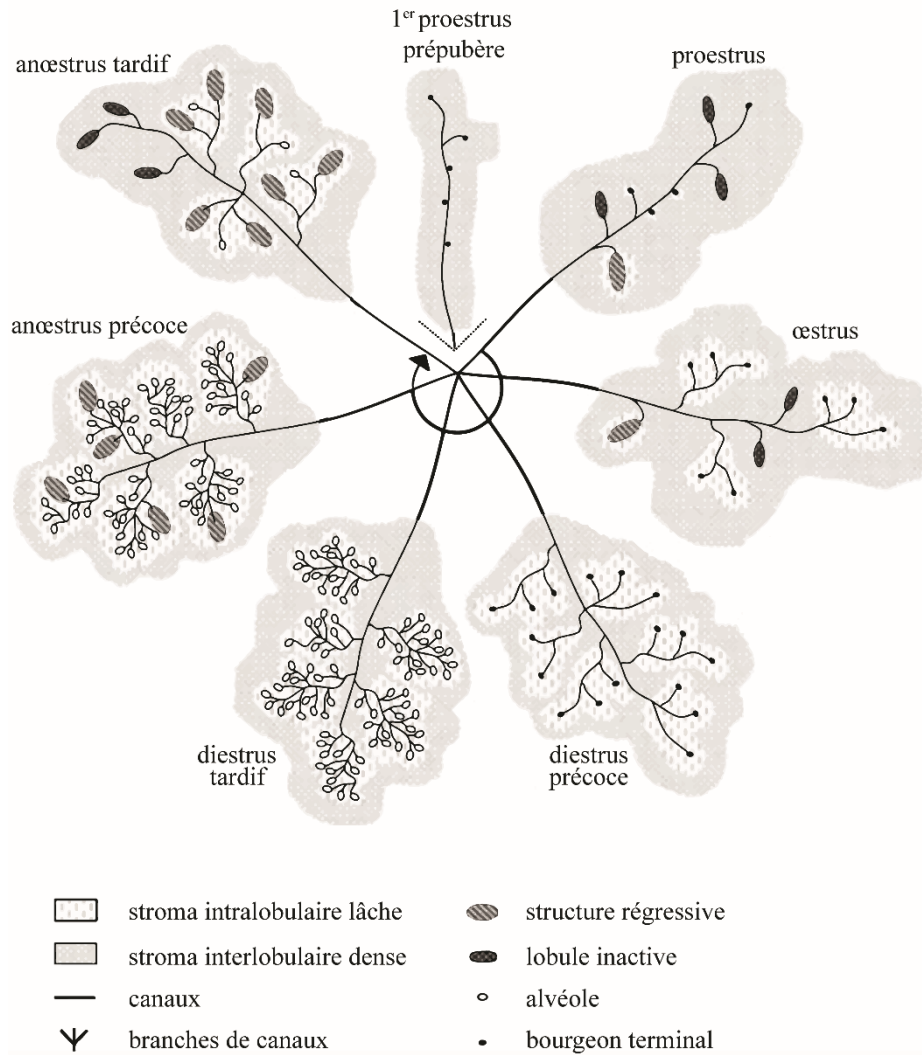


Figure 1. Histologie de la glande mammaire durant le cycle œstral

Représentation des caractéristiques histologiques de la glande mammaire durant le cycle œstral, y compris la phase prépubère et 1^{er} proœstrus. Les lignes noires sont les canaux reliant les différentes structures telles que les bourgeons terminaux (points noirs), les alvéoles (cercles blancs), les lobules inactifs (ellipses gris foncé) et les structures régressives (ellipses gris pâle). Ces structures et canaux sont entourés de stroma intralobulaire lâche (blanc avec des taches gris pâle) et de stroma interlobulaire dense (gris pâle avec des taches blanches). Modifié de ⁴.

1.3 Développement post-natal pubère

1.3.1 Anatomie macroscopique

Les glandes mammaires se retrouvent en paires chez le chien, et la plupart du temps cinq paires au total, mais quelques individus peuvent toutefois en posséder quatre ou six paires. Les glandes mammaires sont divisées en trois sections, soit les glandes thoraciques composées d'une paire crâniale et d'une paire caudale (M1 et M2), les glandes abdominales composées d'une paire crâniale et d'une paire caudale (M3 et M4), et les glandes inguinales composées d'une seule paire de glandes (M5)⁶. Les glandes sont organisées en lobules composés d'alvéoles. Ces unités lobulo-alvéolaires sont connectées par des canaux de tailles variables. Les canaux convergent au mamelon composé de 7 à 16 embranchements canaux.²

1.3.2 Anatomie microscopique

1.3.2.1 Le mamelon

Le mamelon est recouvert par un épiderme possédant une lacune de structures annexielles avec une formation modérée de nervures. Entre les cellules de l'épiderme basal se retrouvent les mélanocytes possédant un cytoplasme vacuolé. Comme mentionné ci-haut, les mamelons possèdent des ouvertures. Celles-ci sont composées d'un épithélium squameux stratifié formant les canaux de trayons. Un bouchon de kératine peut souvent se former dans la lumière de ces canaux. Ces derniers sont entourés de muscles lisses.⁶

1.3.2.2 Le sinus

Relié aux canaux du mamelon se retrouve le sinus formé d'une double couche de cellules épithéliales cylindriques. L'épithélium du sinus est recouvert de cellules myoépithéliales fusiformes. Le sinus mène aux canaux galactophores dont les plus petits sont entourés de cellules myoépithéliales et bordés d'un épithélium simple cubique. Les plus grands canaux galactophores sont aussi entourés de cellules myoépithéliales fusiformes mais bordés d'un épithélium simple cubique à stratifié.⁶

1.3.2.3 Les alvéoles

Les canaux galactophores mènent aux alvéoles qui sont soit sous forme sécrétoire ou non sécrétoire, en fonction du stade hormonal de la chienne. Sous leur forme non sécrétoire, durant le proestrus prépubère et pubère, les alvéoles sont similaires aux petits canaux galactophores. Sous leur forme sécrétoire, durant le diestrus, les cellules épithéliales bordant les alvéoles sont hypertrophiées et contiennent de nombreuses gouttelettes intracytoplasmiques. Les alvéoles sont entourées de cellules myoépithéliales étoilées (Figure 2)⁷. Une membrane basale, composée de laminine, de protéoglycane, d'héparine sulfate, de collagène de type IV et d'autres protéines, borde les alvéoles et les canaux mammaires.⁶

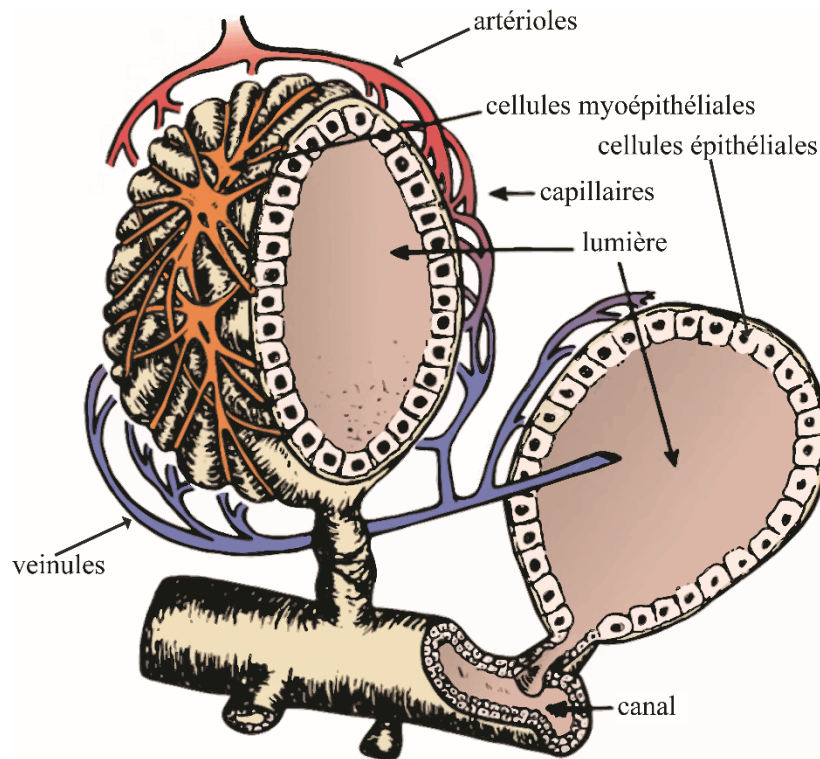


Figure 2. Schéma d'une alvéole de la glande mammaire

Une alvéole composée de cellules épithéliales entourée de cellules myoépithéliales formant une lumière. L'alvéole est alimentée par des artérioles et drainée par des veinules. L'alvéole est connectée aux sinus par des canaux. Modifié de ⁸.

1.3.2.4 Stroma mammaire

Le stroma mammaire est un tissu mésenchymateux dont le rôle principal est de supporter les canaux et les acini glandulaires. Ce tissu mésenchymateux est constitué de cellules adipeuses, de vaisseaux sanguins et lymphatiques, de nerfs, de tissus conjonctifs fibreux et de cellules inflammatoires, qui soutiennent les composantes épithéliales de la glande. Deux types de stromas sont présents dans la glande mammaire. Un stroma composé de fibres de collagène fines avec une matrice extracellulaire lâche entoure les canaux intralobulaires. Le stroma interlobulaire est composé de fibres de collagène plus larges avec une matrice extracellulaire moins importante. La quantité de tissus adipeux varie selon l'emplacement des glandes mammaires. Le tissu adipeux est moins important en région thoracique et augmente en région inguinale.²

1.3.3 Cycle œstral

Comme mentionné ci-haut, la réponse hormonale des glandes mammaires est importante dans leur développement dès la puberté lors de l'augmentation de la production d'œstrogène par l'ovaire. Plusieurs changements cellulaires surviennent tout au long des différentes phases du cycle œstral. Le premier cycle œstral survient entre l'âge de 6 à 10 mois et consiste du proestrus, de l'œstrus, du diestrus et de l'anœstrus⁹⁻¹⁰. Le cycle œstral survient en moyenne à tous les 7 mois⁹⁻¹⁰.

1.3.3.1 Le proestrus

Durant le proestrus, les glandes sont sous une forme inactive, donc la progestérone demeure à un niveau basal de même que l'œstrogène, mais augmente rapidement durant les derniers jours puis redescend. Le pic d'œstrogène inhibe la LH, mais lorsque l'œstrogène diminue et que la progestérone commence à augmenter graduellement durant les derniers jours, un pic de LH et de FSH surgit (Figure 3)^{5, 11-19}. Les structures retrouvées durant cette phase sont semblables à celles du proestrus prépubère. Des canaux interlobulaires, entourés de tissu conjonctif, sont reliés à des structures lobulo-alvéolaires primitives. Des alvéoles, tapissées de cellules épithéliales vacuolaires aplaties ou cubiques de l'œstrus précédent, peuvent encore être observées (Figure 1)⁴.

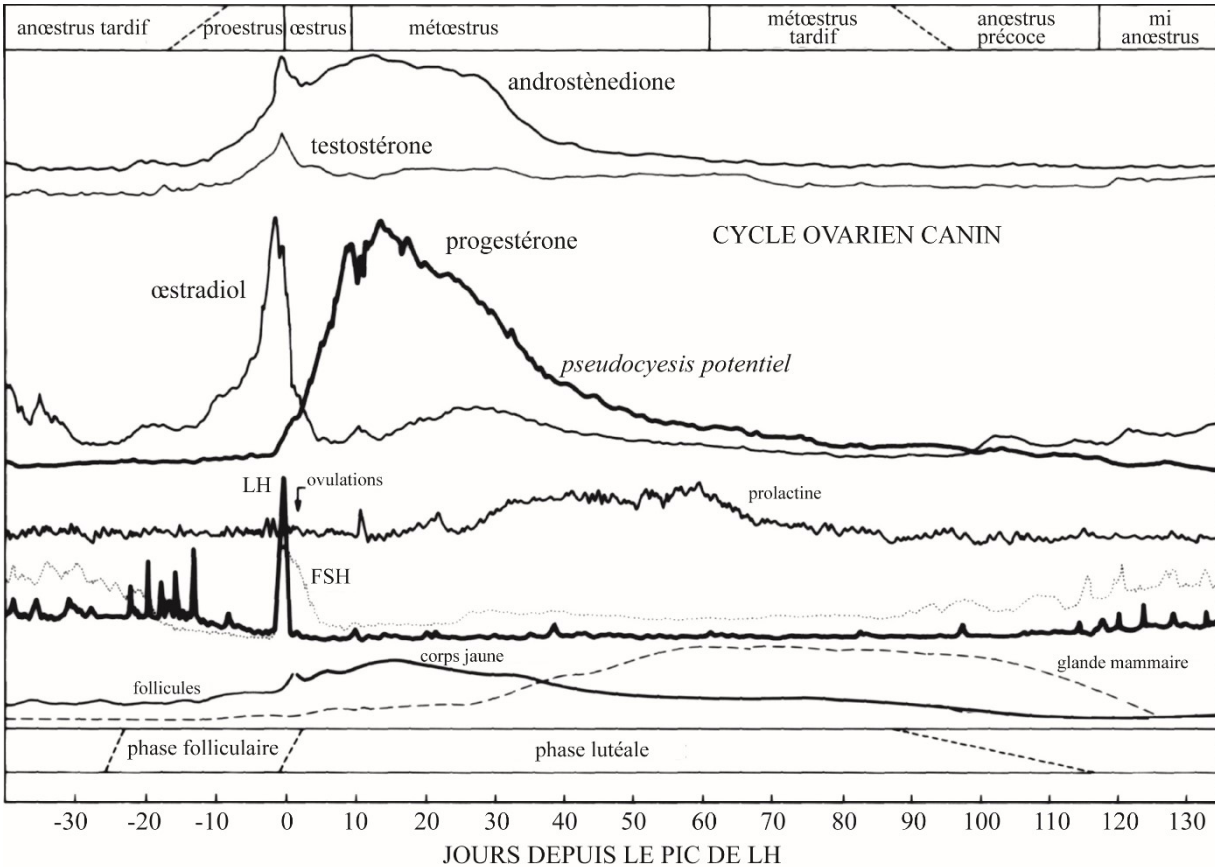


Figure 3. Schéma des changements endocriniens d'un cycle ovarien chez les chiennes non gestantes

Un pic de l'œstradiol durant le proœstrus tardif, de 1 à 2 jours avant le pic LH préovulatoire est présent. La lutéinisation préovulatoire commence avec une augmentation préovulatoire de la progestérone. L'œstrus débute avec la chute des concentrations d'œstradiol et avec l'augmentation des concentrations de progestérone. La progestérone atteint des valeurs maximales dans les premiers stades des jours 20 à 30. Cette dernière diminue sur une période de 4 à 8 semaines après les valeurs maximales, ce qui marque la régression lutéale lente et un manque de mécanisme lutéolytique utérin. Cette diminution de progestérone marque aussi une augmentation palpable de la taille mammaire, qui persiste pendant 3 à 4 mois dans chaque cycle. La transition du métœstrus à l'anœstrus est imprécise, variant à la fois par définition. Le début du proœstrus est également indiqué comme imprécis, variant selon les critères et les paramètres utilisés. L'ovulation d'ovocytes immatures commence de 48 à 60 h après le pic de LH. Le panneau inférieur montre des phases folliculaires et lutéales pour des durées presque maximales, les moyennes indiquées étant d'environ 60 à 70% de celles tracées. LH: hormone lutéinisante; FSH: hormone folliculo-stimulante. Modifié de ¹⁹

1.3.3.2 L'œstrus

Durant l'œstrus, grâce à l'effet de l'œstrogène sur les cellules épithéliales, les canaux intralobulaires prolifèrent pour former plusieurs petits canaux, dans un tissu conjonctif lâche, qui sont tapissés d'un épithélium stratifié semblable aux lobules (Figure 1)⁴. Le début de l'œstrus est marqué par un pic de FSH et de LH qui redescend à leur niveau basal au cours de

l'œstrus. Les niveaux de progestérone atteignent leur maximum graduellement au cours de l'œstrus et restent ainsi jusqu'en diestrus (Figure 3)^{3, 5, 14, 19-21}.

1.3.3.3 Le diestrus précoce

Le diestrus précoce dure de 2 à 3 mois et débute avec le pic du LH qui engendre une augmentation des niveaux sanguins d'œstrogène et de progestérone (Figure 3)^{3, 5, 19}. L'œstrogène et la progestérone agissent sur le développement des glandes mammaires et favorisent l'hyperplasie lobulaire. À ce stade, le stroma entourant les canaux et lobules est composé d'une matrice mucineuse, de petits vaisseaux sanguins et de fibroblastes ayant une activité mitotique accrue (Figure 1)⁴.

1.3.3.4 Le diestrus tardif

Durant le diestrus tardif, toujours sous l'effet de l'œstrogène et de la progestérone, l'hyperplasie lobulo-alvéolaire est à son niveau le plus avancé. Les niveaux de LH demeurent stables²¹. Ce stade est caractérisé par le développement des alvéoles sécrétrices. Une sécrétion protéique est produite dans ces alvéoles qui sont tapissées d'une double couche de cellules cubiques ou pavimenteuses stratifiées. L'épithélium des alvéoles est entouré de cellules myoépithéliales allongées. Les canaux lobulaires, quant à eux, ont un épithélium cubique bas ou pavimenteux et sont aussi remplis d'une sécrétion protéique. L'épithélium des canaux est entouré de cellules myoépithéliales fusiformes. Le stroma intralobulaire est minimal et le stroma interlobulaire est composé de fibres de réticuline et de collagène (Figure 1)⁴. À la fin du diestrus, la progestérone diminue et la prolactine augmente de façon inversement proportionnelle à la progestérone (Figure 3)^{3, 5, 19}.

1.3.3.5 L'anœstrus précoce

Durant l'anœstrus précoce, qui est une période de quiescence ovarienne, l'hyperplasie lobulaire est en régression. Moins de matériel protéique est retrouvé dans la lumière des glandes. On observe la présence de lymphocytes et plasmocytes ainsi que le relâchement du tissu conjonctif intralobulaire. Cette régression est engendrée par une augmentation des concentrations de FSH, qui se retrouvent à des niveaux deux fois plus grands que la LH (Figure 2)^{3, 5, 13, 19-20, 22-24}.

1.3.3.6 L'anœstrus tardif

Durant l'anœstrus tardif, qui survient 1-2 semaines avant le proœstrus³, les glandes mammaires sont au stade avancé de régression. On observe une augmentation de la concentration du LH et une plus grande fréquence de pulsations. Cela est associé à une augmentation de l'œstrogène plasmatique et démarque l'initiation d'un nouveau cycle œstral (Figure 3)^{5, 11, 13, 19, 25-27}. Ces changements hormonaux sont caractérisés par un petit diamètre des lobules et une présence de cellules au noyau pycnotique, et des concrétions protéiques sont présentes dans les canaux. De plus, l'interstitium est plus prononcé entre les canaux et lobules et le stroma est plus dense et contient des fibres de collagène ainsi qu'un infiltrat inflammatoire composé de lymphocytes, de plasmocytes et de macrophages (Figure 1).⁴

1.3.4 Gestation

Durant la période de gestation, plusieurs changements surviennent au niveau des glandes mammaires secondaires aux changements hormonaux, dont une augmentation de la progestérone et de l'hormone de croissance. Sous l'effet de la progestérone, les canaux lobulaires croissent, s'allongent et se ramifient. L'hyperplasie lobulo-alvéolaire va devenir une hyperplasie lobulo-alvéolaire sécrétrice sous l'influence de la prolactine. La parturition met fin à la grossesse 64-66 jours après le pic du LH. Les niveaux de prolactine augmentent de manière réciproque à la baisse des taux de progestérone à la fin de la gestation, atteignant des niveaux beaucoup plus élevés que dans l'état de grossesse. Les tissus canaux et glandulaires mammaires augmentent en réponse au niveau de prolactine.⁹

1.3.5 Lactation

Durant la parturition et en raison de la diminution de progestérone et de l'augmentation graduelle de la prolactine, les structures de la glande mammaire sont alors composées de plusieurs alvéoles dans les lobules qui sont connectées aux canaux.

La lactation est engendrée par une augmentation de prolactine et une diminution de la progestérone. Au moment de la mise bas, la progestérone chute et la prolactine augmente graduellement, favorisant l'activité sécrétoire de la glande et la fabrication des constituants du lait²⁸. De plus, le GH est responsable de l'expansion des cellules souches et progénitrices

mammaires lorsque la glande mammaire grossit durant la lactation²⁹. Lors de la lactation, le chiot peut alors aspirer les sécrétions alvéolaires qui proviennent des alvéoles, passant par les canaux alvéolaires, les canaux lobulaires et les sinus du mamelon. La succion du chiot engendre les hauts niveaux de prolactine et une augmentation d'ocytocine, ce qui occasionne la formation et l'éjection du lait, produisant une boucle positive hormonale³⁰⁻³¹. Les alvéoles commencent à régresser après dix jours post-partum. Cette régression est complétée après 40 jours post-partum. À ce stade, la glande retourne à l'état de repos décrit pour le proestrus. Après le sevrage, environ 107 jours après le pic de LH, les niveaux de prolactine ont diminué et la progestérone augmente, ce qui cause la régression³⁰.

1.4 Vaisseaux sanguins et lymphatiques

1.4.1 Artères

Les glandes mammaires sont alimentées de sang par plusieurs grandes artères (Figure 4)⁶. Le réseau artériel des glandes mammaires commence par l'alimentation des glandes thoraciques crânielles et caudales par des branches des artères latérales thoraciques et intercostales ainsi que l'artère épigastrique superficielle crâniale^{6, 32-34}. Les glandes abdominales crânielles sont alimentées par l'artère épigastrique superficielle crâniale ainsi que l'anastomose de celle-ci avec l'artère épigastrique superficielle caudale. Quant aux glandes abdominales caudales, elles sont alimentées par des branches cutanées des artères phrénico-abdominales et des branches des artères honteuses externes⁶. Les glandes abdominales caudales et glandes inguinales sont aussi alimentées par l'artère superficielle caudale et des branches de l'artère honteuse externe. De plus, les glandes inguinales sont alimentées par des branches cutanées des artères iliaques circonflexes profondes^{6, 32}.

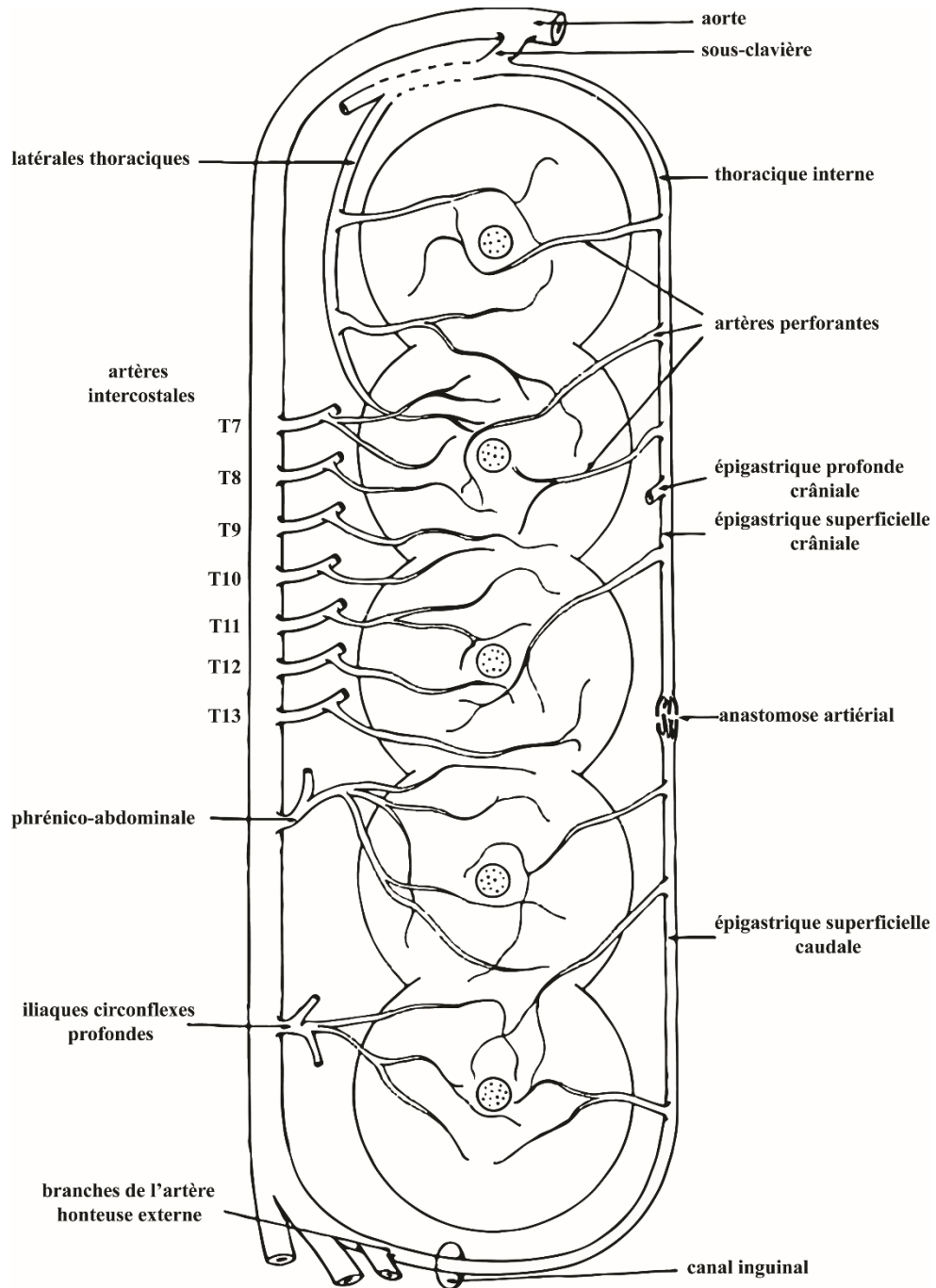


Figure 4. Schéma du réseau artériel des glandes mammaires

Un diagramme de l'apport artériel aux glandes mammaires de la chienne. Modifié de ⁶.

1.4.2 Veines

Le réseau veineux qui draine les glandes mammaires est parallèle à celui du réseau artériel qui les alimente (Figure 4)⁶. Ce sont les branches des veines thoraciques internes, les

veines intercostales et les veines épigastriques superficielles crânielles qui drainent les glandes thoraciques. La veine épigastrique superficielle caudale draine les glandes abdominales et inguinales. Contrairement aux artères alimentant les glandes mammaires, les veines qui les drainent traversent la ligne médiane et forment des anastomoses crâniocaudales, facilitant ainsi le drainage des glandes^{6, 32-34}.

1.4.3 Drainage lymphatique

Le réseau lymphatique qui draine les glandes mammaires est composé de nœuds lymphatiques axillaires et inguinaux superficiels (Figure 5)⁶. Les glandes thoraciques et abdominales crânielles sont drainées au nœud lymphatique axillaire. Les glandes abdominales caudales et inguinales sont drainées au nœud lymphatique inguinal superficiel^{6, 35-37}.

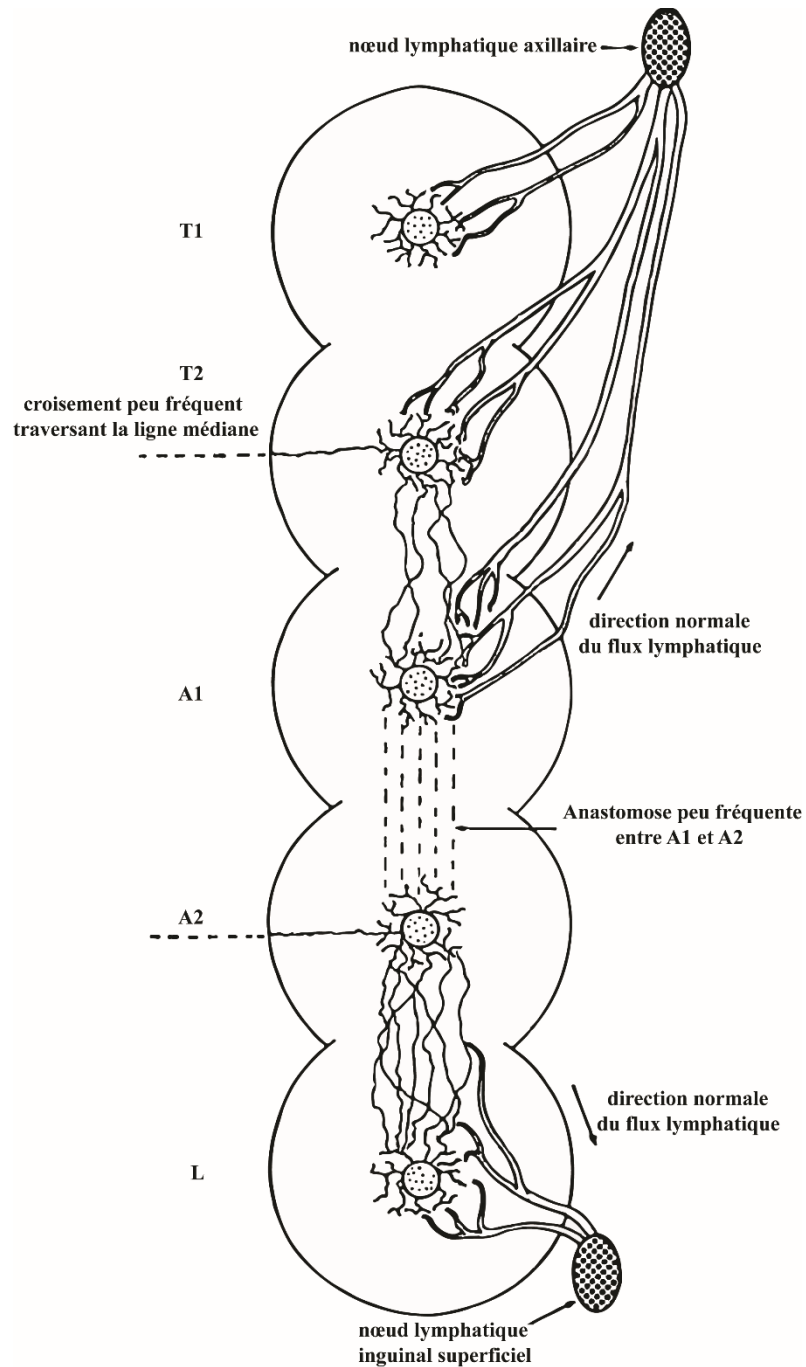


Figure 5. Schéma du drainage lymphatique des glandes mammaires

Un diagramme du drainage lymphatique des glandes mammaires du chien. Le nœud lymphatique axillaire draine les paires de glandes thoracique et abdominale. Le nœud lymphatique inguinal superficiel draine les paires de glandes abdominale et inguinale. Peu d'anastomoses sont présentes entre les paires de glandes abdominales. T = thoracique; A = abdominale et L = glande mammaire inguinale. Modifié de ⁶.

2 Tumeurs mammaires canines

2.1 Généralités

2.1.1 Hyperplasie et dysplasie

Le développement de néoplasmes mammaires est très commun chez les chiennes intactes et provient de changements précurseurs tels que les changements hyperplasiques et dysplasiques³⁸. L'hyperplasie est une augmentation du nombre de cellules dans un tissu due à l'augmentation de la prolifération des cellules dans celui-ci³⁹. La dysplasie est caractérisée par une désorganisation des cellules principalement dans l'épithélium, un changement menant aussi au développement de néoplasmes. La morphologie des cellules dysplasiques est caractérisée par une perte de polarité, un pléomorphisme cellulaire et nucléaire, une taille élargie, une hyperchromasie, et de nombreuses mitoses à des endroits inhabituels³⁹.

2.1.2 Tumeurs bénignes

La moitié des tumeurs mammaires chez le chien sont des tumeurs bénignes. Les tumeurs bénignes sont bien délimitées, parfois même encapsulées. Elles n'envahissent pas le tissu avoisinant, mais plutôt le compriment. De plus, ces tumeurs sont bien différenciées. Elles ressemblent au tissu d'origine et prolifèrent lentement³⁹. Ces tumeurs peuvent être classifiées en sept sous-classes⁴⁰. Ces dernières comprennent l'adénome papillaire intraductal (papillome canalaire), les tumeurs mixtes bénignes, le fibroadénome, l'adénome, l'adénome complexe (adénomyoépithéliome), le myoépithéliome et l'adénome canalaire⁴⁰.

2.1.3 Tumeurs malignes

L'autre moitié des tumeurs mammaires sont malignes et caractérisées par leur capacité à envahir le tissu adjacent et de s'y établir. De plus, ces tumeurs prolifèrent de façon variable et ont une perte quasi totale de différenciation, ce qui rend leur origine difficile à identifier³⁹. La grande majorité (>95%) sont des carcinomes qui proviennent de l'épithélium glandulaire. Les tumeurs malignes épithéliales comprennent le carcinome *in situ*, le carcinome mucineux, le carcinome adénoquameux, le carcinome simple, ainsi que plusieurs autres variétés de

carcinomes. Moins de 5% des tumeurs malignes sont des tumeurs mésenchymateuses dans lesquelles on retrouve le chondrosarcome, les carcinosarcomes, qui sont un mélange de cellules épithéliales et mésenchymateuses malignes, le fibrosarcome, l'hémangiosarcome, ainsi que l'ostéosarcome qui est le type de sarcome le plus répandu. Les études révèlent que les glandes abdominales caudales et inguinales sont les plus affectées et la moitié des chiennes ont plus d'une tumeur au moment du diagnostic⁴¹.

2.2 Incidence

L'incidence peut varier selon l'origine et la population source des chiennes atteintes. Par exemple, l'incidence aux États-Unis est plus basse que dans d'autres pays ne pratiquant pas couramment l'ovariohystérectomie à un jeune âge⁴². Des sondages provenant des comtés d'Alameda et de Contra Costa aux États-Unis ont rapporté un taux d'incidence annuel estimé à 257,7 tumeurs mammaires malignes par 100 000 chiennes intactes⁴³. Une étude suédoise plus récente basée sur 80 000 femelles assurées, dont la plupart étaient sexuellement intactes, a déclaré un taux de 111 tumeurs mammaires (bénignes et malignes) par 10 000 chiens à risque de développer des tumeurs mammaires⁴⁴. Une autre grande étude de sujets assurés au Royaume-Uni a rapporté un taux d'incidence annuel de 205 tumeurs mammaires par 100 000 chiens. Cette étude comprenait toutes les tumeurs mammaires indépendamment de l'histologie.⁴⁵ Certaines régions européennes, dont le Danemark, la Norvège et l'Italie, gardent de très bons suivis de l'incidence des tumeurs mammaires canines en enregistrant le site, la race et l'âge des chiens, ce qui fournit un aperçu du risque de tumeurs mammaires dans ces pays où l'ovariohystérectomie n'est pas commune⁴⁶⁻⁴⁷.

2.3 Facteurs de risque

2.3.1 Hormones stéroïdiennes

Plusieurs facteurs peuvent augmenter le risque de développer des tumeurs de la glande mammaire chez la chienne (Figure 6)⁴⁸. Le facteur le plus important est la présence d'hormones stéroïdiennes telles que l'œstrogène et la progestérone, car comme mentionné ci-haut, celles-ci sont primordiales dans le développement lobulo-alvéolaire et canalaire de la glande mammaire⁴⁹. Chez la chienne intacte, chaque cycle œstral crée une hausse de ces hormones qui,

à leur tour, entraînent une prolifération lobulo-alvéolaire et canalaire, propulsant ainsi les cellules basales de réserve dans le cycle cellulaire⁴⁹⁻⁵⁴. Pendant la longue phase lutéale du cycle œstral canin, la glande mammaire est exposée à une forte concentration de progestérone qui engendre l'hyperplasie des cellules sécrétoires et myoépithéliales^{49, 55}. Les mécanismes possibles impliqués dans les tumeurs mammaires canines induites par la progestérone comprennent une régulation à la hausse de la production d'hormones de croissance (GH) dans la glande mammaire⁵⁶⁻⁵⁷. On spécule que la GH stimule la prolifération des cellules souches mammaires comme première étape dans le processus de carcinogenèse mammaire^{56, 58}. Par ailleurs, la stérilisation avant la première chaleur diminue les taux d'œstrogène et de progestérone, ce qui, par conséquent, diminue les risques d'hyperplasie due aux augmentations d'hormones durant le cycle œstral, et, par le fait même, diminue la chance de développer des néoplasmes pouvant conduire à la formation de tumeurs mammaires⁵⁸.

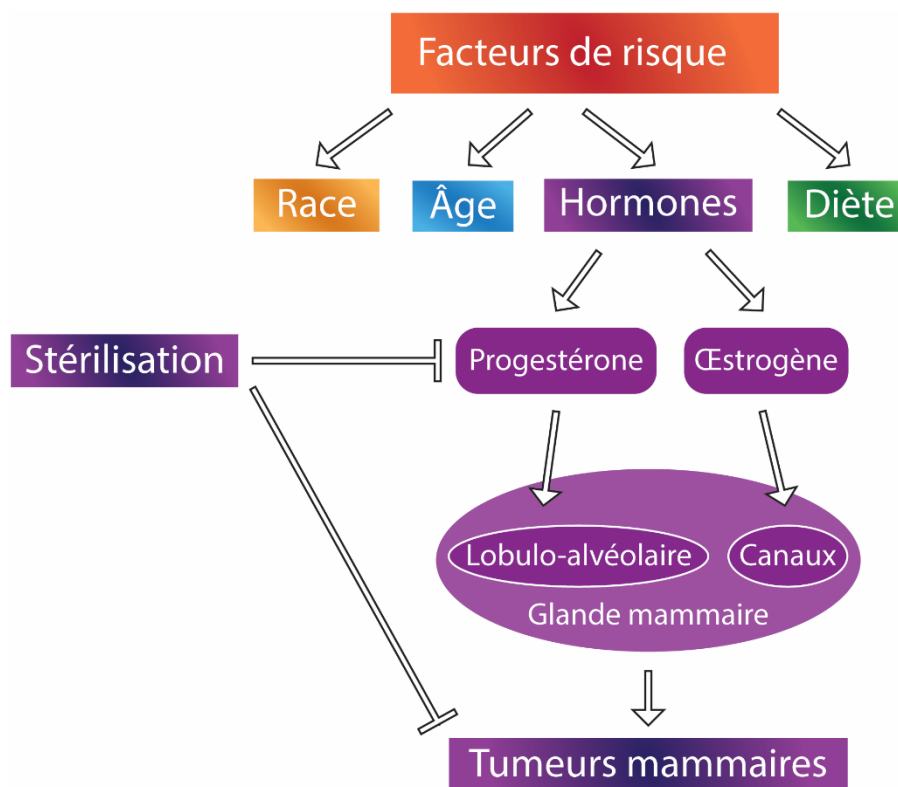


Figure 6. Facteurs de risque

Plusieurs facteurs de risque sont importants dans le développement de tumeurs mammaires canines tels que la race, l'âge, la diète et les hormones. Le plus important de ces facteurs est le niveau d'œstrogène et de progestérone. Ces hormones agissent sur le développement lobulo-alvéolaire et canalaire de la glande mammaire. La stérilisation avant la première chaleur diminue les taux hormonaux et l'incidence des tumeurs mammaires canines. Inspirée de ⁴⁸.

2.3.2 Autres

D'autres facteurs tels que la race, l'âge et la diète peuvent faire varier le risque de développer des tumeurs mammaires (Figure 6)^{48-51, 58-61}. En effet, certaines races telles que le caniche, le springer anglais, l'épagneul breton et le setter anglais sont plus à risque⁶¹⁻⁶². En moyenne, les chiennes qui développent des tumeurs mammaires ont entre 8 et 10 ans^{50, 61, 63}. D'autre part, l'obésité chez la chienne avant l'âge d'un an peut augmenter les niveaux d'œstrogène locaux et circulant librement, ce qui peut par le fait même augmenter le risque de développer des tumeurs mammaires^{59, 64-65}. Chez la femme, l'obésité augmente la circulation des œstrogènes libres et la production locale d'œstrogènes par le biais de l'aromatase. En outre, la leptine produite par les adipocytes peut promouvoir la prolifération des cellules cancéreuses du sein⁶⁶⁻⁶⁷. Il est possible que l'obésité chez les chiens ait un effet similaire. Par ailleurs, les adipocytes favorisent la malignité du cancer du sein exprimant potentiellement le MCT2 via le β -hydroxybutyrate en induisant la régulation positive épigénétique des gènes favorisant les tumeurs⁶⁸.

2.4 Étiologie

Plusieurs processus moléculaires sont déjà identifiés comme facteurs étiologiques des tumeurs mammaires canines. Quelques-uns d'entre eux-ci sont détaillés dans le Tableau 1 ci-dessous^{4, 69}. La compréhension de l'étiologie moléculaire des tumeurs mammaires canines est essentielle au développement de nouveaux traitements.

Tableau 1 : Étiologie moléculaire des tumeurs mammaires canines.

Inspiré de ⁶⁹.

Groupement	Facteur	Rôle	Étiologie	Étude
Hormone de croissance et récepteur d'hormone de croissance	Hormone de croissance (GH) et récepteur d'hormone de croissance (GHR)	Augmente la prolifération cellulaire	Le potentiel prolifératif et anti-apoptotique élevé des cellules cancéreuses mammaires canines est lié à l'augmentation de la régulation de GHR	70-71
Téломérase	Téломérase et téломérase transcriptase inverse (TERT)	Maintient les téломères pour protéger la fin du chromosome des dommages causés par l'ADN ou de la fusion avec les chromosomes voisins	L'épissage alternatif et la surexpression permettent de surmonter la sénescence répliquative des tissus normaux après un nombre défini de divisions cellulaires	72-73
Marqueurs de prolifération	Régions organisatrices des nucléolins argyrophiles (AgNOR)	Contrôle de la prolifération cellulaire	Des quantités élevées sont en corrélation avec l'augmentation du taux de division cellulaire	74
	Ki-67	Contrôle de la prolifération cellulaire	Des quantités élevées sont en corrélation avec un indice prolifératif accru	75
	Antigène nucléaire cellulaire proliférant (PCNA)	Contrôle de la prolifération cellulaire	Des quantités élevées sont en corrélation avec un indice mitotique augmenté	76
Défauts des gènes suppresseurs de tumeurs	<i>TP53</i> et p53	Voies de reconnaissance et de réparation des dommages à l'ADN	Les mutations de <i>TP53</i> et la surexpression de p53 conduisent à une division cellulaire incontrôlée	77-78
	Protéine homologue de phosphatase et tensine (PTEN)	Voies de reconnaissance et de réparation des dommages à l'ADN	La mutation du gène <i>PTEN</i> conduit à une prolifération cellulaire accrue et à une mort cellulaire réduite	79
Évasion de l'apoptose	Actif BCR-lié (<i>ABR</i>), Domaine TM2 contenant 1 (<i>TMD1</i>), Calpain	Gènes anti-apoptotiques : - <i>ABR</i> inhibe la réparation de l'ADN	L'expression élevée d' <i>ABR</i> , <i>TMD1</i> , <i>CAPN9</i> et <i>GRM4</i> conduit à une résistance à l'apoptose	71

	9 (<i>CAPN9</i>) et Récepteur de glutamate métabotrope 4 (<i>GRM4</i>)	<ul style="list-style-type: none"> - <i>TMD1</i> code le domaine TM, une partie des cassettes de liaison ATP - <i>CAPN9</i> est une enzyme liée au calcium - <i>GRM4</i> est lié à l'inhibition de la cascade d'AMP cyclique 		
	Protéine Bcl-2– <i>associated X</i> (Bax), caspases 8 et 3	<ul style="list-style-type: none"> - Bax est un membre proapoptotique de la famille Bcl-2 - Caspase 8 est une caspase initiatrice qui relie le récepteur de la mort et les voies mitochondriales de l'apoptose - Caspase 3 est une caspase effectrice qui clive et active la procaspase 8, amplifiant et accélérant ainsi le processus apoptotique 	L'expression diminuée des protéines pro-apoptotiques Bax, les caspases 8 et 3 conduit à l'évasion de l'apoptose	80
	Lymphome à cellules B 2 (Bcl-2) et Lymphome à cellules B – extra large (Bcl-xL)	Protéines antiapoptotiques proéminentes qui inhibent la libération de molécules proapoptotiques des mitochondries	L'augmentation de l'expression des protéines antiapoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL conduit à l'évasion de l'apoptose	80
	Hsp70 et Hsp90	Les protéines de choc thermique, qui fonctionnent comme des chaperons moléculaires, sont connues pour inhiber l'apoptose	L'expression améliorée de HSP-70 et -90 peut faciliter l'évasion de l'apoptose	80
	Survivin (ou BIRC5)	Inhibent l'activation des caspases, entraînant ainsi une régulation négative de l'apoptose ou de la mort cellulaire programmée	Absent dans les glandes mammaires canines normales, mais exprimé par la plupart des tumeurs malignes	81

Défauts dans les systèmes de réparation d'ADN	Gènes de susceptibilité au cancer du sein 2 (<i>BRCA-2</i>)	Recombinaison homologue et réparation de ruptures d'ADN double brin	Deux mutations missense situées à la BRC répétition 3, une séquence d'acides aminés importante pour l'interaction BRCA2 / RAD51, suggère que le recrutement réduit ultérieur de RAD51 nuit à la réparation de l'ADN et favorise le développement de la tumeur	82
	Protéine 1 de liaison à la topoisomérase d'ADN (TOPBP1)	Protéines nucléaires impliquées dans l'initiation des processus de réparation de l'ADN	L'expression de TOPBP1 est augmentée et sa localisation change d'origine nucléaire dans les glandes mammaires canines normales et les tumeurs bénignes à une origine à la fois nucléaire et cytoplasmique dans les tumeurs malignes, ce qui semble conduire à une carcinogenèse due à des défauts de réparation de l'ADN	83

2.5 Traitements

2.5.1 Chirurgie

Le traitement standard utilisé pour les tumeurs mammaires canines est la résection chirurgicale, sauf dans le cas de tumeurs hautement métastatiques ou de carcinomes inflammatoires. La résection permet une analyse histologique de la ou les tumeurs en question, permettant un diagnostic plus spécifique, ce qui peut aider à déterminer la probabilité du développement métastatique⁸⁴⁻⁸⁵. L'étendue de la chirurgie dépend de plusieurs facteurs tels que le drainage lymphatique, l'emplacement et la taille de la lésion ainsi que la condition clinique du patient. La chirurgie peut aller d'une simple nodulectomie, dans le cas de petites tumeurs, jusqu'à une mastectomie radicale dans le cas de lésions multiples^{42, 86}. La résection des nœuds lymphatiques peut aussi avoir lieu lorsque ceux-ci sont affectés^{42, 87}. Dans les cas où les tumeurs se sont répandues ou sont inopérables, d'autres options thérapeutiques doivent être envisagées.

2.5.2 Chimiothérapie

Comme pour le cancer du sein chez l'humain, la chimiothérapie peut servir de traitement contre les tumeurs mammaires canines dans les cas hautement métastatiques ou en tant que soins palliatifs. Les agents chimiothérapeutiques conventionnels utilisés en oncologie vétérinaire comprennent le 5-fluorouracile, la doxorubicine, le tamoxifène, le cyclophosphamide et la gemcitabine. Le Tableau 2 dresse une liste détaillant les agents chimiothérapeutiques testés pour le traitement des tumeurs mammaires canines, et comprend les résultats ainsi que les limites de ces études⁴⁸. Bien que ces agents chimiothérapeutiques soient utilisés chez la chienne, peu d'information est disponible quant aux dosages et combinaisons nécessaires pour une efficacité maximale contre les tumeurs mammaires canines⁸⁵. De plus, la plupart des résultats de ces études prospectives sur ces agents chimiothérapeutiques démontrent qu'ils présentent des toxicités très élevées. Cette toxicité est causée par la non-spécificité des agents qui ciblent non seulement les cellules tumorales, mais aussi les autres cellules du patient ayant un indice mitotique élevé⁸⁸.

Tableau 2. Agents chimiothérapeutiques pour les chiens atteints de tumeurs mammaires
Modifié de ⁴⁸.

Agents chimiothérapeutiques	Dose	Nombre de patients	Résultats	Effets secondaires et toxicité	Étude
5-fluorouracile et cyclophosphamide	150 mg/m ² 100 mg/m ²	16 (8 chirurgies seulement, 8 chirurgies avec chimiothérapie)	- Différence significative dans le temps médian de survie : - Groupe avec chirurgie seulement: 6 mois - Groupe chirurgical et chimiothérapie: 24 mois	Neutropénie légère, mais dans les limites normales	89
Paclitaxel	165 mg/m ²	25	- 20% : réponse partielle	- 64% : réaction allergique malgré l'administration	90

			- 20% : stabilité de la maladie	d'antihistaminiques et de corticostéroïdes - 24% : neutropénie de grade 2 ou 3 - 24%: hospitalisation requise - 12%: morts de sepsis	
Doxorubicine ou docétaxel	30 mg/m ² 30 mg/m ²	31 (19 chirurgies seulement, 12 chirurgies avec chimiothérapie)	Aucune différence significative dans l'intervalle sans récurrence, le temps de métastase et le temps de survie global	Réactions cutanées allergiques légères avec traitement au docétaxel	91
Gemcitabine	800 mg/m ²	19 (9 chirurgies seulement, 10 chirurgies avec chimiothérapie)	Aucune différence significative dans le temps pour la récurrence locale, le temps pour les métastases à distance et le temps de survie global	Neutropénie légère	92
Mitoxantrone et vincristine et cyclophosphamide	5,5 mg/m ² 0,75 mg/m ² 200 mg/m ²	30 avec carcinome inflammatoire (23 avec traitement palliatif seulement, 7	Le temps de survie du groupe de chimiothérapie a doublé, mais aucune rémission complète	57%: toxicité gastro-intestinale	93

		avec chimiothérapie)			
A) Doxorubicine et cyclophosphamide	30 mg/m ² 200 mg/m ²	12 (2 avec le protocole A de chimiothérapie, 1 protocole B de chimiothérapie, 7 avec piroxicam)	Une augmentation significative du taux de survie du groupe traité au piroxicam par rapport au groupe de chimiothérapie	Problème de saignement	94
B) Doxorubicine et cyclophosphamide et 5-fluorouracil	30 mg/m ² 200 mg/m ² 150 mg/m ²				
Gemcitabine et Carboplatin	2 mg/kg 10 mg/kg	37 avec différents types de carcinomes (2 avec des tumeurs mammaires canines)	<ul style="list-style-type: none"> - Taux de réponse tumorale globale de 13% - 1 rémission complète - 2 rémissions partielles - 12 maladies stables pour une médiane de 72 jours 	<ul style="list-style-type: none"> - 32%: neutropénie - 24%: thrombocytopénie - 73%: toxicité gastro-intestinale 	95

3 La voie Hippo

3.1 Voie canonique

3.1.1 Signaux en amont

La voie Hippo est d'abord activée par divers stimuli extracellulaires tels que la forme et la polarité cellulaire ou le contact cellulaire, qui vient ensuite activer des signaux en amont (Figure 7)⁹⁶⁻⁹⁹. Plus de 20 signaux différents en amont ont été identifiés comme étant des activateurs de la voie Hippo, et ce, à divers niveaux de la voie¹⁰⁰⁻¹⁰⁶. De ces signaux en amont, on retrouve FAT4^{100, 104-105, 107}, Scribble¹⁰⁸⁻¹¹², « Crumbs homolog complex » (CRB)¹¹³⁻¹¹⁶ (Figure 7). Par ailleurs, tous ces signaux en amont interagissent entre eux. Par exemple, CRB interagit avec l'actine du cytosquelette pour induire en état rigide ou souple de cette dernière, afin d'ultimement activer la voie Hippo¹¹³⁻¹¹⁶.

La voie de signalisation Hippo

Stimuli extracellulaires

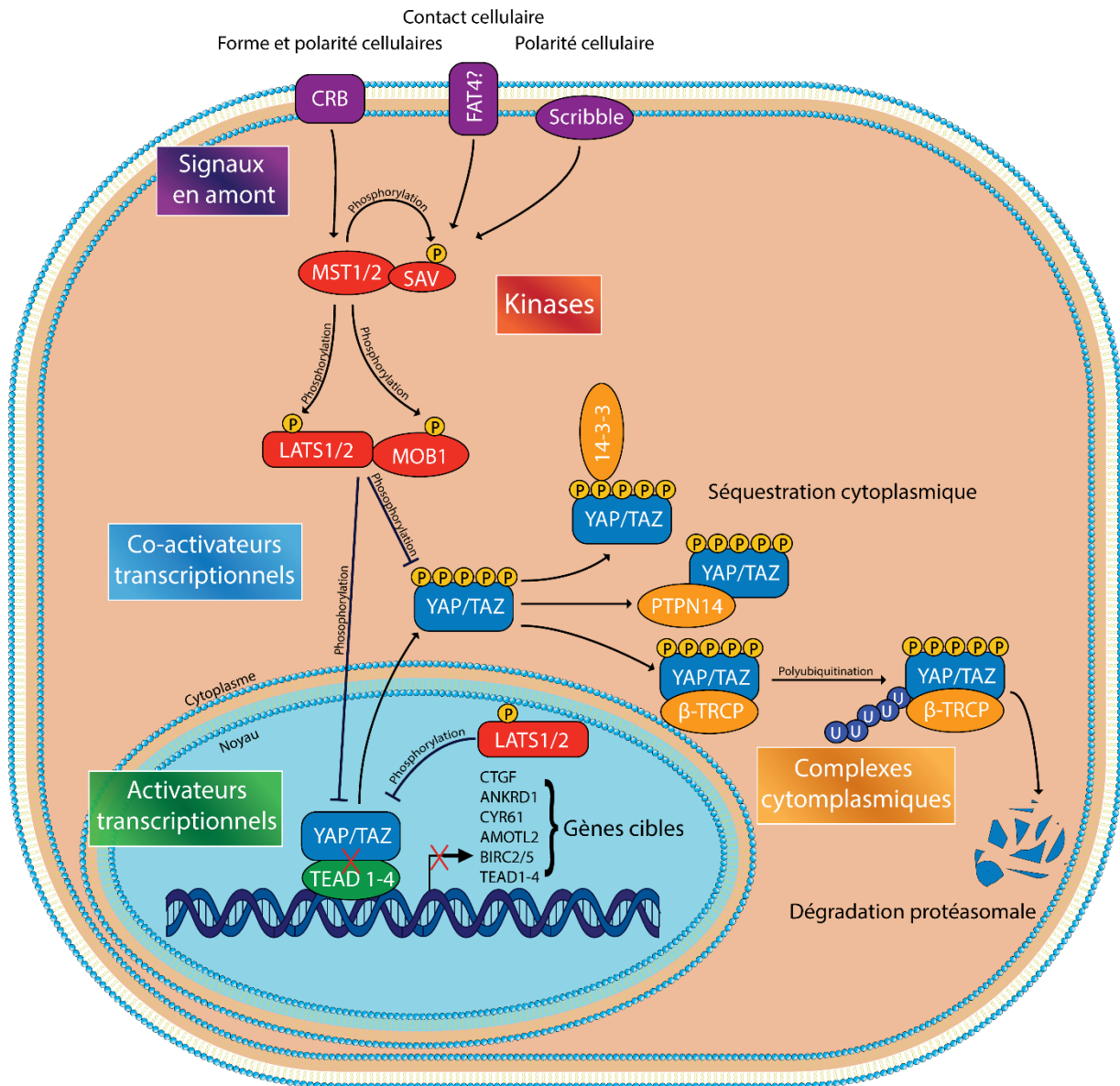


Figure 7. La voie de signalisation Hippo

L'activation de la voie est entamée par des stimuli extracellulaires qui activent les signaux en amont (en mauve). Les signaux en amont activent ensuite la cascade de kinases (en rouge), qui va par la suite phosphoryler YAP et TAZ (en bleu). Cette phosphorylation séquestre YAP et TAZ dans le cytoplasme et promeut leur liaison à la protéine 14-3-3 ou leur dégradation par le système ubiquitine-protéasome. Par ailleurs, la désactivation de la voie permet à YAP et TAZ (en bleu) de transloquer vers le noyau et de se lier avec les facteurs de transcription (en vert). Cette liaison entame l'expression de gènes cibles de la voie Hippo

3.1.2 Cascade de kinases

Ces divers signaux vont ensuite activer la cascade de kinases de la voie Hippo canonique en commençant par les kinases sérine/thréonine « mammalian STE20 like protein kinase 1 and 2 » (MST1/2)^{96, 117-128}. Celles-ci vont par la suite phosphoryler la kinase et protéine d'échafaudage « Salvador homolog 1 » (SAV) et former un complexe avec cette dernière^{96, 122, 129-130}. Le complexe MST1/2-SAV va ensuite phosphoryler les kinases sérine/thréonine « large tumour suppressor homolog 1 and 2 » (LATS1/2)^{117-121, 123, 125-128} et la kinase et protéine d'échafaudage « MOB kinase activator 1A and B » (MOB1)¹³¹, ce qui va permettre à ces kinases de former un complexe (Figure 7).

3.1.3 Co-activateurs transcriptionnels

Ce complexe de kinases mentionné ci-haut va à son tour phosphoryler les co-activateurs transcriptionnels « Yes-Associated Protein » (YAP) et « Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif » (TAZ) sur cinq résidus sérine/thréonine pour YAP et quatre pour TAZ^{96, 122, 124, 132-133}. De ces phosphorylations, il y a deux emplacements de résidus phosphorylés majeurs pour chaque co-transcripteur, notamment S127 (séquestration cytoplasmique) et S381 (dégradation) pour YAP et S89 (séquestration cytoplasmique) et S311 (dégradation) pour TAZ¹³³⁻¹³⁵. La phosphorylation de YAP et TAZ va entamer la translocation de ces composants hors du noyau et/ou empêcher leur translocation vers le noyau (Figure 7).

3.1.4 Rétention cytoplasmique

Une fois dans le cytoplasme sous leur forme phosphorylée, deux cheminements sont possibles pour YAP et TAZ. L'un des cheminements est la séquestration dans le cytoplasme de YAP et TAZ, liés à un complexe avec la protéine 14-3-3 (suite à une phosphorylation au résidu S127 pour YAP ou S89 pour TAZ)^{134, 136-138}, ou la « protein tyrosine phosphatase non-receptor type 14 » (PTPN14)¹³⁹⁻¹⁴³. L'autre cheminement possible est la dégradation de YAP et TAZ par la machinerie cellulaire protéasomale. Cette dégradation est possible à la suite de la phosphorylation sur le résidu S381 pour YAP et S311 pour TAZ, qui favorise une phosphorylation additionnelle par CK1 et une polyubiquitination. Par la suite, un «

phosphodegron » est généré, formant ainsi un complexe avec « β -transducin repeat-containing E3 ubiquitin protein ligase » (β -TRCP) de la voie des Wnts (Figure 7)^{96, 122, 135, 137-138, 144-148}.

3.1.5 Translocation au noyau

Dans certains contextes physiologiques tels que la perte de contact cellulaire, ou pathologiques tels que la tumorigénèse, la cascade principale de kinases est soit inactivée ou rendue inefficace, conduisant à l'accumulation de YAP et TAZ dans le cytoplasme^{96, 122}. Ces derniers sont alors libres de transloquer vers le noyau et d'interagir avec les facteurs de transcription, notamment ceux de la famille « TEA domain-containing sequence-specific transcription factors » (TEAD)¹⁴⁹⁻¹⁵³. Par conséquent, la liaison entre YAP/TAZ-TEAD entraîne l'activation transcriptionnelle d'une série de gènes cibles tels que *CTGF*, *CYR61*, *ANKRD1*, *BIRC5*, *AXL*, *InhA* et *Col8a1* (Figure 7)^{109, 154-156}.

3.2 La voie Hippo dans le développement normal de la glande mammaire

Originellement découverte chez la drosophile, la voie Hippo est une voie de signalisation évolutivement conservée qui est impliquée dans la régulation de processus aussi divers que la croissance des tissus et des organes, la détermination du destin cellulaire, la différenciation, la prolifération et l'apoptose dans une variété de types de cellules, dont les cellules de la glande mammaire^{91, 97, 157-158}. La voie Hippo régularise le développement de la glande mammaire durant plusieurs étapes du développement. Les composantes clés dans ce développement sont SAV1, LATS1, YAP et TAZ¹⁵⁹⁻¹⁶¹.

3.2.1 SAV1

La kinase SAV1 régule négativement l'effecteur YAP lorsque la voie Hippo est activée et que la kinase est phosphorylée. Dans les souris, qui ont une délétion de *Sav1* spécifique aux glandes mammaires (en croisant les allèles floxés de *Sav1* avec la recombinaison Cre-MMTV), le développement mammaire n'est pas affecté, sauf durant la période de gestation¹⁵⁹. Lors de la gestation, les cellules épithéliales des alvéoles mammaires de ces souris ne se différencient pas convenablement, ce qui diminue la quantité de gouttelettes lipidiques dans les alvéoles¹⁵⁹.

3.2.2 LATS1

D'autre part, la kinase LATS1 joue un rôle important dans le développement de la glande mammaire. Les souris femelles ayant une mutation nulle du *Lats1*, en insérant une cassette résistante à la néomycine (*Lats1*^{-/-}), possèdent une lacune de réserves de graisse au niveau de l'épithélium de la glande mammaire¹⁶¹.

De plus, ces souris femelles ayant une déficience de *Lats1* ont un tissu épithélial réduit au niveau de la glande mammaire et du mamelon¹⁶¹. Ces déficiences de l'épithélium des glandes peuvent être dues à la réduction d'hormone lutéinisante et de la prolactine, qui jouent un rôle important dans le développement de la glande mammaire et qui sont affectées par la kinase LATS1¹⁶¹.

3.2.3 YAP

En outre, le co-activateur transcriptionnel YAP joue aussi un rôle important durant la gestation au niveau de l'épithélium de la glande mammaire. YAP favorise la survie des cellules épithéliales de la glande mammaire. Chez les souris ayant une délétion de *Yap* spécifique aux glandes mammaires (en croisant les allèles floxés de *Sav1* avec la recombinaison Cre-MMTV), une augmentation de l'apoptose survient dans leurs glandes lors de la gestation¹⁵⁹. De plus, les alvéoles mammaires et leurs structures associées sont réduites durant la gestation¹⁵⁹.

3.2.4 TAZ

Le co-activateur transcriptionnel TAZ joue aussi un rôle important dans le développement des glandes mammaires. Chez les souris mutantes *Taz* (*Wwtr1lacZ* / *lacZ*), auxquelles l'exon 2 de *Taz*/*Wwtr1* a été remplacé par une cassette rapporteur *lacZ*-stop, les canaux des glandes mammaires sont réduits en nombre et en complexité à la puberté¹⁶⁰. Les déficiences des canaux chez ces souris sont causées par une réduction des cellules basales et une induction de la différenciation luminale¹⁶⁰.

3.3 Rôle dans la tumorigenèse mammaire

3.3.1 Cancer du sein

Le dérèglement de la voie Hippo est également impliqué dans plusieurs maladies ainsi que plusieurs formes de cancers, telles que le cancer des ovaires, du poumon, de la peau, du foie, du pancréas, du côlon et du sein^{138, 157, 162-166}. La voie Hippo est par conséquent un moteur important de l'initiation et de la progression tumorale^{91, 138, 157, 162-168}. De plus, des niveaux nucléaires élevés des principaux effecteurs de la voie, YAP et TAZ, semblent étroitement liés au développement du cancer du sein, mais également à la formation de métastases, à la résistance chimiothérapeutique et au pronostic^{91, 138, 157, 162-168}.

3.3.1.1 YAP et TAZ

Les principaux effecteurs de la voie, YAP et TAZ, jouent un rôle clé dans le développement de la tumorigenèse du cancer du sein¹⁶⁹. La surexpression de TAZ est présente dans environ 85% des cancers du sein de haut grade¹⁰⁹. L'induction d'une surexpression de TAZ dans des cellules de cancer du sein différenciées, non tumorales, ayant une faible expression de TAZ, induit une transformation cellulaire et confère une activité tumorigène et migratoire. À l'inverse, la perte de TAZ dans les cellules souches de cancer du sein entrave gravement la colonisation métastatique et la chimiorésistance.¹⁴⁹ YAP possède aussi un rôle important dans l'initiation de la transformation cancéreuse mammaire¹⁶³. Grâce à son domaine d'interaction avec TEAD, YAP favorise de multiples processus connus pour être importants pour la progression tumorale et la formation de métastases, y compris la prolifération, la transition épithélio-mésenchymateuse, la migration et l'invasion cellulaire. De plus, le potentiel métastatique du cancer du sein est fortement corrélé à l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de TEAD¹⁷⁰. En surcroît, la surexpression de YAP et de TAZ joue un rôle promoteur dans le maintien d'une colonie de cellules cancéreuses, car YAP et TAZ suppriment l'apoptose^{104, 129-130, 137}, incitent l'autorenouvellement, la prolifération^{153, 163, 171-172} et même la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) dans ces cellules^{109, 169, 171}. Le phénomène TEM est aussi associé à la chimiorésistance dans ce type de cancer¹⁷³⁻¹⁷⁴. La chimiorésistance dans le cancer du sein est aussi associée au développement de caractéristiques de cellules souches cancéreuses engendrées par la surexpression de TAZ et de YAP^{163, 173-177}.

3.3.1.2 Mécanismes de tumorigenèse

Par ailleurs, des niveaux élevés de YAP et/ou TAZ en raison d'une surexpression de ceux-ci ou d'une perte d'activation de la voie Hippo, engendrent l'augmentation de la prolifération des cellules cancéreuses mammaires^{137, 178-180}. Comme mentionné ci-haut, cette prolifération cellulaire semble être un résultat de l'interaction entre YAP/TAZ et les facteurs de transcription TEAD^{153, 172, 181}, puisque cette interaction mène à l'expression de gènes cibles importants pour la prolifération cellulaire tels que *AREG*, *AXL*, *FOXMI* et *CyclinD1*¹⁸²⁻¹⁸⁴. D'autre part, la survie cellulaire des cellules cancéreuses est modulée par YAP et TAZ, qui empêche la mort cellulaire normalement entamée par la perte de contact avec le substrat cellulaire en inhibant l'anoikis des cellules détachées¹⁸⁵, ou par les ligands de la famille du « tumor necrosis factor » (TNF): TNF et Fas¹³⁷. De plus, certains gènes cibles de YAP/TAZ-TEAD, tels que « connective tissue growth factor » (*CTGF*) et « cysteine-rich angiogenic inducer 61 » (*CYR61*), confèrent aussi aux cellules cancéreuses mammaires une résistance à l'agent chimiothérapeutique Paclitaxel¹⁷⁷. Les gènes *CTGF* et *Cyr61* font partie de la famille des facteurs de tissus conjonctifs CCN (*Cyr61*, *CTGF*, *Nov*) et réglementent la prolifération cellulaire, l'apoptose, la migration et l'adhésion cellulaire, ainsi que l'angiogenèse en fonctionnant comme ligands d'intégrines¹⁸⁶. Ces gènes ont déjà été identifiés comme des oncogènes qui sont activés dans les cancers du sein et qui provoquent une résistance à l'apoptose induite par Paclitaxel ou une hypoxie lorsqu'ils sont surexprimés dans les cellules épithéliales mammaires^{177, 187-188}.

3.3.2 Chez le chien et le chat

Une étude récente montre que les effecteurs YAP et TAZ de la voie Hippo jouent un rôle important dans les tumeurs mammaires canines et félines¹⁸⁹. Cette étude montre qu'il y a une expression élevée de YAP et TAZ dans les carcinomes mammaires félines et canins par rapport aux tissus mammaires normaux chez ces espèces¹⁸⁹. De plus, YAP et TAZ sont exprimés plus fortement au niveau nucléaire dans les tumeurs de grade III que dans celles de grade I¹⁸⁹. Ces résultats démontrent que YAP et TAZ sont plus présents dans les tumeurs mammaires plus avancées et agressives, et qu'ils jouent possiblement un rôle important dans l'évolution tumorale chez le chien et le chat¹⁸⁹.

3.3.3 Molécules modulatrices

Avec l'émergence du rôle de la voie Hippo dans le cancer mammaire, plusieurs équipes ont cherché à identifier des molécules modulatrices afin d'utiliser cette voie comme cible thérapeutique. Plusieurs difficultés surviennent avec le ciblage thérapeutique de la voie Hippo étant donné qu'elle est bénéfique lorsqu'elle est activée. Le ciblage pharmacologique favorise normalement la désactivation des voies ciblées, donc c'est pour cela que la voie Hippo est dite être une voie intraitable. Par contre, l'interaction entre YAP/TAZ-TEAD1-4 est une cible thérapeutique prometteuse, puisque la perturbation de celle-ci pourrait non seulement entraîner une diminution des niveaux nucléaires de YAP et TAZ, mais aussi une diminution de la transcription des gènes cibles tels que *CYR61*¹⁹⁰, *AXL*¹⁸³, *CTGF*¹⁹¹ et *EGFR*^{184, 192}. Cela pourrait ultimement diminuer la croissance tumorale et même renverser les caractéristiques de chimiorésistance des cellules cancéreuses. La découverte de l'implication de la voie Hippo dans le développement du cancer a suscité un effort massif pour identifier de nouvelles molécules qui ciblent les principaux composants de cette voie, en particulier la liaison entre YAP/TAZ et TEAD1-4⁹⁷. D'autre part, une autre étude récente comprenant 3300 médicaments approuvés par la « US Food and Drug Administration » (FDA) a identifié environ 71 médicaments potentiels, incluant la vertéporfin (Visudyne®, Novartis AG)^{38, 193}.

4 Ciblage thérapeutique

4.1 La vertéporfin

4.1.1 Propriétés photodynamiques

La vertéporfin est une molécule dérivée de la benzoporphyrine de la famille des porphyrines. Celle-ci est utilisée en clinique chez l'humain comme photosensibilisant dans la thérapie photodynamique de la dégénérescence maculaire néovasculaire¹⁹³. La thérapie photodynamique consiste en l'administration d'un agent activé par la lumière tel que la vertéporfin qui va s'accumuler au site de traitement dans le tissu pathologique. Lorsqu'une lumière avec une longueur d'ondes particulière sera appliquée, la molécule photodynamique induit une réaction photochimique, générant ainsi des dérivés réactifs de l'oxygène et d'autres radicaux libres¹⁹⁴.

Ces radicaux libres endommagent les cellules et entraînent la mort cellulaire par apoptose. Les propriétés photodynamiques sont investiguées en recherche dans le traitement de certains cancers tels que le cancer du pancréas et du sein¹⁹⁵⁻¹⁹⁶. La nécrose tumorale induite par la thérapie photodynamique avec la verteporfin dans le cancer pancréatique localement avancé est réalisable et sécuritaire. La verteporfin peut être administrée plus rapidement par l'application de faisceaux lumineux, et avec moins de photosensibilité qu'avec des composés plus anciens¹⁹⁶. De plus, la thérapie photodynamique avec la verteporfin visant la protéine du facteur VII conjugué (fVII) est efficace et sélective pour le traitement des cellules de cancer du sein positives pour le récepteur de fVII.¹⁹⁵

4.1.2 Propriétés non photodynamiques

La verteporfin a aussi des propriétés non photodynamiques, dont celle d'intervenir dans les liaisons entre YAP et TEAD1-4. Des études récentes sur le cancer du foie et du pancréas ont montré que la verteporfin a un effet de suppression sur la croissance tumorale^{131, 169}. En effet, la verteporfin interfère avec l'association de YAP avec les facteurs de transcription de la famille de TEAD, inhibant ainsi l'expression de gènes cibles tels que *CTGF*, *CYR61*, *ANKRD1*, *BIRC5*, *AXL*, *InhA* et *Col8a1* impliqués dans la survie et la prolifération cellulaire des cellules cancéreuses^{38, 109, 154-156, 197}.

En effet, la verteporfin a une activité anticancéreuse dans des modèles de xénogreffe de plusieurs types de cancer. La verteporfin a été identifiée comme un inhibiteur d'autophagosome en favorisant l'oligomérisation de p62. De plus, la verteporfin s'avère être protéotoxique de façon sélective pour les tumeurs (par oligomérisation de p62, STAT3) dans le cancer colorectal.¹⁹⁸ Par ailleurs, la verteporfin produit des dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) de manière indépendante de la lumière dans les cellules dérivées de xénogreffes des patients, et ce, dans la même mesure que la menadione, un producteur de DRO bien connu parmi diverses cellules¹⁹⁹. En outre, les cellules T24 et RP-B-01 (des modèles de xénogreffe dérivés de patients ayant un carcinome des cellules urothéliales et des cellules humaines de carcinome des cellules urothéliales humaines) ont montré une diminution de l'expression dose-dépendante des gènes en aval YAP-TEAD tels que le *CTGF* et la *Survivin*²⁰⁰. Cela suggère qu'on pourrait trouver des utilisations thérapeutiques pour la verteporfin au-delà de son utilisation approuvée par la FDA comme agent photosensibilisant^{193, 201}.

Le mécanisme d'action exact de la vertéporfin comme agent thérapeutique n'est pas encore bien compris, mais d'après les études mentionnées précédemment, la vertéporfin semble interagir avec les liaisons entre YAP/TAZ et TEAD 1-4 et les dissocient, entraînant soit une accumulation de ces composantes dans le noyau ou la translocation de ceux-ci vers le cytoplasme où YAP et TAZ pourraient être phosphorylés et séquestrés ou dégradés (Figure 8)^{38, 197}. Effectivement, la vertéporfin inhibe la translocation nucléaire et l'expression protéinique de YAP en favorisant sa séquestration cytoplasmique par 14-3-3 σ avec l'interférence de p53. La vertéporfin augmente les niveaux de p53 qui sont nécessaires pour les effets de la vertéporfin sur 14-3-3 σ et la prolifération cellulaire.²⁰² L'induction de 14-3-3 σ est médiée par un élément sensible à la p53 situé à 1,8 kb en amont de son site de départ de la transcription. L'introduction exogène de 14-3-3 σ dans les cellules cycliques entraîne un arrêt en phase G2.²⁰³ Ainsi, les effets de la vertéporfin peuvent se manifester plus clairement dans les cellules avec le type sauvage p53²⁰².

Effet de la verteoporfin sur la voie Hippo

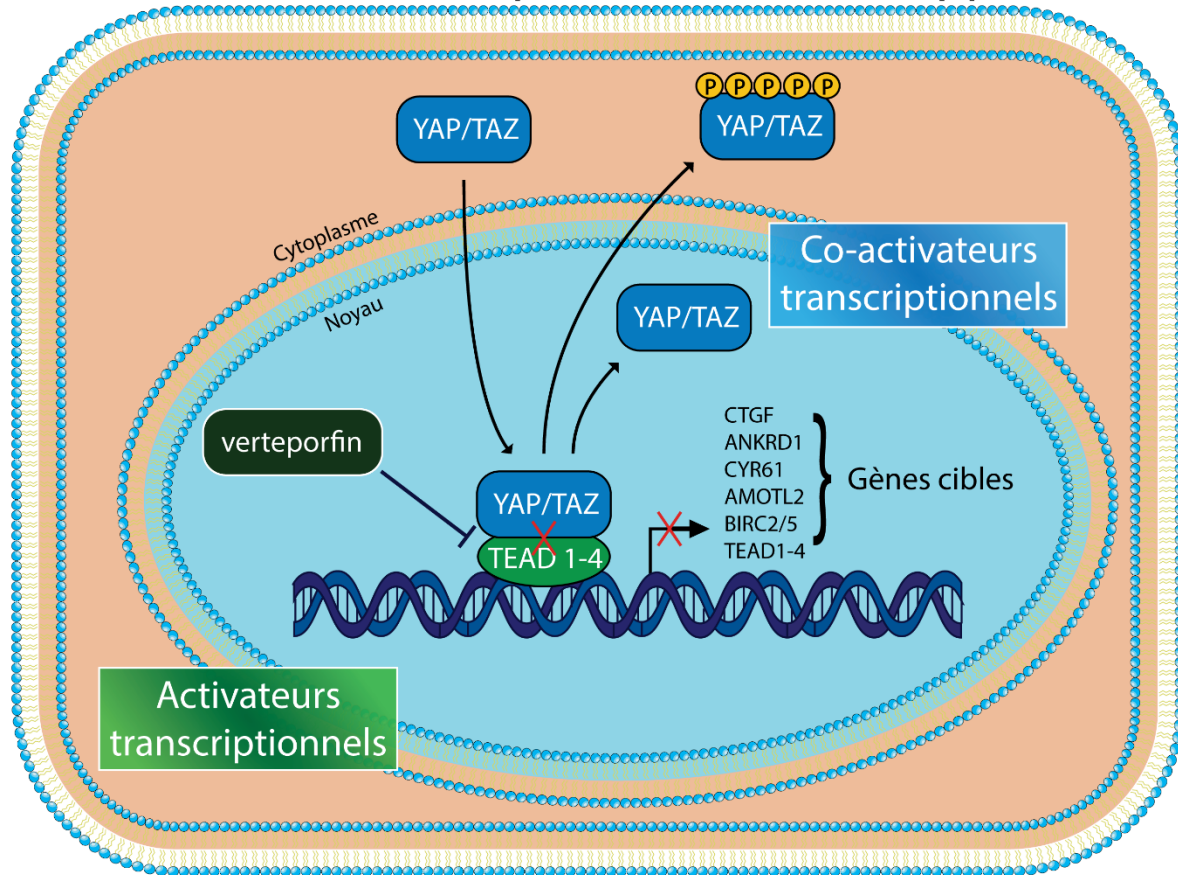


Figure 8. Effet de la verteoporfin sur la voie Hippo

La verteoporfin vient inhiber la liaison entre YAP/TAZ et les facteurs de transcription de la famille TEAD 1-4. L'effet net est une inhibition de la transcription des gènes cibles de la voie Hippo.

Hypothèse et objectifs

L'hypothèse est donc que le dérèglement de la voie Hippo contribue fréquemment au développement des tumeurs de la glande mammaire chez la chienne et que cette voie de signalisation représente une cible pharmacologique novatrice pour le traitement de la maladie.

Objectifs :

1. Déterminer l'occurrence du dérèglement de la voie Hippo dans les cultures cellulaires de tumeurs de la glande mammaire canine.
2. Démontrer que les lignées cellulaires tumorales de la glande mammaire canine, qui ont un dérèglement de la voie Hippo, possèdent une sensibilité accrue à la verteporfin.
3. Élucider les mécanismes d'action cellulaires de la verteporfin *in vitro*.
4. Élucider les mécanismes d'action moléculaires de la verteporfin *in vitro*.

Article en tant que première auteure

In vitro validation of the Hippo pathway as a pharmacological target for canine mammary gland tumors

Samantha Guillemette¹, Charlène Rico², Philippe Godin², Derek Boerboom² et Marilène Paquet¹.

Authors' affiliations:

¹ Département de pathologie et de microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada.

² Département de biomédecine vétérinaire, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada.

Corresponding author: Marilène Paquet, marilene.paquet@umontreal.ca, 450 773-8521.

Publié au *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* le 18 août 2017.
DOI: 10.1007/s10911-017-9384-9.

Abstract

Canine mammary tumors (CMTs) are the most common neoplasms in intact female dogs. Some clinical and molecular similarities between certain CMT subtypes and breast cancer make them a potential model for the study of the human disease. As misregulated Hippo signaling is thought to play an important role in breast cancer development and also occurs in CMTs, we sought to determine if Hippo represents a valid pharmacological target for the treatment of CMTs. Six CMT cell lines were assessed for their expression of the Hippo pathway effectors YAP and TAZ and for their sensitivity to verteporfin, an inhibitor of YAP-mediated transcriptional coactivation. Four cell lines that expressed YAP (CMT-9, -12, -28, -47) were found to be very sensitive to verteporfin treatment, which killed the cells through induction of apoptosis with ED50 values of 14-79 nM. Conversely, two YAP-negative cell lines (CF-35, CMT-25) were an order of magnitude more resistant to verteporfin. Verteporfin suppressed the expression of YAP/TAZ target genes, particularly CYR61 and CTGF, which play important roles in breast cancer development. Verteporfin was also able to inhibit cell migration and anchorage-independent growth. Likewise, verteporfin efficiently suppressed tumor cell invasiveness in the CMT-28 and -47 lines, but not in CF-35 cells. Together, our findings provide proof of principle that pharmacological targeting of the Hippo pathway compromises the viability and attenuates the malignant behavior of CMT cells. These results will serve as the basis for the development of novel chemotherapeutic approaches for CMTs that could translate to human medicine.

Keywords: Mammary gland tumors, dog, Hippo pathway, verteporfin, targeted chemotherapy.

Introduction

Canine mammary gland tumors (CMTs) are the most common neoplasms in intact female dogs and represent about half of all tumors in this species [1]. Fifty to 70% of dogs diagnosed with CMTs have multiple mammary tumors [2] and in these cases, different tumor subtypes are found [3]. Dogs develop benign and malignant mammary tumors, with 50% percent being malignant [4]. As in women, mammary gland carcinomas comprise the vast majority of malignant mammary tumors in dogs [1, 3]. Surgery remains the gold standard treatment for CMTs, and about 50% of dogs with malignant mammary carcinomas will be cured by surgery alone; the other half already having tumor cell emboli or (micro)metastases at the time of diagnosis. In the latter cases, even with surgical resection of the primary tumor, the prognosis for these patients remains poor [1, 5]. Patients with advanced disease or aggressive and invasive tumors would benefit from effective adjuvant therapies, even though there are no established guidelines for treatment beyond surgery [6]. Conventional chemotherapeutic agents used in veterinary oncology include cyclophosphamide, 5-fluorouacil, doxorubicin, docetaxel, gemcitabine and tamoxifen. These agents have been evaluated for the treatment of CMTs in small-scale studies, but with mitigated results, severe side effects and no obvious benefit for patient survival [7-9]. As with other cancer types, the development of effective chemotherapy treatments for CMTs depends on achieving a deeper understanding of the molecular and genetic processes that drive their development. Although progress over the course of the last fifteen years has begun to define the molecular mechanisms of CMTs [6, 8], this field remains in its infancy, and the identification of clinically exploitable pharmacological targets has so far remained elusive.

Hippo is an evolutionarily conserved signaling pathway that is involved in the regulation of processes as diverse as tissue growth, cell fate determination, differentiation, proliferation and apoptosis in a variety of cell types [10, 11]. Dysregulation of the pathway leads to tissue overgrowth and tumorigenesis [12]. Hippo does not have a specific extracellular ligand, rather signaling activity is controlled by stimuli such as cell-cell adhesion, contact inhibition, planar cell polarity, mechanotransduction [13-17], as well as various diffusible signals and cognate receptors [10, 12]. These regulate a core kinase cascade consisting of MST1 and MST2, which act in a functionally redundant manner to phosphorylate the kinases LATS1 and LATS2. The

latter phosphorylate the transcriptional co-activators YAP and TAZ (also known as WWTR1). Upon phosphorylation, YAP/TAZ are either ubiquitinated and degraded by the cellular proteosomal machinery or sequestered in the cytoplasm. Interruption of Hippo kinase cascade activity allows YAP and TAZ proteins to escape phosphorylation/degradation and accumulate within the cell. Following translocation to the nucleus, YAP/TAZ can bind to several transcription factors, notably those of the TEAD family, resulting in the modulation of the transcriptional activity of a variety of target genes in a cell type- and context-specific manner [18-20]. Although able to perform the same functions, the biological roles of YAP and TAZ are not entirely redundant, as evidenced by the divergent phenotypes of Yap and Taz knockout mice [21-23].

Dysregulation of Hippo signaling is a key feature of several forms of cancer, and is thought to be an important driver of tumor initiation and progression [11, 24]. Recent studies have shown that YAP and TAZ play crucial roles in the development of breast cancer [24-29] and, as importantly, they are also involved in the progression towards metastatic disease and the development of chemoresistance [28-32]. YAP and TAZ have been shown to be more highly expressed in CMTs than in normal canine mammary tissue, with nuclear expression being higher in high grade vs low grade carcinomas [33]. This suggests that misregulated Hippo signaling may play roles in the etiology and biology of CMTs similar to those that it plays in breast cancer, and that pharmacologic targeting of Hippo may be of therapeutic benefit in both species. Several small molecules that target specific effectors of the Hippo pathway have been identified, many of which are currently under investigation as anti-cancer agents [11]. Among these is verteporfin, a benzoporphyrin derivative that is FDA-approved for use in photodynamic therapy for macular degeneration [34, 35]. Verteporfin has been shown to antagonize YAP-mediated transcriptional co-activation by interfering with its ability to associate with TEADs, as well as by promoting its sequestration in the cytoplasm [36-38]. Recent studies have shown that verteporfin exerts cytotoxic effects in several cancer cell types, including pancreatic adenocarcinoma, ovarian carcinoma, chronic myeloid leukemia and non-small-cell lung carcinoma in both cell culture and xenograft models [38-43]. In this report, we sought to study the role of YAP/TAZ in CMT cell biology, and to determine if pharmacological targeting of the Hippo pathway could represent a viable therapeutic strategy for the treatment of CMTs.

Materials and Methods

Cell culture and viability assays

The CF-35 cell line (ATCC Cat# CRL-6229, RRID:CVCL_5261, passage 22) was provided by Dr. Monique Doré (Université de Montréal), and the CMT-9 (RRID:CVCL_U522, passage 25), CMT-12 (RRID:CVCL_L329, passage 28), CMT-25 (RRID:CVCL_L330, passage 25), CMT-28 (RRID:CVCL_1R42, passage 80) and CMT-47 (passage 33)[44] cell lines were provided by R. Curtis Bird (Auburn University). All lines were established from canine mammary gland carcinomas [44-46]. Additional information regarding the CF-35, CMT-9, -12, -25, and -28 cell lines is available at Cellosaurus (<http://web.expasy.org/cellosaurus/>). Cells were plated and cultured in MEM alpha 1X with 2g/L glucose, phenol red and L-glutamine (Wisent, Inc., St-Bruno, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum (Wisent, Inc., St-Bruno, Canada) and antibiotic-antimycotic solution (Wisent, Inc., St-Bruno, Canada). All cells were incubated at 37°C in 95% air and 5% CO₂. All assays were performed with cells at 30 to 40% confluence, except for the scratch and invasion assays, which required 100% confluence at the beginning of the experiment.

For the viability assay, cells were treated with vehicle (DMSO) or with graded concentrations (0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 µM) of verteporfin (Sigma, St. Louis, MO) for 48h. Numbers of viable cells per well were counted using the trypan blue exclusion assay and a hemocytometer. The number of viable cells in the verteporfin treated groups was then normalized to the number of viable cells in the control group. Each condition was repeated in triplicate. ED₅₀ values were calculated using Compusyn software (Combosyn, Inc., Paramus, NJ).

Immunoblotting

Proteins were extracted using M-PER® mammalian protein extraction reagent (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) according to the manufacturer's instructions and quantified using the Bradford method (BIO-RAD Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada). Samples (15 µg) were resolved on 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels and transferred to Hybond-P PVDF membrane (GE Amersham, Mississauga, ON, Canada). Blots were then probed at 4 °C overnight with antibodies against YAP (Cell Signaling Technology, Beverly, MA cat# 4912), TAZ (Cell Signaling Technology,

cat# 4883) or ACTB (Santa Cruz Biotechnology Inc, Dallas, TX, cat# sc-47778). ACTB was used as the loading control. Following incubation with horseradish peroxidase-conjugated secondary anti-rabbit antibody, the protein bands were visualized by chemiluminescence using Immobilon western hrp substrate (EMD Millipore, Etobicoke, ON, Canada). Signals were visualized on a Bio-Rad ChemiDoc MP imaging system (Bio-Rad Laboratories).

Apoptosis and cell cycle analyses

For the apoptosis assay, cells were cultured in 0.8 cm² wells (Thermo Scientific™ Nunc™ Lab-Tek™ Chamber Slide System, Thermo Fisher scientific, MA). Apoptosis was detected using the In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red (Roche, Laval, QC, Canada), following manufacturer's instructions. Cells were treated with vehicle (DMSO) or 3 μM verteporfin for 1, 3 or 6 hours. Apoptotic cells were imaged using an Axio Imager M.1 microscope (Zeiss, Toronto, ON, Canada) and AxioVision 4.6.3 software. For each sample, 6 photomicrographs of random fields were taken at 200x magnification, and cells were scored as viable or apoptotic and counted.

Cell cycle analysis was done using propidium iodide and fluorescence-activated cell sorting (FACS). Cells were treated with vehicle (DMSO) or 3 μM verteporfin for 6 or 24 hours. CF-35 cells were washed twice with PBS, counted and resuspended at a concentration of 10⁶ cells/ml in Krishan buffer: 0.1% Sodium Citrate, 0.02mg/ml RNase (DNase free), 0.3% NP-40 and 0.05mg/ml propidium iodide. Cells were incubated at least 30 minutes on ice in the dark before being analyzed on an Accuri C6 flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA), using BD Accuri C6 software version 1.0.264.21. Cells were gated according to a 2-parameter dot-plot: FL2-A (area) vs Width to monitor doublets. Cell cycle analysis was performed using a single-parameter histogram (FL2-A) with linear x-axis to represent DNA content. CMT-9, -28 and -47 cells were analyzed in a similar manner, except using Modfit LT software (Verity Software House, Topsham, ME). Each condition was repeated in triplicate.

Real-time PCR

Total RNA was isolated using the RNeasy Micro Kit (Qiagen, Valencia, CA). Cell lines CF-35, CMT-9, -28 and -47 were treated with vehicle (DMSO), 1 μM or 10 μM verteporfin for 1 or 4h. Each condition was repeated in triplicate. The RNA samples (200 ng) were analyzed by RT-quantitative PCR as previously described [47] using the primers listed in Table 1. Relative

mRNA expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [48] and normalized relative to ribosomal protein L19 (RPL19).

Cell migration assay

Confluent monolayers were scratched with a pipette tip in a cross pattern. All cell lines were then treated with graded doses of verteporfin (0.01, 0.03, 0.1 or 0.3 μM) or vehicle (DMSO). Each condition was repeated in triplicate. Photomicrographs were taken after scratching and at 3h intervals following each treatment using an Observer Z1 microscope (Zeiss) with Zen pro 2012 (blue edition) software at 25x magnification. Migration was assessed by calculating an open image area ratio (open image area at given time point / open image area at 0h) using TScratch software Version 1.0 (<http://www.cse-lab.ethz.ch>).

Cell invasion assay

Cell invasiveness was analyzed using the Oris Pro 96-well invasion assay (Playtypus technologies, Madison, WI) following the manufacturer's instructions. Cells were stained with the Vybrant CFDA SE cell tracer kit 24h prior to their plating, following the manufacturer's instructions (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Numbers of cells plated per well were 15 000, 25 000 and 30 000 for the CF-35, CMT-28 and CMT-47 cell lines, respectively. Cells were treated with 0.01 or 0.03 μM verteporfin or with vehicle (DMSO) for 40h. Photomicrography and data analyses were then performed as detailed for the migration assay, above.

Anchorage-independent growth assay

Soft agar colony formation assays were performed in six-well plates. CMT-9 (n=25 000) or CMT-47 (n=5 000) cells were suspended in culture medium containing 0.3% soft agar and plated on a 0.5% agar underlay. Cells were treated with either vehicle (DMSO) or graded concentrations of verteporfin. Vehicle or verteporfin treatments were added to both agar layers. An additional layer of culture medium (200 μl) containing verteporfin or vehicle was added twice weekly over the upper layer of agar to prevent desiccation. Plates were incubated at 37°C and the colonies counted after 3 weeks. All colonies greater than 100 μm in diameter were then counted using an Observer Z1 microscope (Zeiss) with the Zen pro 2012 (blue edition) software at 25x magnification. Each condition was repeated in triplicate.

Statistical analyses

Cell migration, invasion and anchorage-independent growth assays were analyzed by one-way ANOVA and Dunnett's multiple comparison test following logarithmic transformation to normalize data distribution. TUNEL and RT-qPCR data were analyzed by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test. TUNEL data underwent angular transformation prior to statistical testing. Cell cycle data was analyzed by unpaired parametric two-sided t test with Welch's correction (after angular transformation of data). For all tests, differences were considered significant when $P < 0.05$.

Results

Verteporfin sensitivity correlates with YAP expression in CMT cell lines

In order to evaluate Hippo as a therapeutic target for the treatment of CMTs, we started by characterizing YAP and TAZ expression in six CMT cell lines. Whereas YAP was readily detected in four of the cell lines (CMT-9, -12, -28, -47) by immunoblotting, it was essentially undetectable in CF-35 and in CMT-25 cells (Fig. 1). Conversely, TAZ was strongly expressed in all cell lines except CMT-25, in which expression levels were lower.

To determine the effect of verteporfin on the viability of CMT cells, all lines were treated with graded doses of verteporfin and the numbers of remaining viable cells counted after 48h. Results showed that verteporfin killed CMT-9, -12, -28, -47 cells with ED50 values from 14-79 nM, and that 3 μ M verteporfin killed all cells in these lines (Fig. 2). Verteporfin also killed CF-35 and CMT-25 cells, but ED50 values were in the hundreds of nM, and >25% of cells survived the 3 μ M treatment. These results indicate that verteporfin exerts cytotoxic effects on CMT cells, and suggest that this toxicity is partially dependent on YAP expression.

Verteporfin induces apoptosis in CMT cell lines

As YAP/TAZ serve as co-activators of the transcription of several genes associated with cell survival and proliferation [13, 26, 49-51], we sought to determine the effects of verteporfin on apoptosis and cell cycle progression in CMT cells. Using one verteporfin-resistant (CF-35) and three verteporfin-sensitive (CMT-9, -28, -47) lines, we assessed the proportion of TUNEL-positive cells on a time course following treatment with 3 μ M verteporfin. In all lines, verteporfin induced apoptosis by 6h following treatment (Fig. 3). The same lines were treated

with verteporfin for 6 or 24h, and cell cycle analyses were done by flow cytometry. As shown in Table 2, verteporfin caused statistically significant changes in the proportion of cells in each phase of the cycle in CMT-9 and -28 cells, but not in CF-35 or CMT-47 cells. However, these changes were very minor, and did not show a pattern suggestive of cell cycle arrest. Together, these data suggest that verteporfin exerts its cytotoxic effect mainly via the induction of apoptosis, and has a negligible effect on cell proliferation in CMT cells.

Verteporfin affects the expression of Hippo target genes

To determine if verteporfin affects gene expression in CMT cells, we measured mRNA levels for four cancer-relevant YAP/TAZ target genes (AMOTL2, CTGF, ANKRD1 and CYR61) following 1h or 4h treatment with 1 μ M or 10 μ M verteporfin. Although verteporfin modestly decreased AMOTL2 and ANKRD1 expression in some cell lines, CTGF and CYR61 decreased rapidly and dramatically in all lines tested (Fig. 4). CTGF and CYR61 therefore appear to be major YAP transcriptional target genes in CMT cells.

Cancer cell migration, invasion and anchorage-independent growth are inhibited by verteporfin

Scratch assays were done in order to determine if verteporfin could affect CMT cell migration. Confluent monolayers of CMT-9, -28, -47 and CF-35 cells were scratched, and cell migration into the newly created gap was monitored for 12h in presence or absence of 0.3 μ M verteporfin. Whereas control CF-35, CMT-28 and CMT-47 cells migrated so as to nearly fill the scratch within 12h, verteporfin treatment almost completely inhibited cell migration (Fig. 5). CMT-9 cells failed to migrate, even in absence of verteporfin.

The Oris™ Pro cell migration assay was used in order to determine if verteporfin could compromise the ability of CMT cells to invade an artificial matrix. Verteporfin concentrations as low as 0.03 μ M significantly inhibited CMT-28 and CMT-47 cell invasiveness, but did not impede CF-35 cells (Fig. 6). CMT-9 cells did not invade the matrix under any conditions.

Finally, we determined the effects of verteporfin on anchorage-independent growth. CMT cell lines were plated in soft agar with graded concentrations of verteporfin (present in both the agar and in the culture media overlay), and colony formation was monitored for three weeks. CF-35 and CMT-28 cells failed to form colonies even in absence of treatment, but CMT-

9 and -47 formed colonies readily. In the latter lines, 1 μ M verteporfin completely prevented the formation of colonies larger than 100 microns in diameter (Fig. 7).

Discussion

Canine mammary tumors are among the most frequent cancers in dogs, and the treatment of metastatic CMTs is an intractable problem in veterinary oncology. The development of effective chemotherapeutic options for advanced CMTs depends on attaining a better understanding of the molecular mechanisms underlying CMT progression. In this report, we found high levels of expression of the Hippo signaling effectors YAP and TAZ in the majority of the CMT cell lines that we studied, which is consistent with a recent report describing increased YAP/TAZ expression in CMTs relative to normal canine mammary tissue [33]. We were then able to demonstrate the cytotoxicity of verteporfin, a pharmacologic inhibitor of YAP-mediated transcriptional co-activation, to CMT cells. Our studies showed that verteporfin inhibited cell survival as well as key behaviors of malignant cells, including migration, invasion and anchorage-independent growth, and did so (at least in part) by decreasing the mRNA levels of YAP/TAZ target genes. These findings provide important proof of principle that Hippo pathway represents a valid therapeutic target for the treatment of this disease. Beyond the field of veterinary medicine, we expect that these findings will have important translational value. Indeed, overwhelming evidence supports a role for dysregulated Hippo signaling in the etiology of breast cancer, notably in the development of key malignant traits such as invasiveness, resistance to chemotherapy and metastatic dissemination [24, 26, 28, 29, 32, 52]. Our study therefore further highlights the similarities between CMTs and breast cancer and the value of CMTs as a spontaneous model for the study of the human disease.

Our identification of CYR61 and CTGF as transcriptional targets of YAP in CMT cells may provide important insight into the mechanism of action of Hippo signaling in CMTs. Both CYR61 and CTGF belong to the CCN gene family, and encode cysteine-rich extracellular matrix proteins that function as integrin ligands [53]. High CYR61 expression in breast cancer patients has been associated with metastatic dissemination and poor prognosis [53-55]. In cell culture and xenograft models, CYR61 has been shown to increase VEGF secretion and promote tumor vascularization, as well as to promote estrogen-independent tumor cell growth, invasiveness and metastasis [53, 54, 56-58]. As for CYR61, high CTGF expression in primary

breast cancers was associated with features of advanced disease, and correlated with stage, tumor size and lymph node involvement [53, 59]. Overexpression of CTGF in breast cancer cells was shown to promote migration, angiogenesis and chemoresistance [53, 60, 61]. Conversely, concomitant knockdown of CYR61 and CTGF in breast cancer cells reversed Taxol resistance caused by TAZ [52, 62]. Together, these studies have identified CYR61 and CTGF as major Hippo-regulated promoters of breast cancer development and progression. Whether these genes play similar roles in CMTs will be grounds for further study.

Our finding that the four CMT cell lines that expressed YAP were highly sensitive to the cytotoxic effects of verteporfin, whereas the two YAP-negative lines were resistant, strongly suggests that the effects of verteporfin were the result of the interference with YAP. However, higher concentrations of verteporfin were nonetheless capable of killing YAP-negative cells, and verteporfin was as capable of reducing CYR61 and CTGF expression in (YAP-negative) CF-35 cells as it was in YAP-positive cells. One possible explanation for this is the functional redundancy of YAP and TAZ. For instance, should verteporfin be capable of suppressing TAZ-mediated transcriptional co-activation at a higher concentration than that required to suppress YAP, this would 1) explain how YAP-negative/TAZ-positive cell lines exhibit cytotoxic effects at a higher ED50 and 2) provide a mechanism whereby verteporfin can suppress the expression of Hippo target genes in YAP-negative cells. Whether verteporfin can target TAZ has not been reported, but would seem likely given the structural and functional similarities between YAP and TAZ, including their ability to bind TEAD transcription factors.

Our *in vitro* studies indicate that verteporfin is capable of killing CMT cells at concentrations that are easily attained *in vivo* [43]. Indeed, verteporfin has been shown to have anti-cancer activity in xenograft models of several types of cancer [41, 63, 64], suggesting that it could find therapeutic uses beyond its FDA-approved use as a photosensitizing agent [34, 65-69]. However, its photosensitizing properties may ultimately limit its suitability for cancer chemotherapy, and it is also known to affect cellular processes such as autophagy at high doses through mechanisms that have not yet been defined [43]. The discovery of the involvement of the Hippo pathway in a variety of malignancies has fueled a search for small-molecule modulators of Hippo signaling, in the hopes of identifying new chemotherapeutic agents [11]. These efforts have yielded several advances, including the intriguing recent discovery that the statins act via the mevalonate pathway to inhibit YAP/TAZ nuclear localization and

transcriptional responses in several cancer cell types, including breast cancer [70-73]. Statins are broadly used in human medicine for their lipid-lowering effects, and have wide therapeutic indices. Interestingly, long-term statin use has been shown to lower the risk of breast cancer, although the basis for this protection has not been determined [74]. Together, these advances suggest that Hippo-targeted chemotherapies will become available for clinical use in the near future, and could provide an important advance in the treatment of cancers arising from dysregulated Hippo signaling, including CMTs.

Acknowledgements

The authors thank Ms. Meggie Girard for her excellent technical assistance and Mr. Guy Beauchamp for his statistical analyses.

Funding

This work was supported by a First Award grant from the Morris Animal Foundation to MP. SG was supported by a bursary from the Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Table 1. Oligonucleotide primer sequences

Primer name	Sequence
<i>AMOTL2</i> AS	AGCAACAGAATCCAGCGAGG
<i>AMOTL2</i> S	CCAAACACGGGAGCAGAGAT
<i>ANKRD1</i> AS	TGCTGAGCAACTTATCCCGAG
<i>ANKRD1</i> S	CCCAGATCGAATTCCGCGAT
<i>CTGF</i> AS	AAGCGGACGTCCATGCT
<i>CTGF</i> S	GTGTGCACGGCTAAAGACGG
<i>CYR61</i> AS	GAGAGCTCTTGGGGACACAG
<i>CYR61</i> S	CTGCAGAGCTCAGTCAGAGG
<i>RPL19</i> AS	TCCACGTTACCTTCTCAGGCATTC
<i>RPL19</i> S	CCAATGAGACCAATGAAATCGCCAA

Table 2. Cell cycle analyses

The indicated cell lines were treated with vehicle (DMSO) or 3 μ M verteporfin for 6h (upper table) or 24h (lower table). Data are expressed as percentages of total cells, and are means \pm SEM. For all analyses, n = 3/treatment and time, asterisks indicate significantly different from control (i.e., corresponding vehicle control), *p < 0.05, **p < 0.01.

	6h					
	vehicle			3 μ M verteporfin		
	G0/G1 Phase	S Phase	G2/M Phase	G0/G1 Phase	S Phase	G2/M Phase
CF-35	79,500 \pm 1,295	5,737 \pm 0,932	14,977 \pm 0,472	75,733 \pm 1,099	5,090 \pm 0,050	18,653 \pm 1,062
CMT-9	65,067 \pm 3,716	17,460 \pm 3,158	17,473 \pm 0,736	67,740 \pm 1,273	18,357 \pm 1,504	13,907 \pm 0,623 *
CMT-28	45,477 \pm 0,578	25,260 \pm 0,949	29,260 \pm 1,022	40,733 \pm 0,700 **	24,597 \pm 0,546	34,673 \pm 0,509 *
CMT-47	46,787 \pm 1,322	42,930 \pm 2,484	10,283 \pm 1,365	50,647 \pm 2,070	34,867 \pm 3,329	14,483 \pm 1,290

	24h					
	vehicle			3 μ M verteporfin		
	G0/G1 Phase	S Phase	G2/M Phase	G0/G1 Phase	S Phase	G2/M Phase
CF-35	79,333 \pm 1,300	7,217 \pm 1,002	11,857 \pm 0,382	80,390 \pm 0,356	6,287 \pm 0,093	12,080 \pm 0,474
CMT-9	69,327 \pm 1,235	17,623 \pm 0,195	13,050 \pm 1,420	67,987 \pm 0,376	19,100 \pm 0,129 **	12,920 \pm 0,361
CMT-28	52,120 \pm 0,281	32,840 \pm 0,146	15,043 \pm 0,138	55,617 \pm 0,434 **	29,260 \pm 0,866	15,120 \pm 0,438
CMT-47	52,527 \pm 0,260	29,287 \pm 1,557	18,183 \pm 1,565	52,340 \pm 0,116	34,370 \pm 0,513	13,287 \pm 0,497

References

1. Sleenckx N, de Rooster H, Veldhuis Kroeze EJ, et al. Canine mammary tumours, an overview. *Reprod Domest Anim.* 2011;46(6):1112-31.
2. Benjamin SA, Lee AC, Saunders WJ. Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles. *Vet Pathol.* 1999;36(5):423-36.
3. Sorenmo KU, Kristiansen VM, Cofone MA, et al. Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Vet Comp Oncol.* 2009;7(3):162-72.
4. Withrow SJ, Vail DM. *Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology.* 4th ed. St. Louis, Mo.: Saunders Elsevier; 2007. 1 texte électronique (xvii, 846) p.
5. Meuten DJ, Moulton JE. *Tumors in domestic animals.* Fifth edition. ed. Ames, Iowa: Wiley Blackwell; 2017. viii, 989 pages p.
6. Karayannopoulou M, Lafioniatis, S. Progrès récents chimiothérapie des tumeurs mammaires canines: examen des études de 2000 à ce jour. *Revue de Médecine Vétérinaire.* 2016;7-8(167):191-200.
7. Simon D, Schoenrock D, Baumgartner W, et al. Postoperative adjuvant treatment of invasive malignant mammary gland tumors in dogs with doxorubicin and docetaxel. *J Vet Intern Med.* 2006;20(5):1184-90.
8. Klopffleisch R, von Euler H, Sarli G, et al. Molecular carcinogenesis of canine mammary tumors: news from an old disease. *Vet Pathol.* 2011;48(1):98-116.
9. Marconato L, Lorenzo RM, Abramo F, et al. Adjuvant gemcitabine after surgical removal of aggressive malignant mammary tumours in dogs. *Vet Comp Oncol.* 2008;6(2):90-101.
10. Harvey KF, Zhang X, Thomas DM. The Hippo pathway and human cancer. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(4):246-57.
11. Johnson R, Halder G. The two faces of Hippo: targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(1):63-79.
12. Park HW, Guan KL. Regulation of the Hippo pathway and implications for anticancer drug development. *Trends Pharmacol Sci.* 2013;34(10):581-9.
13. Zhao B, Wei X, Li W, et al. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev.* 2007;21(21):2747-61.

14. Zhao B, Li L, Wang L, et al. Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induce anoikis. *Genes Dev.* 2012;26(1):54-68.
15. Halder G, Dupont S, Piccolo S. Transduction of mechanical and cytoskeletal cues by YAP and TAZ. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(9):591-600.
16. Low BC, Pan CQ, Shivashankar GV, et al. YAP/TAZ as mechanosensors and mechanotransducers in regulating organ size and tumor growth. *FEBS Lett.* 2014;588(16):2663-70.
17. Wada K, Itoga K, Okano T, et al. Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. *Development.* 2011;138(18):3907-14.
18. Zhao B, Ye X, Yu J, et al. TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes Dev.* 2008;22(14):1962-71.
19. Gomez M, Gomez V, Hergovich A. The Hippo pathway in disease and therapy: cancer and beyond. *Clin Transl Med.* 2014;3:22.
20. Piccolo S, Dupont S, Cordenonsi M. The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiol Rev.* 2014;94(4):1287-312.
21. Morin-Kensicki EM, Boone BN, Howell M, et al. Defects in yolk sac vasculogenesis, chorioallantoic fusion, and embryonic axis elongation in mice with targeted disruption of Yap65. *Mol Cell Biol.* 2006;26(1):77-87.
22. Hossain Z, Ali SM, Ko HL, et al. Glomerulocystic kidney disease in mice with a targeted inactivation of Wwtr1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(5):1631-6.
23. Makita R, Uchijima Y, Nishiyama K, et al. Multiple renal cysts, urinary concentration defects, and pulmonary emphysematous changes in mice lacking TAZ. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008;294(3):F542-53.
24. Vlug EJ, van de Ven RA, Vermeulen JF, et al. Nuclear localization of the transcriptional coactivator YAP is associated with invasive lobular breast cancer. *Cell Oncol (Dordr).* 2013;36(5):375-84.
25. Chen Q, Zhang N, Gray RS, et al. A temporal requirement for Hippo signaling in mammary gland differentiation, growth, and tumorigenesis. *Genes Dev.* 2014;28(5):432-7.
26. Barron DA, Kagey JD. The role of the Hippo pathway in human disease and tumorigenesis. *Clin Transl Med.* 2014;3:25.

27. Steinhardt AA, Gayyed MF, Klein AP, et al. Expression of Yes-associated protein in common solid tumors. *Hum Pathol.* 2008;39(11):1582-9.
28. Bartucci M, Dattilo R, Moriconi C, et al. TAZ is required for metastatic activity and chemoresistance of breast cancer stem cells. *Oncogene.* 2015;34(6):681-90.
29. Cordenonsi M, Zanconato F, Azzolin L, et al. The Hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells. *Cell.* 2011;147(4):759-72.
30. Lamar JM, Stern P, Liu H, et al. The Hippo pathway target, YAP, promotes metastasis through its TEAD-interaction domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(37):E2441-50.
31. Shi P, Feng J, Chen C. Hippo pathway in mammary gland development and breast cancer. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2015;47(1):53-9.
32. Chan SW, Lim CJ, Guo K, et al. A role for TAZ in migration, invasion, and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cancer Res.* 2008;68(8):2592-8.
33. Beffagna G, Sacchetto R, Cavicchioli L, et al. A preliminary investigation of the role of the transcription co-activators YAP/TAZ of the Hippo signalling pathway in canine and feline mammary tumours. *Vet J.* 2016;207:105-11.
34. Bressler NM. Verteporfin therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration: two-year results of a randomized clinical trial including lesions with occult with no classic choroidal neovascularization-verteporfin in photodynamic therapy report 2. *Am J Ophthalmol.* 2002;133(1):168-9.
35. Blinder KJ, Blumenkranz MS, Bressler NM, et al. Verteporfin therapy of subfoveal choroidal neovascularization in pathologic myopia: 2-year results of a randomized clinical trial-VIP report no. 3. *Ophthalmology.* 2003;110(4):667-73.
36. Wang C, Zhu X, Feng W, et al. Verteporfin inhibits YAP function through up-regulating 14-3-3sigma sequestering YAP in the cytoplasm. *Am J Cancer Res.* 2016;6(1):27-37.
37. Wei H, Wang F, Wang Y, et al. Verteporfin suppresses cell survival, angiogenesis and vasculogenic mimicry of PDAC via disrupting the YAP-TEAD complex. *Cancer Sci.* 2016.
38. Feng J, Gou J, Jia J, et al. Verteporfin, a suppressor of YAP-TEAD complex, presents promising antitumor properties on ovarian cancer. *Onco Targets Ther.* 2016;9:5371-81.
39. Felley-Bosco E, Stahel R. Hippo/YAP pathway for targeted therapy. *Transl Lung Cancer Res.* 2014;3(2):75-83.

40. Ma YW, Liu YZ, Pan JX. Verteporfin induces apoptosis and eliminates cancer stem-like cells in uveal melanoma in the absence of light activation. *Am J Cancer Res.* 2016;6(12):2816-30.
41. Zhang H, Ramakrishnan SK, Triner D, et al. Tumor-selective proteotoxicity of verteporfin inhibits colon cancer progression independently of YAP1. *Sci Signal.* 2015;8(397):ra98.
42. Li H, Huang Z, Gao M, et al. Inhibition of YAP suppresses CML cell proliferation and enhances efficacy of imatinib in vitro and in vivo. *J Exp Clin Cancer Res.* 2016;35(1):134.
43. Donohue E, Thomas A, Maurer N, et al. The autophagy inhibitor verteporfin moderately enhances the antitumor activity of gemcitabine in a pancreatic ductal adenocarcinoma model. *J Cancer.* 2013;4(7):585-96.
44. Lutful Kabir FM, Agarwal P, DeInnocentes P, et al. Novel frameshift mutation in the p16/INK4A tumor suppressor gene in canine breast cancer alters expression from the p16/INK4A/p14ARF locus. *J Cell Biochem.* 2013;114(1):56-66.
45. DeInnocentes P, Li LX, Sanchez RL, et al. Expression and sequence of canine SIRT2 and p53 genes in canine mammary tumour cells - effects on downstream targets Wip1 and p21/Cip1. *Vet Comp Oncol.* 2006;4(3):161-77.
46. Stokol T, Daddona JL, Mubayed LS, et al. Evaluation of tissue factor expression in canine tumor cells. *Am J Vet Res.* 2011;72(8):1097-106.
47. Abedini A, Zamberlam G, Lapointe E, et al. WNT5a is required for normal ovarian follicle development and antagonizes gonadotropin responsiveness in granulosa cells by suppressing canonical WNT signaling. *FASEB J.* 2016;30(4):1534-47.
48. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
49. Santucci M, Vignudelli T, Ferrari S, et al. The Hippo Pathway and YAP/TAZ-TEAD Protein-Protein Interaction as Targets for Regenerative Medicine and Cancer Treatment. *J Med Chem.* 2015;58(12):4857-73.
50. Fu D, Lv X, Hua G, et al. YAP regulates cell proliferation, migration, and steroidogenesis in adult granulosa cell tumors. *Endocr Relat Cancer.* 2014;21(2):297-310.
51. Aqeilan RI. Hippo signaling: to die or not to die. *Cell Death Differ.* 2013;20(10):1287-8.
52. Maugeri-Sacca M, De Maria R. Hippo pathway and breast cancer stem cells. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016;99:115-22.

53. Kleer CG. Dual roles of CCN proteins in breast cancer progression. *J Cell Commun Signal.* 2016;10(3):217-22.
54. Tsai MS, Bogart DF, Castaneda JM, et al. Cyr61 promotes breast tumorigenesis and cancer progression. *Oncogene.* 2002;21(53):8178-85.
55. Jiang WG, Watkins G, Fodstad O, et al. Differential expression of the CCN family members Cyr61, CTGF and Nov in human breast cancer. *Endocrine-related cancer.* 2004;11(4):781-91.
56. Sanchez-Bailon MP, Calcabrini A, Mayoral-Varo V, et al. Cyr61 as mediator of Src signaling in triple negative breast cancer cells. *Oncotarget.* 2015;6(15):13520-38.
57. Espinoza I, Menendez JA, Kvp CM, et al. CCN1 promotes vascular endothelial growth factor secretion through alphavbeta 3 integrin receptors in breast cancer. *J Cell Commun Signal.* 2014;8(1):23-7.
58. Harris LG, Pannell LK, Singh S, et al. Increased vascularity and spontaneous metastasis of breast cancer by hedgehog signaling mediated upregulation of cyr61. *Oncogene.* 2012;31(28):3370-80.
59. Xie D, Nakachi K, Wang H, et al. Elevated levels of connective tissue growth factor, WISP-1, and CYR61 in primary breast cancers associated with more advanced features. *Cancer Res.* 2001;61(24):8917-23.
60. Wang MY, Chen PS, Prakash E, et al. Connective tissue growth factor confers drug resistance in breast cancer through concomitant up-regulation of Bcl-xL and cIAP1. *Cancer Res.* 2009;69(8):3482-91.
61. Chien W, O'Kelly J, Lu D, et al. Expression of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in breast cancer cells is associated with increased migration and angiogenesis. *Int J Oncol.* 2011;38(6):1741-7.
62. Lai D, Ho KC, Hao Y, et al. Taxol resistance in breast cancer cells is mediated by the hippo pathway component TAZ and its downstream transcriptional targets Cyr61 and CTGF. *Cancer Res.* 2011;71(7):2728-38.
63. Morishita T, Hayakawa F, Sugimoto K, et al. The photosensitizer verteporfin has light-independent anti-leukemic activity for Ph-positive acute lymphoblastic leukemia and synergistically works with dasatinib. *Oncotarget.* 2016;7(35):56241-52.
64. Ciamporcero E, Shen H, Ramakrishnan S, et al. YAP activation protects urothelial cell carcinoma from treatment-induced DNA damage. *Oncogene.* 2016;35(12):1541-53.

65. Hussain RN, Jmor F, Damato B, et al. Verteporfin photodynamic therapy for the treatment of choroidal haemangioma associated with Sturge-Weber syndrome. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2016;15:143-6.
66. Gupta R, Browning AC, Wu K, et al. Verteporfin photodynamic therapy for the treatment of persistent subfoveal choroidal neovascularization after external beam radiotherapy: one-year results. *Am J Ophthalmol.* 2005;139(3):561-2.
67. Mori R, Kelkar A, De Laey JJ. Photodynamic therapy with verteporfin in Belgian patients with subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. *Bull Soc Belge Ophtalmol.* 2006(299):57-64.
68. Tayanithi P, Pisankosakul P, Laksakapuk P. Treatment of subfoveal choroidal neovascularization secondary to age related macular degeneration with single treatment of verteporfin photodynamic therapy: a safety and short-term outcome. *J Med Assoc Thai.* 2004;87 Suppl 2:S78-82.
69. Josefsen LB, Boyle RW. Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. *Met Based Drugs.* 2008;2008:276109.
70. Likus W, Siemianowicz K, Bienk K, et al. Could drugs inhibiting the mevalonate pathway also target cancer stem cells? *Drug Resist Updat.* 2016;25:13-25.
71. Wang Z, Wu Y, Wang H, et al. Interplay of mevalonate and Hippo pathways regulates RHAMM transcription via YAP to modulate breast cancer cell motility. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(1):E89-98.
72. Lin Q, Yang W. The Hippo-YAP/TAZ pathway mediates geranylgeranylation signaling in breast cancer progression. *Mol Cell Oncol.* 2016;3(3):e969638.
73. Sorrentino G, Ruggeri N, Specchia V, et al. Metabolic control of YAP and TAZ by the mevalonate pathway. *Nat Cell Biol.* 2014;16(4):357-66.
74. Undela K, Srikanth V, Bansal D. Statin use and risk of breast cancer: a meta-analysis of observational studies. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;135(1):261-9.

Figure Legends

Figure 1. Expression of YAP and TAZ in mammary gland tumor cell lines

Immunoblotting analysis of YAP and TAZ expression in canine mammary gland cancer cell lines (CF-35, CMT-9, -12, -28, -47, and -25). β -Actin (ACTB) was used as a loading control. Approximate apparent molecular weights are indicated to the right of the blots.

Figure 2. Viability experiment

The indicated cell lines were treated with vehicle (DMSO) or graded concentrations (0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 μ M) of verteporfin for 48 hours and viability assessed by trypan blue exclusion. Calculated median effective doses (ED50) are shown for each cell line. For all cell lines, $n = 3$ samples/dose, data are expressed as means (points) \pm SEM (error bars).

Figure 3. TUNEL assays

The indicated cell lines were treated with vehicle (DMSO) or 3 μ M verteporfin for 1, 3 or 6 hours and cells were counted and scored as TUNEL-positive or -negative. For all lines, $n = 6$ /treatment. All data are expressed as means (columns) \pm SEM (error bars), asterisks indicate statistically significant difference from control, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Figure 4. Effects of verteporfin on Hippo pathway target gene expression in CMT cell lines

The indicated cell lines were treated with vehicle (DMSO), 1 μ M or 10 μ M verteporfin for 1 or 4 hours (black and grey columns, respectively) and the expression of the indicated genes determined by RT-qPCR. All data were normalized to the housekeeping gene RPL19, $n = 3$ /treatment and time. Data are expressed as means (columns) \pm SEM (error bars), asterisks indicate statistically significant difference from control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Figure 5. CMT cell migration assays

The indicated cell lines were grown to confluence, the monolayers scratched, and the extent of cell migration from the margins (in presence or absence of 0.3 μ M verteporfin (VP)) evaluated after 12h. (A) Representative photomicrographs, dashed black lines indicate the original margins of the scratch. Cells are highlighted in light gray for contrast and for quantification. (B) Quantitative analysis of cell migration. Data represent the ratio of the cell-free area present at 12h to the original area of the scratch. Data are expressed as means (columns) \pm SEM (error

bars), asterisks indicate statistically significant difference from control (DMSO), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Figure 6. CMT invasion assays

The Oris™ Pro cell migration assay was used in order to determine the effect of verteporfin on CMT cell invasiveness. (A) Representative photomicrographs of results obtained with the CMT-47 line, dashed red circles indicate the margins of the artificial matrix. (B) Quantitative analyses of cell invasion. Data represent the ratio of the cell-free area present at 40h to the original area of the matrix. Data are expressed as means (columns) \pm SEM (error bars), asterisks indicate statistically significant difference from control, *** $p < 0.001$.

Figure 7. Anchorage-independent growth assays

The indicated CMT cell lines were plated in soft agar and treated with vehicle (DMSO) or graded concentrations of verteporfin. Colonies of cells with diameters exceeding 100 microns were counted after three weeks of culture. Data are expressed as means (columns) \pm SEM (error bars), asterisks indicate statistically significant difference from control, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

FIGURE 1

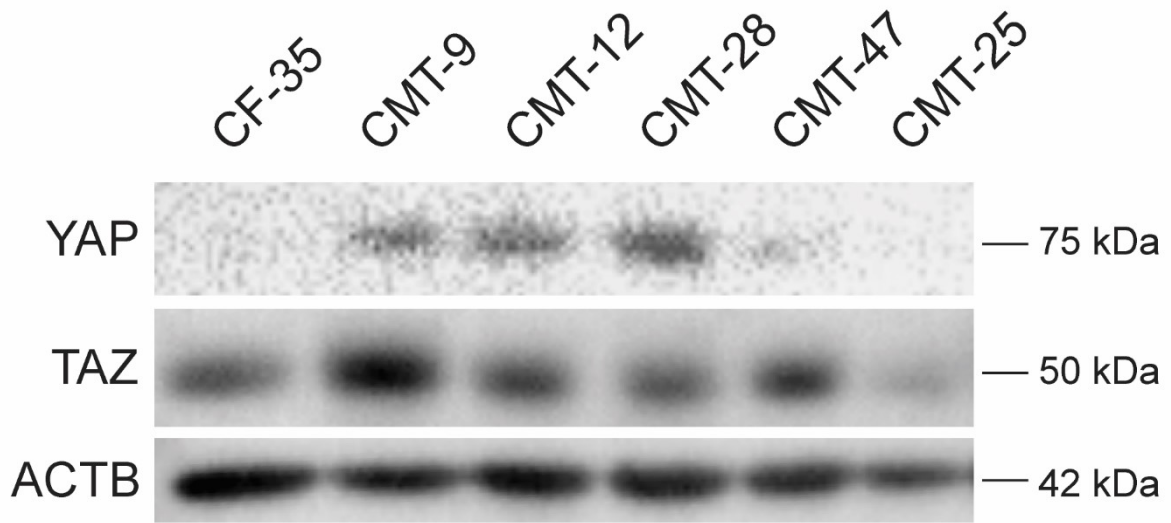
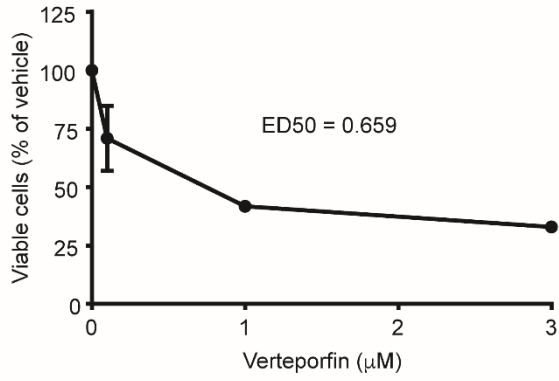
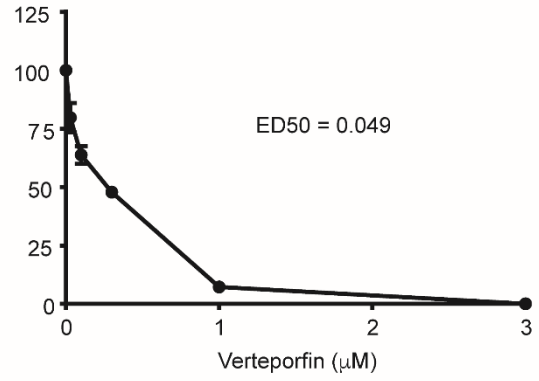


FIGURE 2

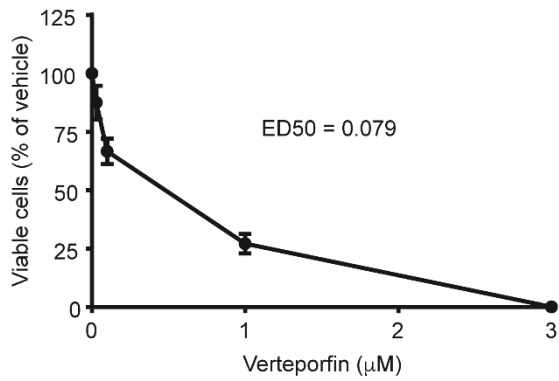
a. CF-35



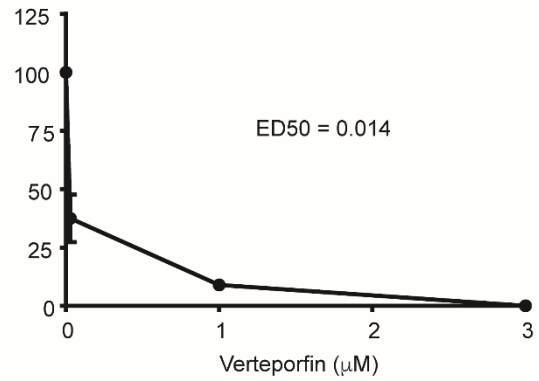
b. CMT-9



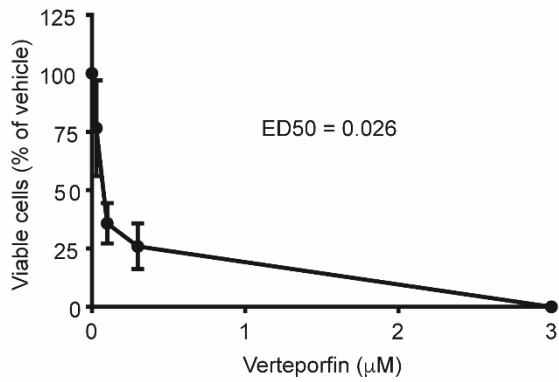
c. CMT-12



d. CMT-28



e. CMT-47



f. CMT-25

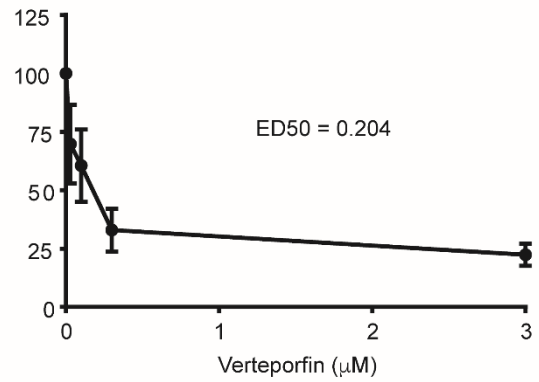
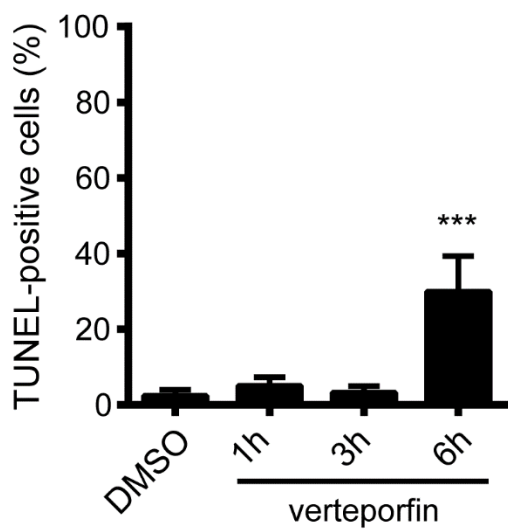
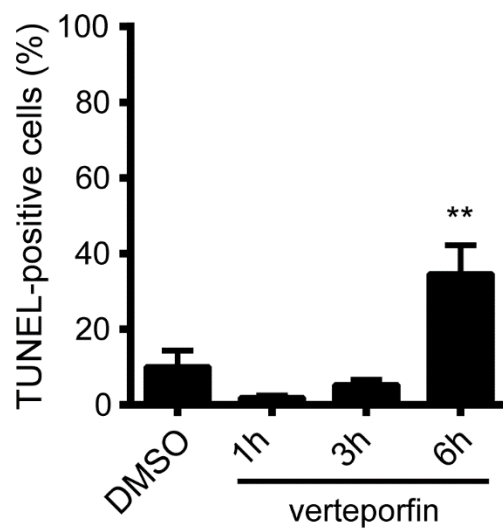


FIGURE 3

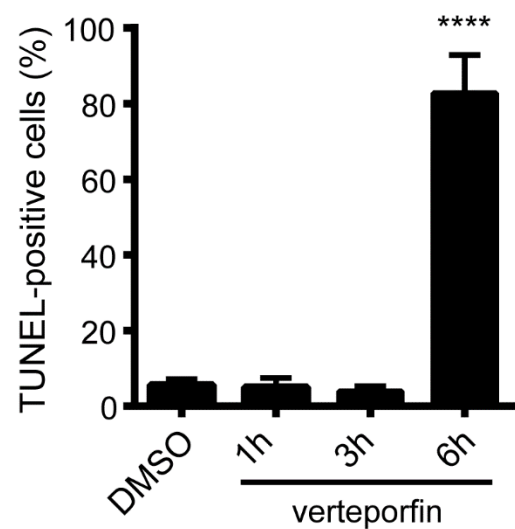
a. CF-35



b. CMT-9



c. CMT-28



d. CMT-47

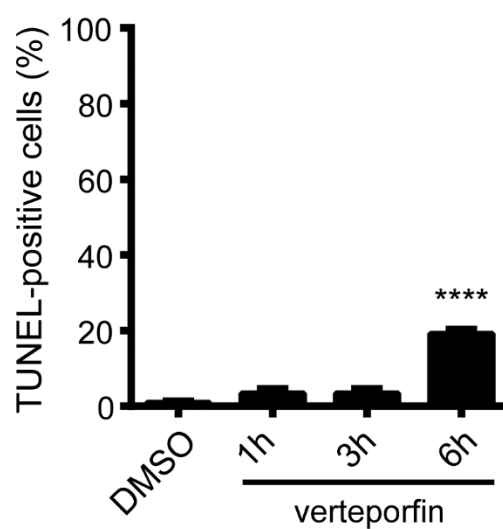


FIGURE 4

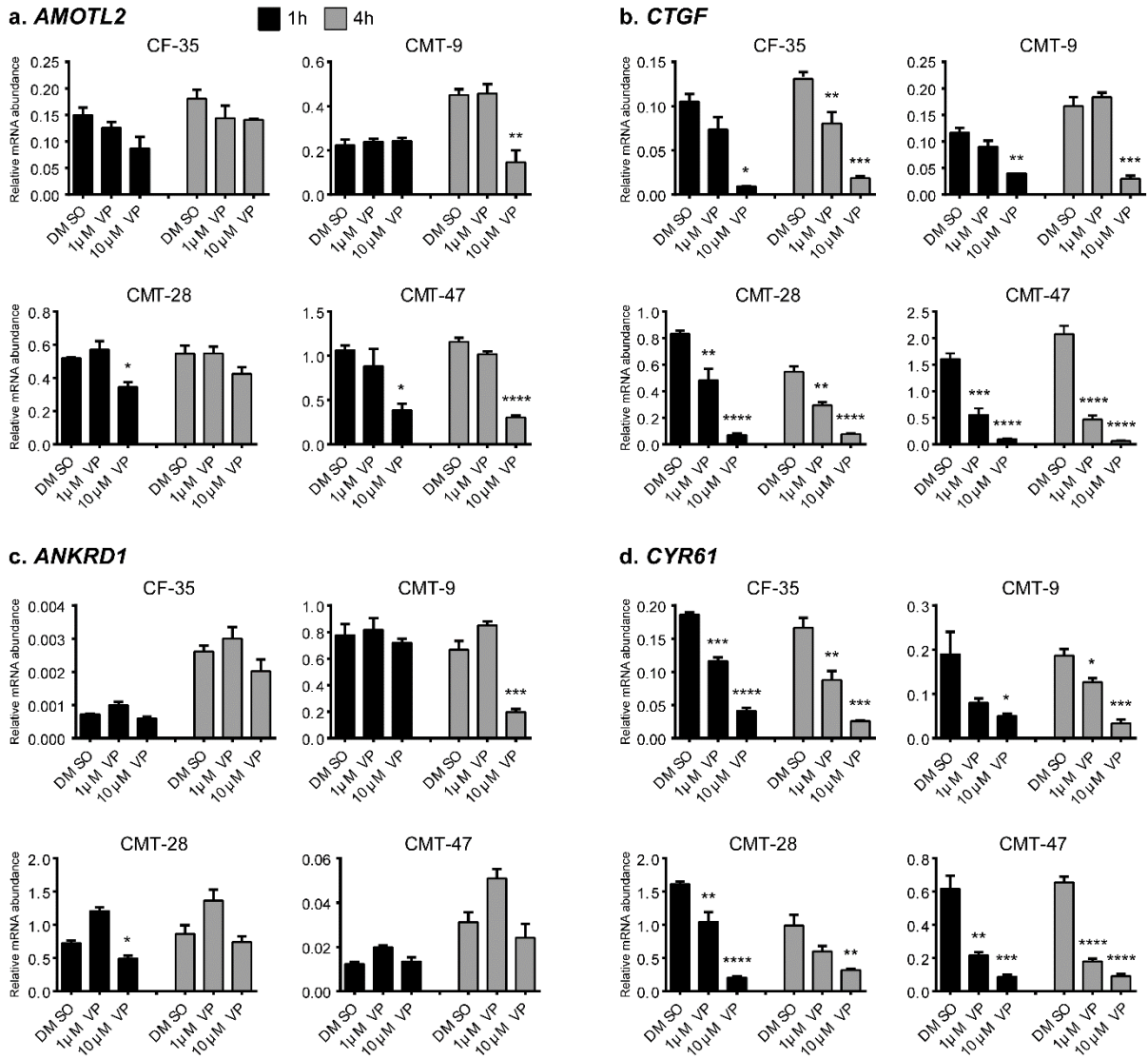
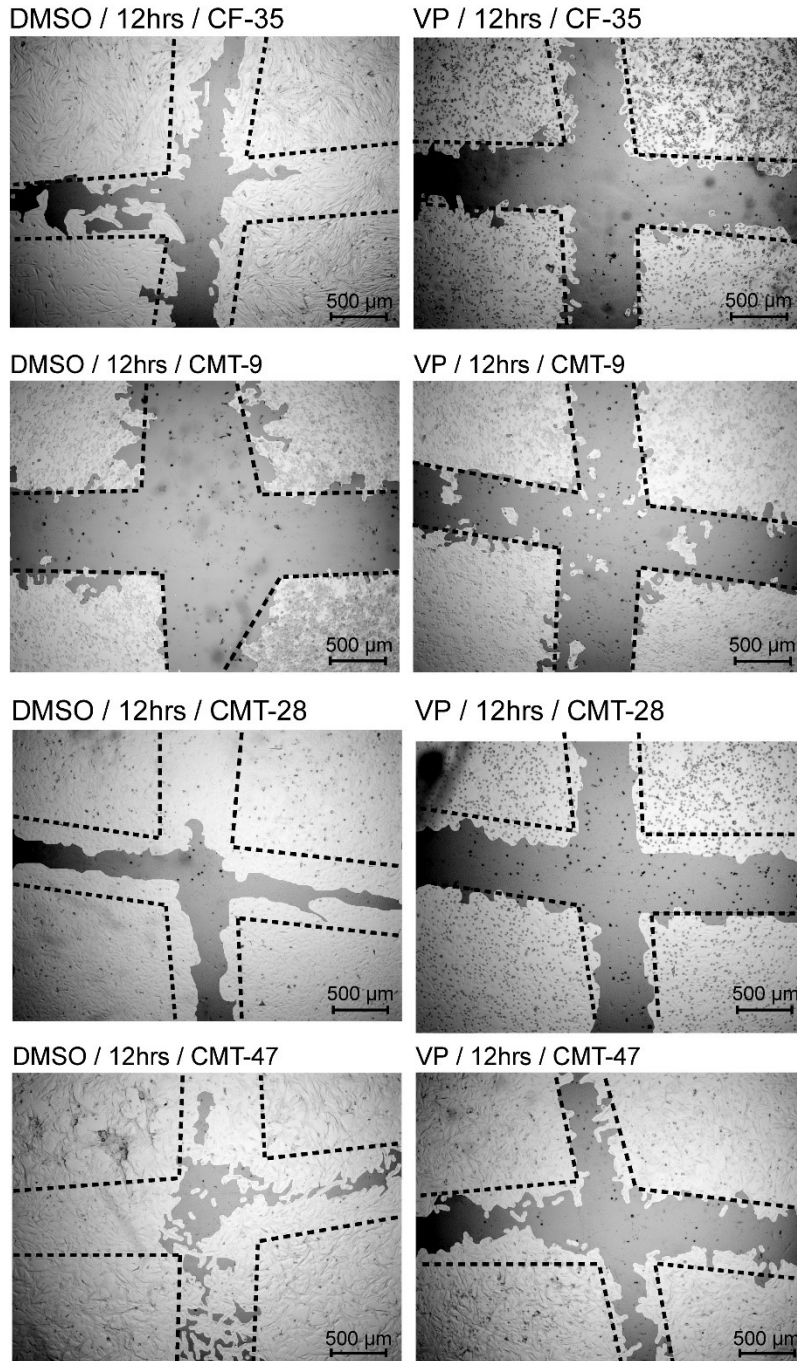


FIGURE 5

a



b

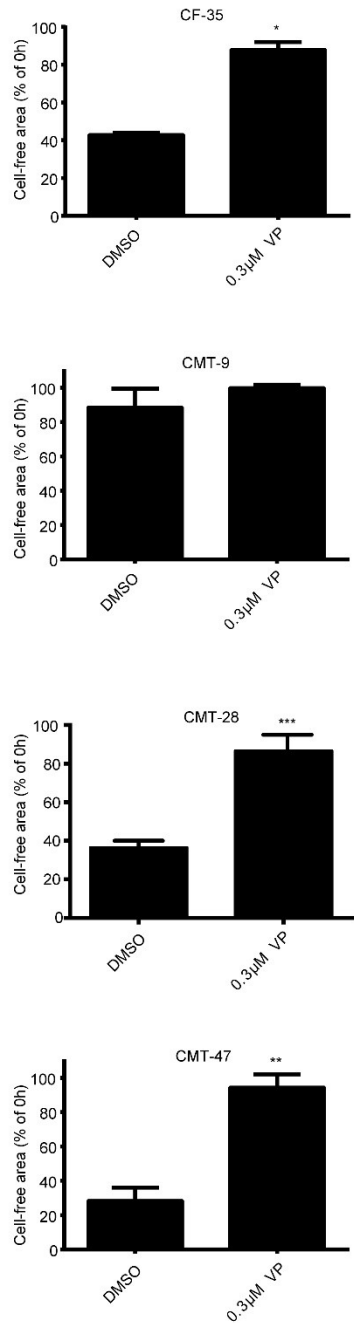


FIGURE 6

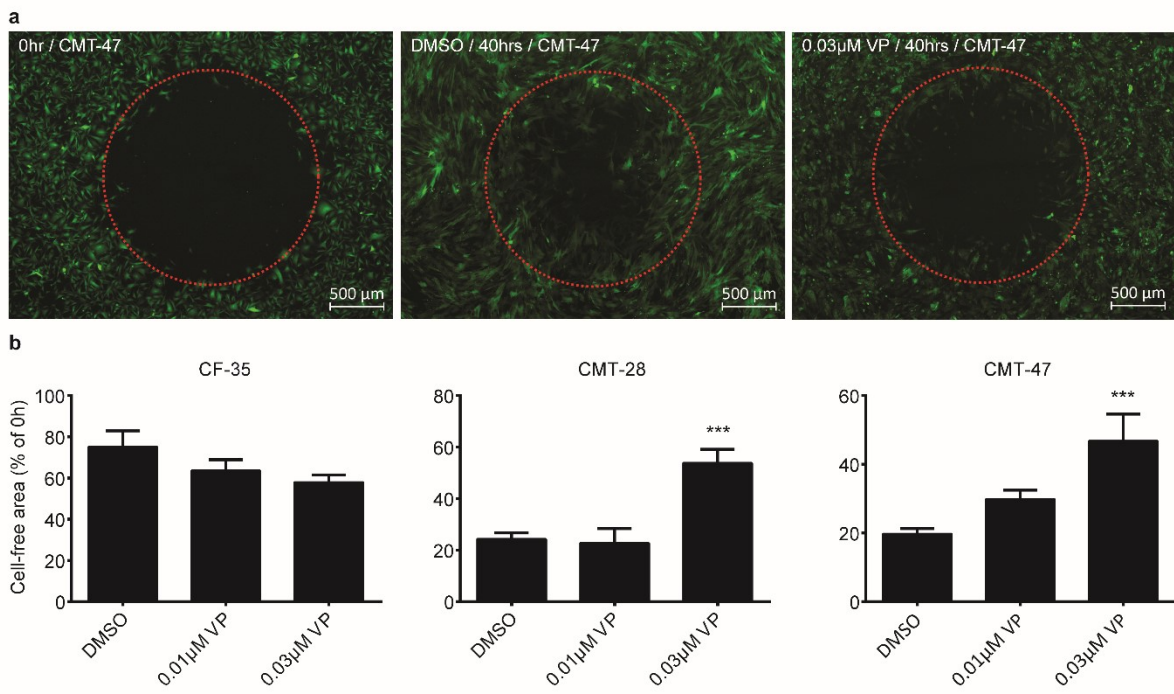
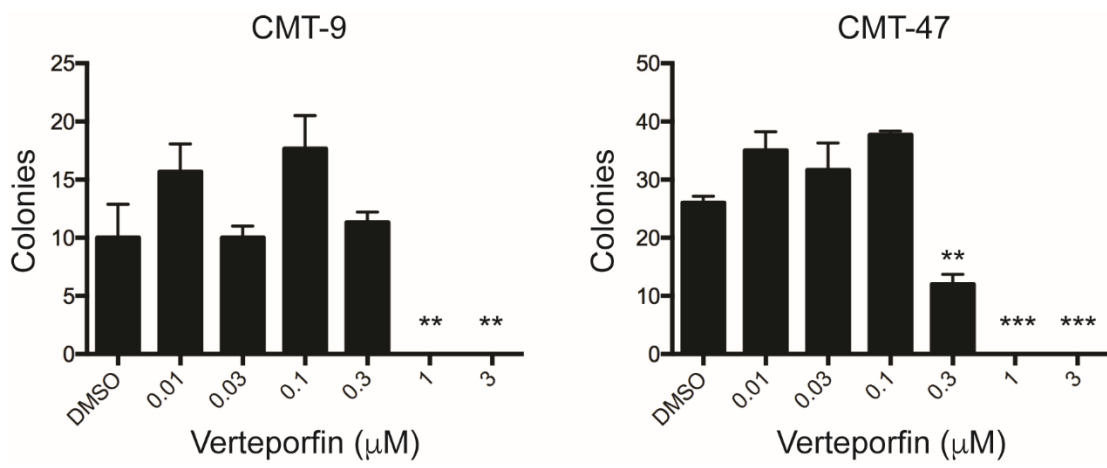


FIGURE 7



Discussion

Les tumeurs mammaires canines sont le type de néoplasie le plus fréquent chez la chienne intacte, et peu de traitements chimiothérapeutiques sont disponibles pour agir contre les formes inopérables telles que les carcinomes inflammatoires mammaires et les cas hautement métastatiques. De plus, comme chez la femme, une grande proportion des chiennes avec une tumeur maligne aura des métastases au moment du diagnostic. La maladie va donc progresser en dépit du traitement chirurgical²⁰⁴. Par conséquent, il est nécessaire d'approfondir des chimiothérapies de soutien qui ciblent des formes inopérables de ce cancer canin. Pour ce faire, il est nécessaire d'avoir une meilleure compréhension des voies de signalisation impliquées dans sa pathogenèse. L'implication de la voie Hippo dans la tumorigenèse des tumeurs mammaires signifie que cette voie peut être une cible clé pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques concernant ce type de cancer.

Des progrès importants dans l'implication des niveaux élevés des principaux effecteurs YAP et TAZ de la voie Hippo dans les tumeurs du sein haut gradées ont aidé à déterminer cette voie comme cible thérapeutique. Effectivement, la surexpression de YAP et TAZ confère des pouvoirs tumoraux tels que la prolifération non contrôlée, la migration, l'invasion, la transition épithélio-mésenchymateuse, la formation de métastases, la chimiorésistance et l'évasion de l'apoptose^{149, 163, 170}. YAP et TAZ agissent ainsi grâce à leur interaction avec les activateurs transcriptionnels de la famille des TEAD qui engendrent l'expression des gènes cibles oncogéniques tels que *CTGF* et *CYR61*. Ces connaissances peuvent donc être utilisées pour déterminer si YAP et TAZ favorisent ces caractéristiques tumorales chez le chien. Le fait d'être en mesure de déterminer comment et à quel niveau l'activité de YAP et TAZ affecte la chimiorésistance et la dissémination métastatique est à l'avant-garde de la quête pour mieux comprendre la pathogenèse tumorale canine.

Dans cette étude, nous avons comme hypothèse que le dérèglement de la voie Hippo contribue fréquemment au développement des tumeurs de la glande mammaire chez la chienne et que cette voie de signalisation représente une cible pharmacologique novatrice pour le traitement de la maladie. Tout comme les résultats chez la femme atteinte du cancer du sein^{149, 163, 170}, nous avons trouvé des niveaux élevés d'expression des effecteurs de signalisation Hippo YAP et TAZ dans la majorité des lignes de cellules cancéreuses mammaires canines que nous

avons étudiées. Nous avons ensuite pu démontrer la cytotoxicité de la vertéporfin, un inhibiteur pharmacologique de la co-activation transcriptionnelle médiée par YAP, envers ces cellules cancéreuses mammaires canines. Nos études ont montré que la vertéporfin inhibait la survie cellulaire ainsi que les comportements clés des cellules malignes, y compris la migration, l'invasion et la croissance indépendante de l'ancrage. Ce fut le cas en partie en diminuant les niveaux d'ARNm des gènes cibles de YAP/TAZ. Ces résultats fournissent une preuve importante du principe selon lequel la voie Hippo représente une cible thérapeutique valable pour le traitement des tumeurs mammaires canines.

Dans le cadre de la présente étude, notre premier objectif était de déterminer les niveaux basaux de YAP et TAZ dans six lignées cellulaires de cancers mammaires canins. Nous voulions déterminer les niveaux basaux dans le but de vérifier si nos lignées cancéreuses avaient des dérèglements au niveau de la voie Hippo, et, par le fait même, évaluer si ce dérèglement contribue au développement de tumeurs mammaires canines. Pour la première fois, notre étude a établi comme prévu que YAP et TAZ sont exprimés dans des lignées cancéreuses mammaires canines, ce qui correspond aussi aux résultats de l'équipe de Beffagna et al.¹⁸⁹. Quatre de ces lignées tumorales, dont les CMT-9, CMT-12, CMT-28 et CMT-47, ont des niveaux basaux détectables de YAP. De plus, il y avait des niveaux basaux détectables de TAZ dans toutes les lignées tumorales étudiées. Nos données démontrent que l'expression varie entre les lignées et que la confluence cellulaire a un effet sur l'expression de YAP/TAZ. Les cellules à plus haute confluence sont davantage rapprochées. Par conséquent, le besoin de prolifération est moins élevé puisqu'elles n'ont pas l'espace nécessaire pour croître. Alors, à haute confluence, les cellules activent normalement la voie Hippo pour désactiver YAP et TAZ afin de diminuer l'expression des gènes cibles importants dans la croissance cellulaire. Dans ce cas, les niveaux de YAP et TAZ phosphorylés (désactivés) augmentent dans le cytoplasme. Dans certaines cellules tumorales, la voie Hippo est dérégulée et ne peut donc pas désactiver YAP et TAZ. Ces derniers peuvent même augmenter, ce qui permet aux cellules de croître même lorsque la confluence est à 100%, ce qui expliquerait la raison pour laquelle les cellules tumorales mammaires canines avaient des niveaux variables de YAP et TAZ, en fonction de la confluence. Donc, les cellules ont vraisemblablement un dérèglement au niveau de l'effecteur YAP, ce qui appuie notre hypothèse qu'un dérèglement de la voie Hippo contribue fréquemment au développement des tumeurs de la glande mammaire chez la chienne. Par conséquent, l'emploi

de molécules modulatrices telles que la vertéporfin, pour désactiver YAP et TAZ dans les cellules ayant un dérèglement de la voie Hippo et diminuer la survie cellulaire, est une bonne approche pour trouver de nouvelles chimiothérapies.

Notre second objectif était de déterminer s'il y avait une corrélation entre les niveaux basaux de YAP et TAZ et la sensibilité de ces lignées cellulaires à la vertéporfin. Cet objectif nous aide à déterminer si la voie Hippo est une bonne cible pharmacologique pour les cellules tumorales mammaires canines ayant un dérèglement des effecteurs principaux de la voie. Notre étude démontre pour la première fois que les lignées cellulaires cancéreuses mammaires canines avec des niveaux détectables de YAP sont plus sensibles à l'effet de la vertéporfin. Par contre, il n'y a pas de corrélation avec les niveaux de TAZ. Une explication possible est la redondance fonctionnelle de YAP et TAZ. Par exemple, si la vertéporfin était efficace pour supprimer la co-activation transcriptionnelle médiée par TAZ à une concentration plus élevée que celle requise pour supprimer l'activité transcriptionnelle de YAP, cela expliquerait comment les lignées cellulaires YAP-négatives/TAZ-positives présentent des effets cytotoxiques à un ED50 plus élevé. Par ailleurs, l'effet de la vertéporfin sur la liaison entre TAZ et TEAD n'a pas encore été démontré, mais il semble probable étant donné les similitudes structurelles et fonctionnelles entre YAP et TAZ, y compris leur capacité à lier les facteurs de transcription de la famille TEAD. Ces résultats confirment notre hypothèse stipulant que la voie Hippo est une bonne cible pharmacologique dans ces cellules ayant un dérèglement de l'effecteur YAP.

Notre troisième objectif était d'élucider les mécanismes d'action cellulaires de la vertéporfin *in vitro*. Une fois que nous avons établi le fait que la vertéporfin avait un effet sur les cellules ayant un dérèglement au niveau de YAP, nous voulions déterminer comment et pourquoi ces cellules étaient affectées au niveau cellulaire et caractériser les aspects tumoraux de ces cellules. Nous avons établi pour la première fois que la vertéporfin avait des effets sur les fonctions cellulaires associées à la tumorigenèse chez le chien telles que l'apoptose, la migration, l'invasion et la croissance indépendante de l'ancrage. La vertéporfin induit l'apoptose dans ces lignées. Le mécanisme probable pouvant engendrer cela est la production de DRO par la vertéporfin, et ce, de façon indépendante de son activité photodynamique¹⁹⁹. D'autre part, la vertéporfin inhibe la migration, l'invasion et la croissance indépendante de l'ancrage, qui sont tous des mécanismes essentiels à l'initiation et au développement de métastases en diminuant l'expression des gènes cibles *CTGF* et *CYR61*. En conséquence, la

verteporfin pourrait être utilisée dans les cas métastatiques afin de diminuer la migration, l'invasion et la survie de métastases. Ces résultats nous démontrent que la verteporfin agit au niveau cellulaire et affecte les mécanismes de la tumorigenèse mammaire canine. Nos résultats confirment donc que la voie Hippo a le potentiel d'être une voie de signalisation d'importance dans le cas du cancer mammaire canin et une cible pharmacologique intéressante.

Notre quatrième objectif était d'élucider les mécanismes d'action moléculaires de la verteporfin *in vitro*. Nous voulions déterminer comment et pourquoi ces cellules étaient affectées au niveau moléculaire et caractériser les aspects tumoraux de ces cellules dérégulées, donc vérifier si les mêmes gènes cibles de la voie Hippo dans le cancer du sein étaient affectés dans les cellules cancéreuses mammaires canines. Pour la première fois, nous avons établi quelques gènes cibles de la voie Hippo tels que *CTGF* et *CYR61*, dans les lignées de cellules cancéreuses mammaires canines. Nous avons démontré que la verteporfin affectait l'expression de ces gènes cibles. Ces deux gènes appartiennent à la famille des gènes CCN, et codent pour les protéines de la matrice extracellulaire riches en cystéine qui fonctionnent comme ligands de l'intégrine²⁰⁵. Une expression élevée de *CYR61* chez des patients atteints du cancer du sein a été associée à une dissémination métastatique et un mauvais pronostic^{188, 205-206}. Les modèles de culture cellulaire et de xélogreffe ont montré que *CYR61* augmente la sécrétion de VEGF et favorise la vascularisation tumorale ainsi que la croissance, le potentiel invasif et le potentiel métastatique des cellules tumorales qui sont indépendantes des œstrogènes^{188, 205, 207-209}. Comme *CYR61*, l'expression élevée de *CTGF* dans les cancers du sein primaires a été associée à des caractéristiques de la maladie avancée, et est corrélée avec le stade, la taille de la tumeur et l'atteinte des ganglions lymphatiques^{205, 210}. La surexpression de *CTGF* dans les cellules cancéreuses du sein favorise la migration, l'angiogenèse et la chimiorésistance^{205, 211-212}. À l'inverse, la chute concomitante de *CYR61* et de *CTGF* dans des cellules cancéreuses du sein a inversé la résistance au Paclitaxel causée par TAZ^{177, 213}. L'ensemble de ces études a permis d'identifier *CYR61* et *CTGF* comme étant les principaux promoteurs de la voie Hippo pour le développement et la progression du cancer du sein. Le fait que ces gènes jouent des rôles semblables dans les tumeurs mammaires canines sera un motif d'étude à approfondir.

Cette étude établit pour la première fois que la voie Hippo est une cible pharmacologique novatrice qui pourrait être utilisée pour le traitement des cancers chez le chien, notamment pour le traitement des tumeurs mammaires. Nous avons également établi que la verteporfin agissait

in vitro sur les gènes cibles de la voie Hippo et que sa fonction était probablement d'intervenir entre YAP et TEAD 1-4, tel que décrit. Par contre, certaines difficultés sont présentes quant au ciblage thérapeutique de la voie Hippo, car son inhibition de la prolifération cellulaire survient lorsqu'elle est activée et, normalement, les agents chimiothérapeutiques viennent inhiber les cibles thérapeutiques. Donc, les meilleurs endroits à cibler sont la liaison directe entre YAP/TAZ-TEAD ou les signaux en amont de la voie. De plus, cette étude comprend quelques limites qui pourraient être améliorées lors de recherches éventuelles.

Les limites de cette étude comprennent l'absence de cellules canines normales de la glande mammaire et l'absence de lignées de contrôle pour les tests cellulaires et moléculaires. L'existence d'une lignée cellulaire normale comme témoin aurait pu aider à déterminer à quel point les niveaux basaux de YAP et TAZ des cellules cancéreuses sont différents de ceux des cellules normales. Cela est important afin de déterminer ce qui peut être considéré comme étant une expression élevée ou faible dans les cellules cancéreuses. En outre, une lignée de cellules mammaires normales en tant que contrôle est de mise pour déterminer si l'effet cytotoxique de la verteporfin est seulement relié au dérèglement de la voie Hippo, ou si d'autres voies sont affectées. De plus, une lignée normale comme contrôle serait aussi importante pour les tests cellulaires et moléculaires, comme celui de migration et invasion, pour déterminer si ces caractéristiques tumorales sont dues au dérèglement de la voie Hippo. Des lignées de contrôle positives tumorales, avec des niveaux basaux de YAP et TAZ normaux, devraient être utilisées lors des tests cellulaires et moléculaires, pour affirmer ou infirmer le rôle du dérèglement de YAP et TAZ dans ces facteurs cellulaires et moléculaires tumoraux.

Une autre limite de l'étude est l'absence de la localisation cellulaire de YAP et TAZ. Notre étude portait sur l'expression protéique de YAP et TAZ total seulement, en raison du manque de spécificité des anticorps, mais il serait également intéressant de déterminer ce qui se passe quant à l'activité des formes phosphorylées de YAP et TAZ. Étant donné que les formes phosphorylées sont cruciales pour l'inactivation ainsi que la localisation de YAP et TAZ, connaître leur état de phosphorylation pourrait permettre de définir le mécanisme d'action de la verteporfin. Pour ce faire, le fractionnement cellulaire pourrait être utilisé afin de déterminer où ces formes phosphorylées sont localisées, ce qui aiderait non seulement à définir le mécanisme d'action de la verteporfin, mais aussi à déterminer d'autres traitements potentiellement utilisés contre YAP et TAZ. De plus, une étude mentionnée précédemment sur le mécanisme d'action

de la verteporfin relié à la séquestration cytoplasmique, engendrée via la régulation ascendante de 14-3-3 σ , pourrait être examinée dans les cellules cancéreuses mammaires canines à l'aide du fractionnement cellulaire et des anticorps ciblant 14-3-3 σ ainsi que p53, le facteur responsable des effets antitumoraux de la verteporfin²¹⁴.

En outre, dans notre étude, nous nous sommes limités aux effecteurs principaux YAP et TAZ de la voie Hippo en raison du manque de temps et de la spécificité des anticorps canins. Cependant, des recherches supplémentaires devraient être menées sur les autres composantes canoniques de la voie Hippo. La détermination des niveaux de base de LATS1/2, MST, SAV1, MOB1 et TEAD1-4 pourrait être effectuée en utilisant l'immunobuvardage pour déterminer la source de dérégulation de YAP et TAZ dans les cellules cancéreuses mammaires canines. En outre, l'examen de ces autres composants de la voie Hippo ainsi que leur forme phosphorylée pourraient aider à confirmer les mécanismes d'action d'autres petites molécules modulatrices dans l'espèce canine, comme les statines.

De plus, d'autres voies de signalisation en amont peuvent avoir un effet sur le dérèglement de la voie Hippo ou pourraient être utilisées pour contrer le dérèglement, étant donné que cette voie doit être activée pour désactiver ces effecteurs principaux YAP et TAZ, comme mentionné précédemment. Une étude analysant le rôle de l'œstrogène relativement à la régulation de la voie Hippo dans le cancer du sein a montré que la stimulation du récepteur de l'œstrogène couplé à une protéine G (GPER) active YAP et TAZ via les signaux G α q-11, PLC β / PKC et Rho / ROCK. Cela signifie que la dérégulation de la voie Hippo ainsi que l'initiation de la tumorigenèse mammaire chez les chiennes intactes pourraient être causées par les changements hormonaux engendrés par le cycle œstrus²¹⁵. Une autre étude portant sur les interactions entre le récepteur d'œstrogène alpha (ER α) et la voie Hippo dans le cancer du sein a démontré que les kinases LATS1/2 favorisent le phénotype luminal et augmentent le nombre de progéniteurs bipotents et luminaux. Cette promotion est à la base de l'hypothèse des cellules d'origine dans le cancer du sein. De plus, la présence de LATS1/2 induit l'ubiquitination et la dégradation protéasomale de ER α via le facteur 1 associé à Ddb1-cullin4 (DCAF1), et l'absence de LATS1/2 stabilise ER α et les co-activateurs transcriptionnels YAP et TAZ.²¹⁶ Cela signifie que les changements hormonaux contrôlent la voie Hippo dans le cancer du sein, ce qui pourrait contribuer à découvrir d'autres cibles thérapeutiques pour les tumeurs mammaires canines dépendantes de la voie Hippo.

Par ailleurs, une étude récente portant sur le dépistage de molécules inhibitrices de la localisation nucléaire de YAP et TAZ a identifié plusieurs molécules ayant un potentiel thérapeutique contre le cancer du sein²¹⁷. Les molécules identifiées sont thiazovivin, cucurbitan I, dasatinib fluvastatin et pazopanib. Parmi celles-ci, trois molécules approuvées par la FDA, dont la pazopanib, la dasatinib et la fluvastatin, ont été utilisées pour de plus amples études²¹⁷. Les cellules mammaires cancéreuses dépendantes aux YAP et TAZ sont non seulement plus sensibles aux effets de la dasatinib, la pazopanib et la fluvastatin, mais sont aussi plus sensibles lorsque ces traitements sont combinés. De plus, ces molécules sensibilisent les cellules mammaires cancéreuses dépendantes aux YAP et TAZ aux agents chimiothérapeutiques tels que la doxorubicine et le Paclitaxel²¹⁷. Par ailleurs, l'une de ces molécules fait partie des statines qui agissent via la voie mévalonate, qui est en amont de la voie Hippo, pour inhiber la localisation nucléaire de YAP et TAZ et les réponses transcriptionnelles dans plusieurs types de cellules cancéreuses, y compris le cancer du sein²¹⁸⁻²¹⁹. Les statines sont largement utilisées en médecine humaine pour leurs effets hypolipémiants, et ont de larges indices thérapeutiques. Il est intéressant de noter que l'utilisation à long terme de statines a permis de réduire le risque de cancer du sein, bien que la base de cette protection n'a pas été déterminée²²⁰. La combinaison de ces avancées suggère que les chimiothérapies ciblant la voie Hippo deviendront éventuellement disponibles dans le cadre d'une utilisation clinique. Elles pourraient fournir une progression importante du traitement des cancers découlant d'un dérèglement de la voie Hippo, y compris les tumeurs mammaires canines.

Conclusion

En conclusion, la liaison entre YAP/TAZ et TEAD de la voie Hippo est une bonne cible novatrice thérapeutique dans le combat contre le cancer mammaire canin. De plus, la verteporfin est un médicament qui peut moduler cette liaison, et donc servir d'agents chimiothérapeutiques pour traiter le cancer mammaire. Cette étude montre pour la première fois que les cellules de tumeurs mammaires canines qui ont des niveaux basaux détectables de YAP sont très sensibles au traitement de verteporfin, contrairement aux cellules n'ayant pas de niveaux détectables de YAP. En effet, la verteporfin a tué ces cellules par induction d'apoptose avec des valeurs ED50 de 14 à 79 nM. De plus, la verteporfin a diminué l'expression des gènes cibles de YAP/TAZ, en particulier *CYR61* et *CTGF*, qui jouent un rôle important dans le développement du cancer du sein. La verteporfin a également inhibé la migration cellulaire, la croissance indépendante de l'ancrage, et le caractère invasif des cellules. Ensemble, nos résultats fournissent une preuve de principe selon lequel le ciblage pharmacologique de la voie Hippo compromet la viabilité et atténue le comportement malin des cellules mammaires cancéreuses. Ces résultats représentent des avancées importantes dans le domaine de la chimiothérapie ciblée qui ouvre la porte pour éventuellement appliquer le ciblage de la voie Hippo au développement de protocoles de traitements normalisés pour les tumeurs mammaires récurrentes ou avancées chez les chiennes et les femmes.

Bibliographie

1. Hens, J. R.; Wysolmerski, J. J., Key stages of mammary gland development: Molecular mechanisms involved in the formation of the embryonic mammary gland. *Breast Cancer Research* **2005**, 7 (5), 220-224.
2. Sorenmo, K. U.; Rasotto, R.; Zappulli, V.; Goldschmidt, M. H., Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Veterinary pathology* **2011**, 48 (1), 85-97.
3. Rehm, S.; Stanislaus, D. J.; Williams, A. M., Estrous cycle-dependent histology and review of sex steroid receptor expression in dog reproductive tissues and mammary gland and associated hormone levels. *Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology* **2007**, 80 (3), 233-245.
4. Santos, M.; Marcos, R.; Faustino, A. M., Histological study of canine mammary gland during the oestrous cycle. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* **2010**, 45 (5), e146-154.
5. Concannon, P. W., Canine pregnancy and parturition. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* **1986**, 16 (3), 453-475.
6. Silver, I. A., The anatomy of the mammary gland of the dog and cat. *The Journal of small animal practice* **1966**, 7 (11), 689-696.
7. Taylor, R., Dukes' Physiology of Domestic Animals. 12th edition, Reece WO. Cornell University Press, Ithaca, 2004, 999 pages. ISBN 8014 4238 9. *Australian Veterinary Journal* **2004**, 83 (7), 444-444.
8. Reece, W. O.; Rowe, E. W., *Functional anatomy and physiology of domestic animals*. John Wiley & Sons: 2017.
9. Blendinger, K. In *Physiology and pathology of the estrous cycle of the bitch*, 56th Congresso Internazionale Multisala SCIVAC, Rimini. Proceedings of the 56th SCIVAC Congress, 2007; pp 73-77.
10. Butinar, J.; Mujagić, E.; Galac, S., The oestrus cycle in the bitch: a review article. *41 I Slov Vet Res• Ljubljana• 2004• Volume 41• Number* **2004**, 5.

11. Concannon, P.; Cowan, R.; Hansel, W., LH releases in ovariectomized dogs in response to estrogen withdrawal and its facilitation by progesterone. *Biology of reproduction* **1979**, *20* (3), 523-531.
12. Concannon, P.; Hansel, W.; McEntee, K., Changes in LH, progesterone and sexual behavior associated with preovulatory luteinization in the bitch. *Biology of reproduction* **1977**, *17* (4), 604-613.
13. Concannon, P. W., Biology of gonadotrophin secretion in adult and prepubertal female dogs. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* **1993**, *47*, 3-27.
14. Concannon, P. W.; Hansel, W.; Visek, W. J., The ovarian cycle of the bitch: plasma estrogen, LH and progesterone. *Biology of reproduction* **1975**, *13* (1), 112-121.
15. de Gier, J.; Kooistra, H. S.; Djajadiningrat-Laanen, S. C.; Dieleman, S. J.; Okkens, A. C., Temporal relations between plasma concentrations of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, estradiol-17beta, progesterone, prolactin, and alpha-melanocyte-stimulating hormone during the follicular, ovulatory, and early luteal phase in the bitch. *Theriogenology* **2006**, *65* (7), 1346-1359.
16. Nett, T. M.; Akbar, A. M.; Phemister, R. D.; Holst, P. A.; Reichert, L. E., Jr.; niswender, G. D., Levels of lutenizing hormone, estradiol and progesterone in serum during the estrous cycle and pregnancy in the beagle bitch (38491). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* **1975**, *148* (1), 134-139.
17. Onclin, K.; Murphy, B.; Verstegen, J. P., Comparisons of estradiol, LH and FSH patterns in pregnant and nonpregnant beagle bitches. *Theriogenology* **2002**, *57* (8), 1957-1972.
18. Wildt, D. E.; Panko, W. B.; Chakraborty, P. K.; Seager, S. W., Relationship of serum estrone, estradiol-17beta and progesterone to LH, sexual behavior and time of ovulation in the bitch. *Biology of reproduction* **1979**, *20* (3), 648-658.
19. Concannon, P. W., Reproductive cycles of the domestic bitch. *Animal Reproduction Science* **2011**, *124* (3), 200-210.
20. Mellin, T. N.; Orczyk, G. P.; Hichens, M.; Behrman, H. R., Serum profiles of luteinizing hormone, progesterone and total estrogens during the canine estrous cycle. *Theriogenology* **1976**, *5* (4), 175-187.

21. Smith, M. S.; McDonald, L. E., Serum levels of luteinizing hormone and progesterone during the estrous cycle, pseudopregnancy and pregnancy in the dog. *Endocrinology* **1974**, *94* (2), 404-412.
22. Kooistra, H. S.; Okkens, A. C., Role of changes in the pulsatile secretion pattern of FSH in initiation of ovarian folliculogenesis in bitches. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* **2001**, *57*, 11-14.
23. Kooistra, H. S.; Okkens, A. C., Secretion of growth hormone and prolactin during progression of the luteal phase in healthy dogs: a review. *Molecular and cellular endocrinology* **2002**, *197* (1-2), 167-172.
24. Pineda, M., Reproductive patterns of dogs. *Veterinary endocrinology and reproduction. Lea & Febiger, Philadelphia, PA* **1989**, 460-475.
25. Jeffcoate, I. A., Endocrinology of anoestrous bitches. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* **1993**, *47*, 69-76.
26. Tani, H.; Inaba, T.; Nonami, M.; Matsuyama, S.; Takamori, Y.; Torii, R.; Tamada, H.; Kawate, N.; Sawada, T., Increased LH pulse frequency and estrogen secretion associated with termination of anestrus followed by enhancement of uterine estrogen receptor gene expression in the beagle bitch. *Theriogenology* **1999**, *52* (4), 593-607.
27. Versteegen, J.; Onclin, K.; Silva, L.; Concannon, P., Termination of obligate anoestrus and induction of fertile ovarian cycles in dogs by administration of purified pig LH. *Journal of reproduction and fertility* **1997**, *111* (1), 35-40.
28. Kooistra, H. S.; Okkens, A. C., Secretion of Prolactin and Growth Hormone in Relation to Ovarian Activity in the Dog. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* **2001**, *36* (3-4), 115-119.
29. Timmermans-Sprang, E. P. M.; Gracanin, A.; Mol, J. A., Molecular Signaling of Progesterone, Growth Hormone, Wnt, and HER in Mammary Glands of Dogs, Rodents, and Humans: New Treatment Target Identification. *Frontiers in Veterinary Science* **2017**, *4*.
30. Concannon, P. W.; Butler, W. R.; Hansel, W.; Knight, P. J.; Hamilton, J. M., Parturition and lactation in the bitch: serum progesterone, cortisol and prolactin. *Biology of reproduction* **1978**, *19* (5), 1113-8.
31. Pickford, M., Factors affecting milk release in the dog and the quantity of oxytocin liberated by suckling. *The Journal of Physiology* **1960**, *152* (3), 515-526.

32. Barone, R., Mamelles. *Anatomie Comparée des Mammifères Domestiques: Appareil Uro-genital. 3rd ed. Am. Publ. Health Assoc., Inc., Washington, DC 1990*, 449-501.
33. Barone, R., Tome 5, Angiologie. *Anatomie comparée des mammifères domestiques.*(R. Barone, ed.). Paris: Editions Vigot **1996**, 449-451.
34. Miller, M.; Christensen, G.; Evans, H., The mammary gland. *Anatomy of the Dog. WB Saunders, Philadelphia 1964*, 789-803.
35. Patsikas, M.; Karayannopoulou, M.; Kaldrymidoy, E.; Papazoglou, L.; Papadopoulou, P.; Tzegas, S.; Tziris, N.; Kaitzis, D.; Dimitriadis, A.; Dessiris, A., The lymph drainage of the neoplastic mammary glands in the bitch: A lymphographic study. *Anatomia, histologia, embryologia* **2006**, 35 (4), 228-234.
36. Patsikas, M. N.; Dessiris, A., The lymph drainage of the mammary glands in the bitch: a lymphographic study. Part I: The 1st, 2nd, 4th and 5th mammary glands. *Anatomia, Histologia, Embryologia* **1996**, 25 (2), 131-138.
37. Patsikas, M. N.; Dessiris, A., The lymph drainage of the mammary glands in the Bitch: a lymphographic study. Part II: The 3rd mammary gland. *Anatomia, Histologia, Embryologia* **1996**, 25 (2), 139-143.
38. Liu-Chittenden, Y.; Huang, B.; Shim, J. S.; Chen, Q.; Lee, S. J.; Anders, R. A.; Liu, J. O.; Pan, D., Genetic and pharmacological disruption of the TEAD-YAP complex suppresses the oncogenic activity of YAP. *Genes & Development* **2012**, 26 (12), 1300-1305.
39. Paquet, M., Biologie des tumeurs DMV 2122. *Université de Montréal 2016, Recueil inédit.*
40. Goldschmidt, M.; Pena, L.; Rasotto, R.; Zappulli, V., Classification and grading of canine mammary tumors. *Veterinary pathology* **2011**, 48 (1), 117-131.
41. Benjamin, S. A.; Lee, A. C.; Saunders, W. J., Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles. *Veterinary pathology* **1999**, 36 (5), 423-436.
42. Sorenmo, K. U.; Worley, D. R.; Goldschmidt, M. H., 27 - Tumors of the Mammary Gland A2 - Withrow, Stephen J. In *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology (Fifth Edition)*, Vail, D. M.; Page, R. L., Eds. W.B. Saunders: Saint Louis, 2013; pp 538-556.
43. Dorn, C. R.; Taylor, D. O.; Schneider, R.; Hibbard, H. H.; Klauber, M. R., Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer morbidity in

dogs and cats from Alameda County. *Journal of the National Cancer Institute* **1968**, *40* (2), 307-318.

44. Egenvall, A.; Bonnett, B. N.; Ohagen, P.; Olson, P.; Hedhammar, A.; von Euler, H., Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Preventive veterinary medicine* **2005**, *69* (1-2), 109-127.

45. Dobson, J. M.; Samuel, S.; Milstein, H.; Rogers, K.; Wood, J. L., Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *The Journal of small animal practice* **2002**, *43* (6), 240-246.

46. Merlo, D. F.; Rossi, L.; Pellegrino, C.; Ceppi, M.; Cardellino, U.; Capurro, C.; Ratto, A.; Sambucco, P. L.; Sestito, V.; Tanara, G.; Bocchini, V., Cancer incidence in pet dogs: findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. *Journal of veterinary internal medicine* **2008**, *22* (4), 976-984.

47. Moe, L., Population-based incidence of mammary tumours in some dog breeds. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* **2001**, *57*, 439-443.

48. Sleenckx, N.; de Rooster, H.; Veldhuis Kroeze, E. J. B.; Van Ginneken, C.; Van Brantegem, L., Canine Mammary Tumours, an Overview. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* **2011**, *46* (6), 1112-1131.

49. Rutteman, G. R., Hormones and mammary tumour disease in the female dog: an update. *In vivo (Athens, Greece)* **1990**, *4* (1), 33-40.

50. Chang, C. C.; Tsai, M. H.; Liao, J. W.; Chan, J. P.; Wong, M. L.; Chang, S. C., Evaluation of hormone receptor expression for use in predicting survival of female dogs with malignant mammary gland tumors. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **2009**, *235* (4), 391-396.

51. Queiroga, F. L.; Perez-Alenza, M. D.; Silvan, G.; Pena, L.; Lopes, C.; Illera, J. C., Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **2005**, *94* (1-3), 181-187.

52. Sorenmo, K. U.; Shofer, F. S.; Goldschmidt, M. H., Effect of Spaying and Timing of Spaying on Survival of Dogs with Mammary Carcinoma. *Journal of veterinary internal medicine* **2000**, *14* (3), 266-270.

53. StØOvring, M.; Moe, L.; Glattre, E., A population-based case-control study of canine mammary tumours and clinical use of medroxyprogesterone acetate. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* **1997**, *105* (7-12), 590-596.
54. Thomas, D. B., Do hormones cause breast cancer? *Cancer* **1984**, *53* (3 Suppl), 595-604.
55. Schaefers-Okkens, A.; Ettinger, S.; Feldman, E., Estrous cycle and breeding management of the healthy bitch. *Textbook of Veterinary Internal Medicine, 6th ed., Elsevier Saunders, St. Louis, MO* **2005**, 1640, 1649.
56. Mol, J. A.; van Garderen, E.; Rutteman, G. R.; Rijnberk, A., New insights in the molecular mechanism of progestin-induced proliferation of mammary epithelium: induction of the local biosynthesis of growth hormone (GH) in the mammary glands of dogs, cats and humans. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **1996**, *57* (1-2), 67-71.
57. van Garderen, E.; van der Poel, H. J.; Swennenhuis, J. F.; Wissink, E. H.; Rutteman, G. R.; Hellmen, E.; Mol, J. A.; Schalken, J. A., Expression and molecular characterization of the growth hormone receptor in canine mammary tissue and mammary tumors. *Endocrinology* **1999**, *140* (12), 5907-5914.
58. Schneider, R.; Dorn, C. R.; Taylor, D. O., Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *Journal of the National Cancer Institute* **1969**, *43* (6), 1249-1261.
59. Perez Alenza, D.; Rutteman, G. R.; Pena, L.; Beynen, A. C.; Cuesta, P., Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. *Journal of veterinary internal medicine* **1998**, *12* (3), 132-139.
60. Rivera, P.; von Euler, H., Molecular biological aspects on canine and human mammary tumors. *Veterinary pathology* **2011**, *48* (1), 132-146.
61. Schneider, R., Comparison of age, sex, and incidence rates in human and canine breast cancer. *Cancer* **1970**, *26* (2), 419-426.
62. Dorn, C. R.; Schneider, R., Inbreeding and canine mammary cancer: a retrospective study. *Journal of the National Cancer Institute* **1976**, *57* (3), 545-548.
63. Hellmen, E.; Bergstrom, R.; Holmberg, L.; Spangberg, I. B.; Hansson, K.; Lindgren, A., Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. *Veterinary pathology* **1993**, *30* (1), 20-27.

64. Shofer, F. S.; Sonnenschein, E. G.; Goldschmidt, M. H.; Laster, L. L.; Glickman, L. T., Histopathologic and dietary prognostic factors for canine mammary carcinoma. *Breast cancer research and treatment* **1989**, *13* (1), 49-60.
65. Sonnenschein, E. G.; Glickman, L. T.; Goldschmidt, M. H.; McKee, L. J., Body conformation, diet, and risk of breast cancer in pet dogs: a case-control study. *American journal of epidemiology* **1991**, *133* (7), 694-703.
66. Cleary, M. P.; Grossmann, M. E., Minireview: Obesity and breast cancer: the estrogen connection. *Endocrinology* **2009**, *150* (6), 2537-2542.
67. Cleary, M. P.; Grossmann, M. E.; Ray, A., Effect of Obesity on Breast Cancer Development. *Veterinary pathology* **2010**, *47* (2), 202-213.
68. Huang, C. K.; Chang, P. H.; Kuo, W. H.; Chen, C. L.; Jeng, Y. M.; Chang, K. J.; Shew, J. Y.; Hu, C. M.; Lee, W. H., Adipocytes promote malignant growth of breast tumours with monocarboxylate transporter 2 expression via β -hydroxybutyrate. *Nature Communications* **2017**, *8*.
69. Matos, A. J.; Santos, A. A., Advances in the understanding of the clinically relevant genetic pathways and molecular aspects of canine mammary tumours: part 1. Proliferation, apoptosis and DNA repair. *The Veterinary Journal* **2015**, *205* (2), 136-143.
70. Pawłowski, K. M.; Popielarz, D.; Szyszko, K.; Gajewska, M.; Motyl, T.; Król, M., Growth hormone receptor (ghr) RNAi decreases proliferation and enhances apoptosis in CMT-U27 canine mammary carcinoma cell line. *Veterinary and Comparative Oncology* **2012**, *10* (1), 2-15.
71. Król, M.; Pawłowski, K.; Skierski, J.; Turowski, P.; Majewska, A.; Polańska, J.; Ugorski, M.; Morty, R.; Motyl, T., Transcriptomic “portraits” of canine mammary cancer cell lines with various phenotypes. *Journal of applied genetics* **2010**, *51* (2), 169-183.
72. Angelopoulou, K.; Zavlaris, M.; Papaioannou, N.; Vlemmas, I., Canis familiaris telomerase reverse transcriptase undergoes alternative splicing. *Mammalian genome* **2008**, *19* (9), 647-653.
73. Funakoshi, Y.; Nakayama, H.; Uetsuka, K.; Nishimura, R.; Sasaki, N.; Doi, K., Cellular proliferative and telomerase activity in canine mammary gland tumors. *Veterinary pathology* **2000**, *37* (2), 177-183.

74. Bundgaard-Andersen, K.; Flagstad, A.; Jensen, A. L.; Hellmén, E.; Trerè, D., Correlation between the histopathological diagnosis by AgNOR count and AgNOR area in canine mammary tumors. *Journal of veterinary internal medicine* **2008**, *22* (5), 1174-1180.
75. Sarli, G.; Preziosi, R.; Benazzi, C.; Castellani, G.; Marcato, P. S., Prognostic value of histologic stage and proliferative activity in canine malignant mammary tumors. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **2002**, *14* (1), 25-34.
76. Löhr, C.; Teifke, J.; Failing, K.; Weiss, E., Characterization of the proliferation state in canine mammary tumors by the standardized AgNOR method with postfixation and immunohistologic detection of Ki-67 and PCNA. *Veterinary pathology* **1997**, *34* (3), 212-221.
77. Rodo, A.; Malicka, E., Immunohistochemical expression of protein p53 in neoplasms of the mammary gland in bitches. *Polish journal of veterinary sciences* **2008**, *11* (2), 89-95.
78. Lee, C.-H.; Kim, W.-H.; Lim, J.-H.; Kang, M.-S.; Kim, D.-Y.; Kweon, O.-K., Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. *Journal of Veterinary Science* **2004**, *5* (1), 63-70.
79. Borge, K.; Børresen-Dale, A.; Lingaas, F., Identification of genetic variation in 11 candidate genes of canine mammary tumour. *Veterinary and comparative oncology* **2011**, *9* (4), 241-250.
80. Kumaraguruparan, R.; Karunakaran, D.; Balachandran, C.; Manohar, B. M.; Nagini, S., Of humans and canines: a comparative evaluation of heat shock and apoptosis-associated proteins in mammary tumors. *Clinica chimica acta* **2006**, *365* (1), 168-176.
81. Bongiovanni, L.; Romanucci, M.; Malatesta, D.; D'Andrea, A.; Ciccarelli, A.; Della Salda, L., Survivin and related proteins in canine mammary tumors: immunohistochemical expression. *Veterinary pathology* **2015**, *52* (2), 269-275.
82. Yoshikawa, Y.; Ochiai, K.; Morimatsu, M.; Suzuki, Y.; Wada, S.; Taoda, T.; Iwai, S.; Chikazawa, S.; Orino, K.; Watanabe, K., Effects of the missense mutations in canine BRCA2 on BRC repeat 3 functions and comparative analyses between canine and human BRC repeat 3. *PloS one* **2012**, *7* (10), e45833.
83. Morris, J. S.; Nixon, C.; King, O. J.; Morgan, I. M.; Philbey, A. W., Expression of TopBP1 in canine mammary neoplasia in relation to histological type, Ki67, ER α and p53. *The Veterinary Journal* **2009**, *179* (3), 422-429.

84. De Nardi, A.; Daleck, C.; LAUFERAMORIM, R.; Rodaski, S.; Piekarz, C.; Magalhaes, G.; Calazans, S.; Fernandes, S.; Cesar, J.; Castro, J., Correlação da ciloxygenase-2 com o prognóstico dos carcinomas mamários de cadelas. *Acta Scientiae Veterinariae* **2007**, *35*, 619-627.
85. Sorenmo, K., Canine mammary gland tumors. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* **2003**, *33* (3), 573-596.
86. dos Santos Horta, R.; Lavallo, G. E.; de Castro Cunha, R. M.; de Moura, L. L.; de Araújo, R. B.; Cassali, G. D., Influence of surgical technique on overall survival, disease free interval and new lesion development interval in dogs with mammary tumors. *Advances in Breast Cancer Research* **2014**, *2014*.
87. Brodey, R.; Goldschmidt, M.; Roszel, J., Canine mammary-gland neoplasms. *Journal of the American Animal Hospital Association* **1983**, *19* (1), 61-90.
88. Cassali, G. D.; Lavallo, G. E.; Ferreira, E.; Estrela-Lima, A.; De Nardi, A. B.; Ghever, C.; Sobral, R. A.; Amorim, R. L.; Oliveira, L. O.; Sueiro, F. A., Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors-2013. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology* **2014**, *7* (2), 38-69.
89. Karayannopoulou, M.; Kaldrymidou, E.; Constantinidis, T. C.; Dessiris, A., Adjuvant post-operative chemotherapy in bitches with mammary cancer. *Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine* **2001**, *48* (2), 85-96.
90. Poirier, V. J.; Hershey, A. E.; Burgess, K. E.; Phillips, B.; Turek, M. M.; Forrest, L. J.; Beaver, L.; Vail, D. M., Efficacy and toxicity of paclitaxel (Taxol) for the treatment of canine malignant tumors. *Journal of veterinary internal medicine* **2004**, *18* (2), 219-222.
91. Simon, D.; Schoenrock, D.; Baumgartner, W.; Nolte, I., Postoperative adjuvant treatment of invasive malignant mammary gland tumors in dogs with doxorubicin and docetaxel. *Journal of veterinary internal medicine* **2006**, *20* (5), 1184-1190.
92. Marconato, L.; Romanelli, G.; Stefanello, D.; Giacoboni, C.; Bonfanti, U.; Bettini, G.; Finotello, R.; Verganti, S.; Valenti, P.; Ciaramella, L.; Zini, E., Prognostic factors for dogs with mammary inflammatory carcinoma: 43 cases (2003-2008). *Journal of the American Veterinary Medical Association* **2009**, *235* (8), 967-972.

93. Clemente, M.; De Andres, P. J.; Pena, L.; Perez-Alenza, M. D., Survival time of dogs with inflammatory mammary cancer treated with palliative therapy alone or palliative therapy plus chemotherapy. *The Veterinary record* **2009**, *165* (3), 78-81.
94. de, M. S. C. H.; Toledo-Piza, E.; Amorin, R.; Barboza, A.; Tobias, K. M., Inflammatory mammary carcinoma in 12 dogs: clinical features, cyclooxygenase-2 expression, and response to piroxicam treatment. *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne* **2009**, *50* (5), 506-510.
95. Dominguez, P. A.; Dervisis, N. G.; Cadile, C. D.; Sarbu, L.; Kitchell, B. E., Combined gemcitabine and carboplatin therapy for carcinomas in dogs. *Journal of veterinary internal medicine* **2009**, *23* (1), 130-137.
96. Deel, M. D.; Li, J. J.; Crose, L. E.; Linardic, C. M., A Review: Molecular Aberrations within Hippo Signaling in Bone and Soft-Tissue Sarcomas. *Frontiers in oncology* **2015**, *5*, 190.
97. Johnson, R.; Halder, G., The two faces of Hippo: targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment. *Nature Reviews Drug Discovery* **2014**, *13* (1), 63-79.
98. Park, H. W.; Guan, K.-L., The regulation of Hippo pathway and implications for anticancer drug development. *Trends in pharmacological sciences* **2013**, *34* (10), 581-589.
99. Piccolo, S.; Dupont, S.; Cordenonsi, M., The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiological reviews* **2014**, *94* (4), 1287-1312.
100. Genevet, A.; Tapon, N., The Hippo pathway and apico-basal cell polarity. *The Biochemical journal* **2011**, *436* (2), 213-224.
101. Halder, G.; Johnson, R. L., Hippo signaling: growth control and beyond. *Development (Cambridge, England)* **2011**, *138* (1), 9-22.
102. Pan, D., The hippo signaling pathway in development and cancer. *Developmental cell* **2010**, *19* (4), 491-505.
103. Ramos, A.; Camargo, F. D., The Hippo signaling pathway and stem cell biology. *Trends in cell biology* **2012**, *22* (7), 339-346.
104. Schroeder, M. C.; Halder, G., Regulation of the Hippo pathway by cell architecture and mechanical signals. *Seminars in cell & developmental biology* **2012**, *23* (7), 803-811.

105. Staley, B. K.; Irvine, K. D., Hippo signaling in *Drosophila*: recent advances and insights. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **2012**, *241* (1), 3-15.
106. Yu, F. X.; Guan, K. L., The Hippo pathway: regulators and regulations. *Genes & Development* **2013**, *27* (4), 355-371.
107. Bossuyt, W.; Chen, C. L.; Chen, Q.; Sudol, M.; McNeill, H.; Pan, D.; Kopp, A.; Halder, G., An evolutionary shift in the regulation of the Hippo pathway between mice and flies. *Oncogene* **2014**, *33* (10), 1218-1228.
108. Chen, C. L.; Schroeder, M. C.; Kango-Singh, M.; Tao, C.; Halder, G., Tumor suppression by cell competition through regulation of the Hippo pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2012**, *109* (2), 484-489.
109. Cordenonsi, M.; Zanconato, F.; Azzolin, L.; Forcato, M.; Rosato, A.; Frasson, C.; Inui, M.; Montagner, M.; Parenti, A. R.; Poletti, A.; Daidone, M. G.; Dupont, S.; Basso, G.; Bicciato, S.; Piccolo, S., The Hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells. *Cell* **2011**, *147* (4), 759-772.
110. Grzeschik, N. A.; Parsons, L. M.; Allott, M. L.; Harvey, K. F.; Richardson, H. E., Lgl, aPKC, and Crumbs regulate the Salvador/Warts/Hippo pathway through two distinct mechanisms. *Current biology : CB* **2010**, *20* (7), 573-581.
111. Menendez, J.; Perez-Garijo, A.; Calleja, M.; Morata, G., A tumor-suppressing mechanism in *Drosophila* involving cell competition and the Hippo pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010**, *107* (33), 14651-14656.
112. Zhao, M.; Szafranski, P.; Hall, C. A.; Goode, S., Basolateral junctions utilize warts signaling to control epithelial-mesenchymal transition and proliferation crucial for migration and invasion of *Drosophila* ovarian epithelial cells. *Genetics* **2008**, *178* (4), 1947-1971.
113. Briehner, W. M.; Yap, A. S., Cadherin junctions and their cytoskeleton(s). *Current opinion in cell biology* **2013**, *25* (1), 39-46.
114. Muthuswamy, S. K.; Xue, B., Cell polarity as a regulator of cancer cell behavior plasticity. *Annual review of cell and developmental biology* **2012**, *28*, 599-625.
115. Tepass, U., The apical polarity protein network in *Drosophila* epithelial cells: regulation of polarity, junctions, morphogenesis, cell growth, and survival. *Annual review of cell and developmental biology* **2012**, *28*, 655-685.

116. Twiss, F.; de Rooij, J., Cadherin mechanotransduction in tissue remodeling. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **2013**, *70* (21), 4101-4116.
117. Creasy, C. L.; Chernoff, J., Cloning and characterization of a member of the MST subfamily of Ste20-like kinases. *Gene* **1995**, *167* (1-2), 303-306.
118. Creasy, C. L.; Chernoff, J., Cloning and characterization of a human protein kinase with homology to Ste20. *The Journal of biological chemistry* **1995**, *270* (37), 21695-21700.
119. Harvey, K. F.; Pflieger, C. M.; Hariharan, I. K., The Drosophila Mst ortholog, hippo, restricts growth and cell proliferation and promotes apoptosis. *Cell* **2003**, *114* (4), 457-467.
120. Jia, J.; Zhang, W.; Wang, B.; Trinko, R.; Jiang, J., The Drosophila Ste20 family kinase dMST functions as a tumor suppressor by restricting cell proliferation and promoting apoptosis. *Genes & Development* **2003**, *17* (20), 2514-2519.
121. Justice, R. W.; Zilian, O.; Woods, D. F.; Noll, M.; Bryant, P. J., The Drosophila tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. *Genes & Development* **1995**, *9* (5), 534-546.
122. Mauviel, A.; Nallet-Staub, F.; Varelas, X., Integrating developmental signals: a Hippo in the (path)way. *Oncogene* **2012**, *31* (14), 1743-1756.
123. Pantalacci, S.; Tapon, N.; Leopold, P., The Salvador partner Hippo promotes apoptosis and cell-cycle exit in Drosophila. *Nature cell biology* **2003**, *5* (10), 921-927.
124. Shi, P.; Feng, J.; Chen, C., Hippo pathway in mammary gland development and breast cancer. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **2015**, *47* (1), 53-59.
125. Taylor, L. K.; Wang, H. C.; Erikson, R. L., Newly identified stress-responsive protein kinases, Krs-1 and Krs-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1996**, *93* (19), 10099-10104.
126. Udan, R. S.; Kango-Singh, M.; Nolo, R.; Tao, C.; Halder, G., Hippo promotes proliferation arrest and apoptosis in the Salvador/Warts pathway. *Nature cell biology* **2003**, *5* (10), 914-920.
127. Wu, S.; Huang, J.; Dong, J.; Pan, D., hippo encodes a Ste-20 family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with salvador and warts. *Cell* **2003**, *114* (4), 445-456.

128. Xu, T.; Wang, W.; Zhang, S.; Stewart, R. A.; Yu, W., Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the *Drosophila* *lats* gene encodes a putative protein kinase. *Development (Cambridge, England)* **1995**, *121* (4), 1053-1063.
129. Kango-Singh, M.; Nolo, R.; Tao, C.; Verstreken, P.; Hiesinger, P. R.; Bellen, H. J.; Halder, G., *Shar-pei* mediates cell proliferation arrest during imaginal disc growth in *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)* **2002**, *129* (24), 5719-5730.
130. Tapon, N.; Harvey, K. F.; Bell, D. W.; Wahrer, D. C.; Schiripo, T. A.; Haber, D.; Hariharan, I. K., *salvador* Promotes both cell cycle exit and apoptosis in *Drosophila* and is mutated in human cancer cell lines. *Cell* **2002**, *110* (4), 467-478.
131. Lai, Z. C.; Wei, X.; Shimizu, T.; Ramos, E.; Rohrbaugh, M.; Nikolaidis, N.; Ho, L. L.; Li, Y., Control of cell proliferation and apoptosis by *mob* as tumor suppressor, *mats*. *Cell* **2005**, *120* (5), 675-685.
132. Huang, J.; Wu, S.; Barrera, J.; Matthews, K.; Pan, D., The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the *Drosophila* Homolog of YAP. *Cell* **2005**, *122* (3), 421-434.
133. Zhao, B.; Li, L.; Lei, Q.; Guan, K. L., The Hippo-YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version. *Genes & Development* **2010**, *24* (9), 862-874.
134. Li, Y. W.; Shen, H.; Frangou, C.; Yang, N.; Guo, J.; Xu, B.; Bshara, W.; Shepherd, L.; Zhu, Q.; Wang, J.; Hu, Q.; Liu, S.; Morrison, C. D.; Sun, P.; Zhang, J., Characterization of TAZ domains important for the induction of breast cancer stem cell properties and tumorigenesis. *Cell Cycle* **2015**, *14* (1), 146-156.
135. Zhao, B.; Li, L.; Tumaneng, K.; Wang, C. Y.; Guan, K. L., A coordinated phosphorylation by *Lats* and CK1 regulates YAP stability through SCF(beta-TRCP). *Genes & Development* **2010**, *24* (1), 72-85.
136. Basu, S.; Totty, N. F.; Irwin, M. S.; Sudol, M.; Downward, J., Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. *Molecular cell* **2003**, *11* (1), 11-23.
137. Dong, J.; Feldmann, G.; Huang, J.; Wu, S.; Zhang, N.; Comerford, S. A.; Gayyed, M. F.; Anders, R. A.; Maitra, A.; Pan, D., Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals. *Cell* **2007**, *130* (6), 1120-1133.

138. Zhao, B.; Wei, X.; Li, W.; Udan, R. S.; Yang, Q.; Kim, J.; Xie, J.; Ikenoue, T.; Yu, J.; Li, L.; Zheng, P.; Ye, K.; Chinnaiyan, A.; Halder, G.; Lai, Z. C.; Guan, K. L., Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes & Development* **2007**, *21* (21), 2747-2761.
139. Huang, J. M.; Nagatomo, I.; Suzuki, E.; Mizuno, T.; Kumagai, T.; Berezov, A.; Zhang, H.; Karlan, B.; Greene, M. I.; Wang, Q., YAP modifies cancer cell sensitivity to EGFR and survivin inhibitors and is negatively regulated by the non-receptor type protein tyrosine phosphatase 14. *Oncogene* **2013**, *32* (17), 2220-2229.
140. Liu, X.; Yang, N.; Figel, S. A.; Wilson, K. E.; Morrison, C. D.; Gelman, I. H.; Zhang, J., PTPN14 interacts with and negatively regulates the oncogenic function of YAP. *Oncogene* **2013**, *32* (10), 1266-1273.
141. Michaloglou, C.; Lehmann, W.; Martin, T.; Delaunay, C.; Hueber, A.; Barys, L.; Niu, H.; Billy, E.; Wartmann, M.; Ito, M.; Wilson, C. J.; Digan, M. E.; Bauer, A.; Voshol, H.; Christofori, G.; Sellers, W. R.; Hofmann, F.; Schmelzle, T., The tyrosine phosphatase PTPN14 is a negative regulator of YAP activity. *PLoS One* **2013**, *8* (4), e61916.
142. Poernbacher, I.; Baumgartner, R.; Marada, S. K.; Edwards, K.; Stocker, H., Drosophila Pez acts in Hippo signaling to restrict intestinal stem cell proliferation. *Current biology : CB* **2012**, *22* (5), 389-396.
143. Wang, W.; Huang, J.; Wang, X.; Yuan, J.; Li, X.; Feng, L.; Park, J. I.; Chen, J., PTPN14 is required for the density-dependent control of YAP1. *Genes & Development* **2012**, *26* (17), 1959-1971.
144. Azzolin, L.; Panciera, T.; Soligo, S.; Enzo, E.; Bicciato, S.; Dupont, S.; Bresolin, S.; Frasson, C.; Basso, G.; Guzzardo, V.; Fassina, A.; Cordenonsi, M.; Piccolo, S., YAP/TAZ incorporation in the beta-catenin destruction complex orchestrates the Wnt response. *Cell* **2014**, *158* (1), 157-170.
145. Kanai, F.; Marignani, P. A.; Sarbassova, D.; Yagi, R.; Hall, R. A.; Donowitz, M.; Hisaminato, A.; Fujiwara, T.; Ito, Y.; Cantley, L. C.; Yaffe, M. B., TAZ: a novel transcriptional co-activator regulated by interactions with 14-3-3 and PDZ domain proteins. *The EMBO journal* **2000**, *19* (24), 6778-91.
146. Liu, C. Y.; Zha, Z. Y.; Zhou, X.; Zhang, H.; Huang, W.; Zhao, D.; Li, T.; Chan, S. W.; Lim, C. J.; Hong, W.; Zhao, S.; Xiong, Y.; Lei, Q. Y.; Guan, K. L., The hippo tumor pathway

promotes TAZ degradation by phosphorylating a phosphodegron and recruiting the SCF {beta}-TrCP E3 ligase. *The Journal of biological chemistry* **2010**, *285* (48), 37159-37169.

147. Oh, H.; Irvine, K. D., In vivo regulation of Yorkie phosphorylation and localization. *Development (Cambridge, England)* **2008**, *135* (6), 1081-1088.

148. Ren, F.; Zhang, L.; Jiang, J., Hippo signaling regulates Yorkie nuclear localization and activity through 14-3-3 dependent and independent mechanisms. *Developmental biology* **2010**, *337* (2), 303-312.

149. Goulev, Y.; Fauny, J. D.; Gonzalez-Marti, B.; Flagiello, D.; Silber, J.; Zider, A., SCALLOPED interacts with YORKIE, the nuclear effector of the hippo tumor-suppressor pathway in Drosophila. *Current biology : CB* **2008**, *18* (6), 435-441.

150. Vassilev, A.; Kaneko, K. J.; Shu, H.; Zhao, Y.; DePamphilis, M. L., TEAD/TEF transcription factors utilize the activation domain of YAP65, a Src/Yes-associated protein localized in the cytoplasm. *Genes & Development* **2001**, *15* (10), 1229-1241.

151. Wu, S.; Liu, Y.; Zheng, Y.; Dong, J.; Pan, D., The TEAD/TEF family protein Scalloped mediates transcriptional output of the Hippo growth-regulatory pathway. *Developmental cell* **2008**, *14* (3), 388-398.

152. Zhang, L.; Ren, F.; Zhang, Q.; Chen, Y.; Wang, B.; Jiang, J., The TEAD/TEF family of transcription factor Scalloped mediates Hippo signaling in organ size control. *Developmental cell* **2008**, *14* (3), 377-387.

153. Zhao, B.; Ye, X.; Yu, J.; Li, L.; Li, W.; Li, S.; Yu, J.; Lin, J. D.; Wang, C. Y.; Chinnaiyan, A. M.; Lai, Z. C.; Guan, K. L., TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes & Development* **2008**, *22* (14), 1962-1971.

154. Calvo, F.; Ege, N.; Grande-Garcia, A.; Hooper, S.; Jenkins, R. P.; Chaudhry, S. I.; Harrington, K.; Williamson, P.; Moeendarbary, E.; Charras, G.; Sahai, E., Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. *Nature cell biology* **2013**, *15* (6), 637-646.

155. Dupont, S.; Morsut, L.; Aragona, M.; Enzo, E.; Giulitti, S.; Cordenonsi, M.; Zanconato, F.; Le Digabel, J.; Forcato, M.; Bicciato, S.; Elvassore, N.; Piccolo, S., Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* **2011**, *474* (7350), 179-183.

156. Yuen, H. F.; McCrudden, C. M.; Huang, Y. H.; Tham, J. M.; Zhang, X.; Zeng, Q.; Zhang, S. D.; Hong, W., TAZ expression as a prognostic indicator in colorectal cancer. *PLoS One* **2013**, *8* (1), e54211.
157. Harvey, K. F.; Zhang, X.; Thomas, D. M., The Hippo pathway and human cancer. *Nature Reviews Cancer* **2013**, *13* (4), 246-257.
158. Klopffleisch, R.; von Euler, H.; Sarli, G.; Pinho, S. S.; Gartner, F.; Gruber, A. D., Molecular carcinogenesis of canine mammary tumors: news from an old disease. *Veterinary pathology* **2011**, *48* (1), 98-116.
159. Chen, Q.; Zhang, N.; Gray, R. S.; Li, H.; Ewald, A. J.; Zahnnow, C. A.; Pan, D., A temporal requirement for Hippo signaling in mammary gland differentiation, growth, and tumorigenesis. *Genes & Development* **2014**, *28* (5), 432-437.
160. Skibinski, A.; Breindel, J. L.; Prat, A.; Galvan, P.; Smith, E.; Rolfs, A.; Gupta, P. B.; Labaer, J.; Kuperwasser, C., The Hippo transducer TAZ interacts with the SWI/SNF complex to regulate breast epithelial lineage commitment. *Cell reports* **2014**, *6* (6), 1059-1072.
161. St John, M. A.; Tao, W.; Fei, X.; Fukumoto, R.; Carcangiu, M. L.; Brownstein, D. G.; Parlow, A. F.; McGrath, J.; Xu, T., Mice deficient of Lats1 develop soft-tissue sarcomas, ovarian tumours and pituitary dysfunction. *Nature genetics* **1999**, *21* (2), 182-186.
162. Fernandez, L. A.; Northcott, P. A.; Dalton, J.; Fraga, C.; Ellison, D.; Angers, S.; Taylor, M. D.; Kenney, A. M., YAP1 is amplified and up-regulated in hedgehog-associated medulloblastomas and mediates Sonic hedgehog-driven neural precursor proliferation. *Genes & Development* **2009**, *23* (23), 2729-2741.
163. Overholtzer, M.; Zhang, J.; Smolen, G. A.; Muir, B.; Li, W.; Sgroi, D. C.; Deng, C.-X.; Brugge, J. S.; Haber, D. A., Transforming properties of YAP, a candidate oncogene on the chromosome 11q22 amplicon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103* (33), 12405-12410.
164. Steinhardt, A. A.; Gayyed, M. F.; Klein, A. P.; Dong, J.; Maitra, A.; Pan, D.; Montgomery, E. A.; Anders, R. A., Expression of Yes-associated protein in common solid tumors. *Human pathology* **2008**, *39* (11), 1582-1589.
165. Xu, M. Z.; Yao, T. J.; Lee, N. P.; Ng, I. O.; Chan, Y. T.; Zender, L.; Lowe, S. W.; Poon, R. T.; Luk, J. M., Yes-associated protein is an independent prognostic marker in hepatocellular carcinoma. *Cancer* **2009**, *115* (19), 4576-4585.

166. Zender, L.; Spector, M. S.; Xue, W.; Flemming, P.; Cordon-Cardo, C.; Silke, J.; Fan, S. T.; Luk, J. M.; Wigler, M.; Hannon, G. J.; Mu, D.; Lucito, R.; Powers, S.; Lowe, S. W., Identification and validation of oncogenes in liver cancer using an integrative oncogenomic approach. *Cell* **2006**, *125* (7), 1253-1267.
167. Barron, D. A.; Kagey, J. D., The role of the Hippo pathway in human disease and tumorigenesis. *Clinical and Translational Medicine* **2014**, *3*, 25.
168. Vlug, E. J.; van de Ven, R. A.; Vermeulen, J. F.; Bult, P.; van Diest, P. J.; Derksen, P. W., Nuclear localization of the transcriptional coactivator YAP is associated with invasive lobular breast cancer. *Cellular Oncology* **2013**, *36* (5), 375-384.
169. Hanahan, D.; Weinberg, Robert A., Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144** (5), 646-674.
170. Lamar, J. M.; Stern, P.; Liu, H.; Schindler, J. W.; Jiang, Z. G.; Hynes, R. O., The Hippo pathway target, YAP, promotes metastasis through its TEAD-interaction domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2012**, *109* (37), E2441-2450.
171. Lei, Q. Y.; Zhang, H.; Zhao, B.; Zha, Z. Y.; Bai, F.; Pei, X. H.; Zhao, S.; Xiong, Y.; Guan, K. L., TAZ promotes cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition and is inhibited by the hippo pathway. *Molecular and cellular biology* **2008**, *28* (7), 2426-2436.
172. Ota, M.; Sasaki, H., Mammalian Tead proteins regulate cell proliferation and contact inhibition as transcriptional mediators of Hippo signaling. *Development (Cambridge, England)* **2008**, *135* (24), 4059-4069.
173. Piccolo, S.; Cordenonsi, M.; Dupont, S., Molecular pathways: YAP and TAZ take center stage in organ growth and tumorigenesis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2013**, *19* (18), 4925-4930.
174. Scheel, C.; Weinberg, R. A., Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: concepts and molecular links. *Seminars in cell & developmental biology* **2012**, *22* (5-6), 396-403.
175. Imanaka, Y.; Tsuchiya, S.; Sato, F.; Shimada, Y.; Shimizu, K.; Tsujimoto, G., MicroRNA-141 confers resistance to cisplatin-induced apoptosis by targeting YAP1 in human esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of human genetics* **2011**, *56* (4), 270-276.

176. Kawahara, M.; Hori, T.; Chonabayashi, K.; Oka, T.; Sudol, M.; Uchiyama, T., Kpm/Lats2 is linked to chemosensitivity of leukemic cells through the stabilization of p73. *Blood* **2008**, *112* (9), 3856-3866.
177. Lai, D.; Ho, K. C.; Hao, Y.; Yang, X., Taxol resistance in breast cancer cells is mediated by the hippo pathway component TAZ and its downstream transcriptional targets Cyr61 and CTGF. *Cancer Research* **2011**, *71* (7), 2728-2738.
178. Lee, K. P.; Lee, J. H.; Kim, T. S.; Kim, T. H.; Park, H. D.; Byun, J. S.; Kim, M. C.; Jeong, W. I.; Calvisi, D. F.; Kim, J. M.; Lim, D. S., The Hippo-Salvador pathway restrains hepatic oval cell proliferation, liver size, and liver tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010**, *107* (18), 8248-8253.
179. Song, H.; Mak, K. K.; Topol, L.; Yun, K.; Hu, J.; Garrett, L.; Chen, Y.; Park, O.; Chang, J.; Simpson, R. M.; Wang, C. Y.; Gao, B.; Jiang, J.; Yang, Y., Mammalian Mst1 and Mst2 kinases play essential roles in organ size control and tumor suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010**, *107* (4), 1431-1436.
180. Zhang, N.; Bai, H.; David, K. K.; Dong, J.; Zheng, Y.; Cai, J.; Giovannini, M.; Liu, P.; Anders, R. A.; Pan, D., The Merlin/NF2 tumor suppressor functions through the YAP oncoprotein to regulate tissue homeostasis in mammals. *Developmental cell* **2010**, *19* (1), 27-38.
181. Zhang, H.; Liu, C. Y.; Zha, Z. Y.; Zhao, B.; Yao, J.; Zhao, S.; Xiong, Y.; Lei, Q. Y.; Guan, K. L., TEAD transcription factors mediate the function of TAZ in cell growth and epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of biological chemistry* **2009**, *284* (20), 13355-13362.
182. Mizuno, T.; Murakami, H.; Fujii, M.; Ishiguro, F.; Tanaka, I.; Kondo, Y.; Akatsuka, S.; Toyokuni, S.; Yokoi, K.; Osada, H.; Sekido, Y., YAP induces malignant mesothelioma cell proliferation by upregulating transcription of cell cycle-promoting genes. *Oncogene* **2012**, *31* (49), 5117-5122.
183. Xu, M. Z.; Chan, S. W.; Liu, A. M.; Wong, K. F.; Fan, S. T.; Chen, J.; Poon, R. T.; Zender, L.; Lowe, S. W.; Hong, W.; Luk, J. M., AXL receptor kinase is a mediator of YAP-dependent oncogenic functions in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* **2011**, *30* (10), 1229-1240.

184. Zhang, J.; Ji, J. Y.; Yu, M.; Overholtzer, M.; Smolen, G. A.; Wang, R.; Brugge, J. S.; Dyson, N. J.; Haber, D. A., YAP-dependent induction of amphiregulin identifies a non-cell-autonomous component of the Hippo pathway. *Nature cell biology* **2009**, *11* (12), 1444-1450.
185. Zhao, B.; Li, L.; Wang, L.; Wang, C. Y.; Yu, J.; Guan, K. L., Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induce anoikis. *Genes & Development* **2012**, *26* (1), 54-68.
186. Yeger, H.; Perbal, B., The CCN family of genes: a perspective on CCN biology and therapeutic potential. *Journal of cell communication and signaling* **2007**, *1* (3-4), 159-164.
187. Chen, P. S.; Wang, M. Y.; Wu, S. N.; Su, J. L.; Hong, C. C.; Chuang, S. E.; Chen, M. W.; Hua, K. T.; Wu, Y. L.; Cha, S. T.; Babu, M. S.; Chen, C. N.; Lee, P. H.; Chang, K. J.; Kuo, M. L., CTGF enhances the motility of breast cancer cells via an integrin- α v β 3-ERK1/2-dependent S100A4-upregulated pathway. *Journal of cell science* **2007**, *120* (Pt 12), 2053-2065.
188. Tsai, M. S.; Bogart, D. F.; Castaneda, J. M.; Li, P.; Lupu, R., Cyr61 promotes breast tumorigenesis and cancer progression. *Oncogene* **2002**, *21* (53), 8178-8185.
189. Beffagna, G.; Sacchetto, R.; Cavicchioli, L.; Sammarco, A.; Mainenti, M.; Ferro, S.; Trez, D.; Zulpo, M.; Michieletto, S.; Cecchinato, A.; Goldschmidt, M.; Zappulli, V., A preliminary investigation of the role of the transcription co-activators YAP/TAZ of the Hippo signalling pathway in canine and feline mammary tumours. *The Veterinary Journal* **2016**, *207*, 105-111.
190. Yu, F. X.; Zhao, B.; Panupinthu, N.; Jewell, J. L.; Lian, I.; Wang, L. H.; Zhao, J.; Yuan, H.; Tumaneng, K.; Li, H.; Fu, X. D.; Mills, G. B.; Guan, K. L., Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling. *Cell* **2012**, *150* (4), 780-791.
191. Neesse, A.; Frese, K. K.; Bapiro, T. E.; Nakagawa, T.; Sternlicht, M. D.; Seeley, T. W.; Pilarsky, C.; Jodrell, D. I.; Spong, S. M.; Tuveson, D. A., CTGF antagonism with mAb FG-3019 enhances chemotherapy response without increasing drug delivery in murine ductal pancreas cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2013**, *110* (30), 12325-12330.
192. Yang, N.; Morrison, C. D.; Liu, P.; Miecznikowski, J.; Bshara, W.; Han, S.; Zhu, Q.; Omilian, A. R.; Li, X.; Zhang, J., TAZ induces growth factor-independent proliferation through activation of EGFR ligand amphiregulin. *Cell Cycle* **2012**, *11* (15), 2922-2930.

193. Bressler, N. M., Verteporfin therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration: two-year results of a randomized clinical trial including lesions with occult with no classic choroidal neovascularization-verteporfin in photodynamic therapy report 2. *American Journal of Ophthalmology* **2002**, *133* (1), 168-169.
194. Michels, S.; Schmidt-Erfurth, U., Photodynamic therapy with verteporfin: a new treatment in ophthalmology. *Seminars in Ophthalmology* **2001**, *16* (4), 201-206.
195. Hu, Z.; Rao, B.; Chen, S.; Duanmu, J., Targeting tissue factor on tumour cells and angiogenic vascular endothelial cells by factor VII-targeted verteporfin photodynamic therapy for breast cancer in vitro and in vivo in mice. *BMC cancer* **2010**, *10*, 235.
196. Huggett, M. T.; Jermyn, M.; Gillams, A.; Illing, R.; Mosse, S.; Novelli, M.; Kent, E.; Bown, S. G.; Hasan, T.; Pogue, B. W.; Pereira, S. P., Phase I/II study of verteporfin photodynamic therapy in locally advanced pancreatic cancer. *British journal of cancer* **2014**, *110* (7), 1698-1704.
197. Donohue, E.; Thomas, A.; Maurer, N.; Manisali, I.; Zeisser-Labouebe, M.; Zisman, N.; Anderson, H. J.; Ng, S. S.; Webb, M.; Bally, M.; Roberge, M., The autophagy inhibitor verteporfin moderately enhances the antitumor activity of gemcitabine in a pancreatic ductal adenocarcinoma model. *Journal of Cancer* **2013**, *4* (7), 585-596.
198. Gibault, F.; Corvaisier, M.; Bailly, F.; Huet, G.; Melnyk, P.; Cotelle, P., Non-Photoinduced Biological Properties of Verteporfin. *Current medicinal chemistry* **2016**, *23* (11), 1171-1184.
199. Morishita, T.; Hayakawa, F.; Sugimoto, K.; Iwase, M.; Yamamoto, H.; Hirano, D.; Kojima, Y.; Imoto, N.; Naoe, T.; Kiyoi, H., The photosensitizer verteporfin has light-independent anti-leukemic activity for Ph-positive acute lymphoblastic leukemia and synergistically works with dasatinib. *Oncotarget* **2016**, *7* (35), 56241-56252.
200. Ciamporcerro, E.; Shen, H.; Ramakrishnan, S.; Ku, S. Y.; Chintala, S.; Shen, L.; Adelaiye, R.; Miles, K. M.; Ullio, C.; Pizzimenti, S.; Daga, M.; Azabdaftari, G.; Attwood, K.; Johnson, C.; Zhang, J.; Barrera, G.; Pili, R., YAP activation protects urothelial cell carcinoma from treatment-induced DNA damage. *Oncogene* **2016**, *35* (12), 1541-1553.
201. Josefsen, L. B.; Boyle, R. W., Photodynamic Therapy and the Development of Metal-Based Photosensitisers. *Metal-Based Drugs* **2008**, *2008*.

202. Wang, C.; Zhu, X.; Feng, W.; Yu, Y.; Jeong, K.; Guo, W.; Lu, Y.; Mills, G. B., Verteporfin inhibits YAP function through up-regulating 14-3-3sigma sequestering YAP in the cytoplasm. *American journal of cancer research* **2016**, *6* (1), 27-37.
203. Hermeking, H.; Lengauer, C.; Polyak, K.; He, T. C.; Zhang, L.; Thiagalingam, S.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B., 14-3-3sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Molecular cell* **1997**, *1* (1), 3-11.
204. Gilbertson, S. R.; Kurzman, I. D.; Zachrau, R. E.; Hurvitz, A. I.; Black, M. M., Canine mammary epithelial neoplasms: biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. *Veterinary pathology* **1983**, *20* (2), 127-142.
205. Kleer, C. G., Dual roles of CCN proteins in breast cancer progression. *Journal of cell communication and signaling* **2016**, *10* (3), 217-222.
206. Jiang, W. G.; Watkins, G.; Fodstad, O.; Douglas-Jones, A.; Mokbel, K.; Mansel, R. E., Differential expression of the CCN family members Cyr61, CTGF and Nov in human breast cancer. *Endocrine-related cancer* **2004**, *11* (4), 781-791.
207. Espinoza, I.; Menendez, J. A.; Kvp, C. M.; Lupu, R., CCN1 promotes vascular endothelial growth factor secretion through alphavbeta 3 integrin receptors in breast cancer. *Journal of cell communication and signaling* **2014**, *8* (1), 23-27.
208. Harris, L. G.; Pannell, L. K.; Singh, S.; Samant, R. S.; Shevde, L. A., Increased vascularity and spontaneous metastasis of breast cancer by hedgehog signaling mediated upregulation of cyr61. *Oncogene* **2012**, *31* (28), 3370-3380.
209. Sanchez-Bailon, M. P.; Calcabrini, A.; Mayoral-Varo, V.; Molinari, A.; Wagner, K. U.; Losada, J. P.; Ciordia, S.; Albar, J. P.; Martin-Perez, J., Cyr61 as mediator of Src signaling in triple negative breast cancer cells. *Oncotarget* **2015**, *6* (15), 13520-13538.
210. Xie, D.; Nakachi, K.; Wang, H.; Elashoff, R.; Koeffler, H. P., Elevated levels of connective tissue growth factor, WISP-1, and CYR61 in primary breast cancers associated with more advanced features. *Cancer Research* **2001**, *61* (24), 8917-8923.
211. Chien, W.; O'Kelly, J.; Lu, D.; Leiter, A.; Sohn, J.; Yin, D.; Karlan, B.; Vadgama, J.; Lyons, K. M.; Koeffler, H. P., Expression of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in breast cancer cells is associated with increased migration and angiogenesis. *International journal of oncology* **2011**, *38* (6), 1741-1747.

212. Wang, M. Y.; Chen, P. S.; Prakash, E.; Hsu, H. C.; Huang, H. Y.; Lin, M. T.; Chang, K. J.; Kuo, M. L., Connective tissue growth factor confers drug resistance in breast cancer through concomitant up-regulation of Bcl-xL and cIAP1. *Cancer Research* **2009**, *69* (8), 3482-3491.
213. Maugeri-Sacca, M.; De Maria, R., Hippo pathway and breast cancer stem cells. *Critical reviews in oncology/hematology* **2016**, *99*, 115-122.
214. Wang, C.; Zhu, X.; Feng, W.; Yu, Y.; Jeong, K.; Guo, W.; Lu, Y.; Mills, G. B., Verteporfin inhibits YAP function through up-regulating 14-3-3sigma sequestering YAP in the cytoplasm. *American journal of cancer research* **2016**, *6* (1), 27-37.
215. Zhou, X.; Wang, S.; Wang, Z.; Feng, X.; Liu, P.; Lv, X. B.; Li, F.; Yu, F. X.; Sun, Y.; Yuan, H.; Zhu, H.; Xiong, Y.; Lei, Q. Y.; Guan, K. L., Estrogen regulates Hippo signaling via GPER in breast cancer. *J Clin Invest* **2015**, *125* (5), 2123-35.
216. Britschgi, A.; Duss, S.; Kim, S.; Couto, J. P.; Brinkhaus, H.; Koren, S.; De Silva, D.; Mertz, K. D.; Kaup, D.; Varga, Z., The Hippo kinases LATS1 and 2 control human breast cell fate via crosstalk with ER α . *Nature* **2017**, *541* (7638), 541-545.
217. Oku, Y.; Nishiya, N.; Shito, T.; Yamamoto, R.; Yamamoto, Y.; Oyama, C.; Uehara, Y., Small molecules inhibiting the nuclear localization of YAP/TAZ for chemotherapeutics and chemosensitizers against breast cancers. *FEBS open bio* **2015**, *5*, 542-549.
218. Likus, W.; Siemianowicz, K.; Bienk, K.; Pakula, M.; Pathak, H.; Dutta, C.; Wang, Q.; Shojaei, S.; Assaraf, Y. G.; Ghavami, S.; Cieslar-Pobuda, A.; Los, M. J., Could drugs inhibiting the mevalonate pathway also target cancer stem cells? *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* **2016**, *25*, 13-25.
219. Sorrentino, G.; Ruggeri, N.; Specchia, V.; Cordenonsi, M.; Mano, M.; Dupont, S.; Manfrin, A.; Ingallina, E.; Sommaggio, R.; Piazza, S.; Rosato, A.; Piccolo, S.; Del Sal, G., Metabolic control of YAP and TAZ by the mevalonate pathway. *Nature cell biology* **2014**, *16* (4), 357-366.
220. Undela, K.; Srikanth, V.; Bansal, D., Statin use and risk of breast cancer: a meta-analysis of observational studies. *Breast cancer research and treatment* **2012**, *135* (1), 261-269.